

Transduktion in *Streptococcus thermophilus*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Andreas Ammann

Kiel, 2006

Danksagung

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. J. Heller, Herrn Dr. H. Neve und Herrn PD Dr. Geis für die Vergabe des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die anregenden Diskussionen. Insbesondere möchte ich Herrn Geis für die fachliche Beratung und Bereitstellung vieler Plasmid-Konstrukte bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch an alle übrigen Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie der Bundesanstalt für Milchforschung richten. Die technische und persönlichen Unterstützung von Angela Back, Inka Lammertz, Frau Wind, Bernd Fahrenholz und Gisela Paasch war unbezahlbar. Bei Jochen Dietrich, André Göhler und zahlreichen Doktoranden, Diplomanden, Praktikanten, Auszubildenden und Schülern möchte ich mich für den interessanten fachlichen (und nicht fachlichen) Gedankenaustausch bedanken. Als nicht unerheblichen Retter in der Not möchte ich den Radiosender Ultra erwähnen, dessen akustische Unterstützung für mich als Menschen mit hohem Arousal-Bedarf unverzichtbar war. Nicht zu vergessen ist die Geduld des Sekretariats, das es nicht immer leicht mit dem administratophoben Doktoranden hatte.

Von hohem persönlichem Wert war für mich der internationale kulturelle Austausch, der mir einen Einblick in die Kulturen von Ägypten, China, Indien und Bayern ermöglichte.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Frau Désirée Burba für ihre große Geduld und ihre enorme Unterstützung bedanken.

Ich danke der Danisco Deutschland GmbH Niebüll und der Nordmilch eG Zeven, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Verzeichnis der Abkürzungen

(w/v)	Gewicht pro Volumen
Abb.	Abbildung
aqua bidest.	hochreines Wasser (Reinigung mit SG Reinstwasser-System Clear)
bp	Basenpaare
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
KbE	Kolonien bildende Einheiten
M	Molar
M.O.I.	Multiplicity of infection
mod.	modifiziert
nm	Nanometer
OD ₆₂₀	Optische Dichte bei 620 nm
ORF	offenes Leseraster („ <i>open reading frame</i> “)
PbE	Plaque bildende Einheiten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RNase	Ribonuklease
upm	Umdrehungen pro Minute
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheit für enzymatische Aktivität (engl.: „ <i>unit</i> “)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	7
1.1. Milchsäurebakterien.....	7
1.2. Bakteriophagen in Biologie und Wirtschaft	8
1.2.1. Der Lebenszyklus der Phagen	9
1.2.2. Die Bakteriophagen der Milchsäurebakterien	12
1.2.3. Bedeutung der Phagen für die Milchwirtschaft.....	12
1.3. Methoden des DNA-Transfers	13
1.3.1. Transformation und Konjugation	13
1.3.2. Transduktion	14
1.3.3. Transduktion bei Milchsäurebakterien	15
1.4. „Novel-food“ und Gentechnik	17
1.5. Ziele der Arbeit.....	18
2. MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1. Kulturmedien und Lösungen	19
2.1.1. Nährmedien	19
2.2. Lösungen und Puffer	21
2.2.1. Lösungen und Puffer für Transduktion und Transformation.....	22
2.2.2. DNA-Extraktion und Analyse	22
2.3. Bakterienkulturen.....	23
2.3.1. Bereitstellung der Kulturen	23
2.3.2. Wachstumsversuche zur Überprüfung der Hitze-resistenz.....	23
2.3.3. Bestimmung der Überlebensrate für <i>S. thermophilus</i> a10 bei hohen Inkubationstemperaturen und Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten	24
2.4. Versuche mit Phagen.....	24
2.4.1. Isolierung der Phagen aus Einzelplaques	24
2.4.2. Bestimmung der Phagenkonzentration in Lysaten	25
2.4.3. Herstellung der Phagenlysate	25
2.4.4. Konzentrierung der Phagenlysate.....	25
2.4.5. Phagen-Inaktivierung durch UV-Licht.....	26
2.4.6. Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht.....	26
2.4.7. Transduktion mit <i>S. thermophilus</i> -Phagen	26
2.4.8. Zellvereinzlung in <i>S. thermophilus</i> -Kulturen durch Ultraschall.....	27
2.4.9. Adsorptionstests mit Phagen	27
2.4.10. „One-Step-Growth“-Experimente	27
2.5. DNA Analyse und Modifikation	28
2.5.1. Agarosegelelektrophorese	28
2.5.2. DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.5.3. Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung	28
2.5.4. Isolierung der Plasmid-DNA.....	29
2.5.5. Isolierung der Phagen-DNA.....	29
2.5.6. Restriktionshydrolysen.....	30
2.5.7. Herstellung der Zell-Rohextrakte	30
2.5.8. Inkubation der DNA mit Zellextrakten aus <i>S. thermophilus</i>	30
2.5.9. Identifizierung der <i>cos</i> -Stellen in Phagen-genomen	30
2.5.10. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.5.11.	Mikrodialyse	31
2.5.12.	Ligationsreaktionen	31
2.5.13.	DNA-DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden	31
2.5.14.	PCR	33
2.5.15.	DNA-Sequenzierung	34
2.5.16.	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	34
2.6.	Klonierungen.....	34
2.6.1.	Herstellung elektrokompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	34
2.6.2.	<i>E. coli</i> Transformation durch Elektroporation.....	35
2.6.3.	Herstellung elektrokompetenter Zellen für <i>S. thermophilus</i>	35
2.6.4.	Herstellung elektrokompetenter <i>S. thermophilus</i> Zellen	35
2.6.5.	Herstellung kompetenter <i>L. lactis</i> Zellen	36
2.6.6.	Transformation mit <i>S. thermophilus</i> und <i>L. lactis</i> durch Elektroporation	36
2.7.	Phagen, Stämme und Plasmide.....	37
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	Übersicht.....	40
3.2.	DNA-Sequenzanalysen	40
3.2.1.	Charakterisierung der verwendeten <i>S. thermophilus</i> -Phagen	40
3.2.2.	Plasmid-Sequenzen	44
3.3.	Charakterisierung der Transduktion in <i>S. thermophilus</i> mit <i>cos</i>-Phagen	47
3.3.1.	Transduktion verschiedener Plasmide in <i>S. thermophilus</i>	47
3.3.2.	Die Bedeutung der <i>cos</i> - und <i>ori</i> -Region für die Transduktion	49
3.3.3.	Transduktion mit <i>S. thermophilus</i> -Phagen in Wirts- und Nichtwirtsstämmen	56
3.4.	Anwendungen der Transduktion.....	63
3.4.1.	Plasmidkurierung mittels Transduktion von Plasmiden	63
3.4.2.	Einfluss der <i>cos</i> -Region auf die Phagenresistenz	64
3.4.3.	Transduktion ohne Selektion: Optimierung des Transduktionsprotokolls	67
4.	DISKUSSION	88
4.1.	Charakterisierung der Phagen und Plasmide	88
4.2.	Charakterisierung der Transduktion mit <i>cos</i>-Phagen in <i>S. thermophilus</i>	90
4.2.1.	Transduktion verschiedener Plasmide und Bedeutung der <i>cos</i> -Region.....	90
4.2.2.	Verpackungsmechanismus der Plasmide	94
4.2.3.	Transduktion mit <i>S. thermophilus</i> -Phagen in Wirts- und Nichtwirtsstämmen	95
4.2.4.	Transduktion als horizontaler Gentransfer	98
4.3.	Praktische Anwendungen.....	100
4.3.1.	Plasmidkurierung mittels Transduktion	100
4.3.2.	Die Bedeutung der <i>cos</i> -Region als Per-System	100
4.3.3.	Transduktion ohne Selektion.....	102
4.4.	Bilanz und Ausblick.....	108
5.	ZUSAMMENFASSUNG	110
6.	SUMMARY	111

Inhaltsverzeichnis

7. ANHANG	112
7.1. Sequenzvergleiche	112
7.2. Restriktionsprofile der Phagen Genome	113
7.3. Beispiele für Plasmidisolierungen aus Transduktanten	116
8. LITERATUR	119

1. Einleitung

1.1. Milchsäurebakterien

Die gesundheitliche Bedeutung der Milchsäurebakterien für fermentierte Milchprodukte wurde bereits 1908 entdeckt (Metchnikoff, 1908).

Milchsäurebakterien sind definiert als Gram-positive, nicht sporenbildende, Katalase negative Organismen, die keine Cytochrome aufweisen und einen rein fermentativen Stoffwechsel haben, sowie aerotolerant und säuretolerant sind (Axelsson, 1998). Eine Ausnahme innerhalb dieser Charakterisierung sind einige Stämme, die eine degenerierte Atmungskette besitzen und – in Anwesenheit von Hämatin – Katalase oder Cytochrome bilden können (Whittenbury, 1964; Wolf *et al.*, 1991; Meisel *et al.*, 1994). Bei einigen Stämmen von *Lactobacillus* kommt eine so genannte Pseudokatalase vor, die keine Häm-Gruppe besitzt (Engesser und Hammes, 1994). Die Milchsäurebakterien zeichnen sich weiterhin durch einen GC-Gehalt von unter 50% aus.

Für den Energiestoffwechsel dienen hauptsächlich Kohlenhydrate, insbesondere Laktose. Im wesentlichen wird Milchsäure als Stoffwechselendprodukt gebildet. Aufgrund weiterer Endprodukte des Energiestoffwechsels werden die Milchsäurebakterien in zwei Gruppen eingeteilt. Die Homofermentativen bilden aus Glukose über den Embden-Meyerhof-Weg fast ausschließlich Laktat, die Heterofermentativen über den Pentosephosphat-Weg Ethanol, Acetat, Laktat und CO₂, sowie in einigen Fällen Mannit.

Für die Lebensmittelproduktion bedeutsame Spezies finden sich in den Genera *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* und *Streptococcus* (Stiles und Holzapfel, 1997). *S. thermophilus* ist der einzige Vertreter des Genus *Streptococcus*, der in der Milchwirtschaft von Bedeutung ist. *S. thermophilus* wird z.B. für die Produktion von Joghurt, Mozzarella und Emmentaler eingesetzt. *S. thermophilus* wurde 1919 beschrieben (Orla-Jensen, 1919), ist homofermentativ und hat ein Wachstumsoptimum von 37°C bis 42°C. Im Gegensatz zu anderen Streptokokken zeigt *S. thermophilus* Wachstum bei 50°C, nicht aber bei 10°C oder 2% NaCl (Sherman, 1937). Ausserdem unterscheidet er sich von anderen

Streptokokken durch sein natürliches Habitat und das Fehlen von N-Gruppenantigenen (Ottogalli und Galli, 2006).

1.2. Bakteriophagen in Biologie und Wirtschaft

Die Bakteriophagen gehören zu den Viren. Sie sind biologische Einheiten ohne eigenen Stoffwechsel, die für ihre Vermehrung auf eine Wirtszelle angewiesen sind. Der Begriff Bakteriophage ist auf das griechische Wort „phagein“ zurückzuführen, das „essen“ bedeutet. Bakteriophagen, in der Literatur auch abgekürzt als Phagen bezeichnet, sind Viren, denen ausschließlich Prokaryoten als Wirte dienen können (Archaea und Bacteria). Theoretische Berechnungen besagen, dass Bakteriophagen die häufigsten biologischen Einheiten der Erde sind (Fuhrman, 1999). Entdeckt wurden sie Anfang des 20. Jahrhunderts (Twort, 1915; d'Herelle, 1917). Die Komplexität der extrazellulären Form, des Virions, reicht von nur einem isodiametrischem Kopf, wie bei dem Phagen M2, bis hin zu Strukturen mit Kopf (isodiametrisch oder prolat), Schwanz, Schwanzfibern und Endplatte. In der klassischen Aufteilung (Bradley, 1967) werden die Phagen anhand ihrer Morphologie in die Morphotypen A bis F aufgeteilt. Phagen mit Schwänzen (Morphotyp A,B,C), denen alle Phagen der Milchsäurebakterien angehören, werden aufgrund der Morphologie ihres Kopfes in die Subtypen 1-3 aufgeteilt. Eine modernere Klassifikation teilt die Phagen in verschiedene Ordnungen, Familien und Genera auf. Während Bakteriophagen in der fermentierenden Industrie ein Problem darstellen (Sanders, 1987), werden sie für verschiedene Anwendungen in Forschung und Wirtschaft produktiv genutzt (Abb. 1).

Forschung	Milchwirtschaft	Medizin
Genetische Grundlagenforschung	Genübertragung durch Transduktion	Alternative zu Antibiotika
Quelle für neue Promotoren	Quelle für Phagenresistenzen	Identifikation bakterieller Erreger (Lysotypie)
Bedeutung in der Bakterienevolution	<div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Konstruktion stellen-spezifischer Integrationssysteme Herstellung von induzierbaren Expressionssystemen </div>	

Abb. 1: Beispiele für die Nutzung von Bakteriophagen in Forschung, Wirtschaft und Medizin.

1.2.1. Der Lebenszyklus der Phagen

Es gibt drei verschiedene Zyklen, die Phagen für ihre Vermehrung nutzen. Lysogenie, lytischer Zyklus und die Vermehrung der filamentösen Phagen. Für die Bakteriophagen der Milchsäurebakterien sind nur die ersten beiden Zyklen von Bedeutung.

Adsorption und Injektion

Der erste Station der Phagenvermehrung ist die Adsorption des Phagenpartikels an Phagenrezeptoren der Wirtszelle. Der *E. coli* Phage T5 bindet zunächst reversibel an das O-Antigen des Membran-Lipoproteins (primärer Rezeptor). Anschließend erfolgt die irreversible Bindung an ein Transportprotein (TonA) der Zellmembran (sekundärer Rezeptor) (Heller, 1992). Bei Laktokokken, *S. thermophilus* und Laktobacillen sind Zellwandkohlenhydrate wie Rhamnose, Glucose, Galaktose und deren acetylierte Formen die wesentlichen primären Rezeptoren (Watanabe und Takesue, 1975; Yokokura, 1977; Keogh und Pettinghill, 1983; Valyasevi *et al.*, 1990; Sijtsma *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1991; Monteville *et al.*, 1994; Quiberoni *et al.*, 2000; Dupont *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2006). Für die Adsorption und Injektion der Phagen-DNA können Zellwandkomponenten ausreichend sein (Geller *et al.*, 2005). Häufig werden jedoch als Rezeptoren der irreversiblen Adsorption Membranproteine benötigt, wie zum Beispiel das PIP („phage infection protein“) bei den *Lactococcus lactis*-Phagen der c2 Spezies (Geller *et al.*, 1993; Monteville *et al.*, 1994). Enzyme des Phagen, welche die Zellwand des Wirts lokal abbauen, können für die Infektion notwendig sein (Kenny *et al.*, 2004). Ist die Adsorption der Phagenpartikel abgeschlossen, kann die DNA des Phagen in einem energieabhängigen Prozess (Watanabe und Takesue, 1973) in die Zelle injiziert werden.

Für viele Phagen der Milchsäurebakterien, einschließlich für Phagen von *S. thermophilus*, ist die Anwesenheit von Ca^{2+} oder Mg^{2+} erforderlich (Watanabe und Takesue, 1972; Schouler *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass diese Ionen als Gegenionen während der DNA-Injektion benötigt werden (Alatossava *et al.*, 1987), oder dass ein Ca^{2+} abhängiger Zellrezeptor an der DNA-Injektion beteiligt ist (Kakita *et al.*, 1996; Geller *et al.*, 2005).

Lysogener und lytischer Zyklus

Je nach Phagentyp und physiologischen Bedingungen gibt es zwei Zyklen, die nach der DNA-Injektion ablaufen können. Im lysogenen Zyklus der temperenten Phagen wird das Genom des Phagen in das Wirtschromosom integriert. Dies geschieht durch homologe Rekombination über die so genannten *attP*-Stellen im Phagengenom bzw. *attB*-Stellen im Wirtsgenom.

Das integrierte Phagengenom der so genannten Prophagen wird zusammen mit dem Wirtschromosom repliziert. Prophagen sind in Laktokokken und Laktobacillen sehr häufig (Huggins und Sandine, 1977; Sechaud *et al.*, 1988; Jarvis, 1989), in *S. thermophilus* selten (Fayard *et al.*, 1993; Brüssow und Bruttin, 1995; Stanley *et al.*, 1997; Bruttin *et al.*, 1997b; Neve *et al.*, 2003). Ein Prophage kann durch Schädigung der Wirts-DNA und der damit verbundenen Aktivierung der SOS-Antwort, oder durch spontane Freisetzung in den lytischen Vermehrungszyklus einschwenken (Reyrolle *et al.*, 1982; Baldwin und McKay, 1987; Lillehaug und Birkeland, 1993; Christiansen *et al.*, 1994; Husson-Kao *et al.*, 2000). Im lytischen Zyklus, der sowohl von temperenten als auch lytischen Phagen durchlaufen werden kann, folgen nach der DNA-Injektion des Phagen bzw. der Induktion eines Prophagen im wesentlichen 4 Ereignisse: 1. der Abbau der Wirts-DNA, 2. die Replikation der Phagen-DNA, 2. Transkription und Translation der Phagen-Gene, 3. die Reifung der Phagenpartikel und 4. Lyse der Wirtszelle und die Freisetzung der Phagen. Die Latenzzeiten der Phagen der Milchsäurebakterien liegen zwischen 19 und 65 min, die „Burst size“ zwischen 2-400 infizierenden Phagen pro infizierter Zelle (Keogh, 1973; Lillehaug und Lindqvist, 1991; Moineau *et al.*, 1992; Beresford *et al.*, 1993; Madsen und Hammer, 1998; Tremblay und Moineau, 1999; Lu *et al.*, 2003). Auf die Verpackung der Phagen-DNA wird wegen ihrer Bedeutung für die Transduktion im Folgenden näher eingegangen. Mit der Lyse des Wirts und der Freisetzung der Phagenpartikel ist der Zyklus abgeschlossen.

Verpackung der Phagen-DNA in den Phagenkopf

Anhand der Enden der linearen Phagen-DNA werden die so genannte *cos*-Typ und *pac*-Typ Phagen unterschieden (im Folgenden als *pac*-Phagen bzw. *cos*-Phagen bezeichnet). Die lineare DNA der *pac*-Phagen ist charakterisiert durch das Auftreten von stumpfen DNA-Enden. Die Bezeichnung *cos*-Phage beruht auf dem

Vorhandensein von kohäsiven zueinander komplementären 3'- oder 5'-Nukleotidüberhängen. Der DNA-Verpackungsmechanismus der beiden Phagentypen ist unterschiedlich. Bei den *pac*-Phagen, wie zum Beispiel bei den *E. coli* Phagen P22 (Tye *et al.*, 1974), P1 (Sternberg und Coulby, 1987) und T1 (Ramsay und Ritchie, 1984), erfolgt die DNA-Verpackung beginnend an der so genannten *pac*-Sequenz direktional und prozessiv entlang eines Genom-Konkatemers. Der Abschluss erfolgt nach dem so genannten „Headfull“-Mechanismus. Bei diesem wird etwas mehr als eine Kopie des Phagengenoms in den Kopf verpackt, ohne dass für den Abschluss eine spezifische Sequenz erkannt wird. Dadurch entsteht ein terminal redundantes, permutiertes Genom. Bei *cos*-Phagen ist die *cos*-Region sowohl für den Start der Verpackung, als auch für die darauf folgenden Schnitte in der DNA von Bedeutung. Die Verpackung erfolgt prozessiv und direktional von der ersten *cos*-Region bis zur nächsten innerhalb des Konkatemers. Den Aufbau der *cos*-Region des Phagen Lambda zeigt Abb. 2. Charakteristisch für den Aufbau der *cos*-Region von Lambda und anderen Phagen ist das Vorkommen von direkten und indirekten Sequenzwiederholungen („direct“ und „indirect repeats“). Funktionell ist die *cos*-Region des Phagen Lambda in drei Bereiche aufgeteilt: *cosN* ist die Stelle, an der die DNA von einer Terminase geschnitten wird. *CosB* ist für die Zusammensetzung des Terminase-Enzymkomplexes und den Beginn der DNA-Verpackung von Bedeutung. Für darauf folgende Reaktionen wird sie nicht benötigt. Das „inverted repeat“ I2 scheint hier von geringerer Bedeutung zu sein, als das „repeat“ I1 und wird in anderen Darstellungen der Lambda *cos*-Region nicht zu *cosB* gezählt (Hohn, 1983; Feiss *et al.*, 1983; Cue und Feiss, 1993). *CosQ* wird für die nach der Initiation der DNA-Verpackung folgenden DNA-Schnitte benötigt (Hohn, 1983; Feiss *et al.*, 1983). Neben diesen beiden Typen der DNA-Verpackung gibt es weitere Mechanismen. Der Phage T4, der ein weitgehend permutiertes Genom besitzt, benutzt keine spezifischen Erkennungssequenzen, um seine DNA über den „Headfull“-Mechanismus zu verpacken (Streisinger *et al.*, 1967; Grossi *et al.*, 1983; Kalinski und Black, 1986). Andere Phagen verpacken keine DNA-Konkatemere sondern monomere DNA-Moleküle. Der *cos*-Typ Phage P2 nimmt zirkuläre monomere DNA-Moleküle zur Verpackung (Pruss und Calendar, 1978), Fi29 nimmt lineare DNA als Verpackungs-Substrat (Bjornsti *et al.*, 1983).

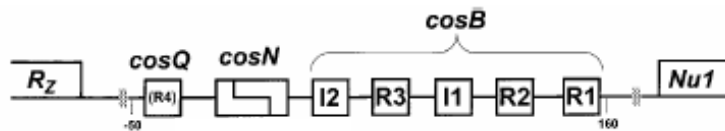


Abb. 2: Aufbau der *cos*-Region des Phagen Lambda (Catalano, 2000), R1-R3: direct repeats, I1-I2: inverted repeats. Die gezackte Linie in *cosN* gibt die Position der überhängenden Enden beim Schnitt an.

1.2.2. Die Bakteriophagen der Milchsäurebakterien

Alle bekannten Phagen der Milchsäurebakterien gehören zu der Ordnung der Caudovirales und zu der Gruppe der *Siphoviridae* mit isodiametrischen Köpfen (Kivi *et al.*, 1987; Neve *et al.*, 1989; Larbi *et al.*, 1990; Brüssow *et al.*, 1994; Neve *et al.*, 2003). Sie verfügen alle über doppelsträngige DNA. Alle *S. thermophilus*-Phagen bilden eine DNA-Homologiegruppe (Brüssow *et al.*, 1998). Aufgrund der geringen Diversität innerhalb der Gruppe und der genetischen Ähnlichkeiten werden *S. thermophilus*-Phagen auf zwei gemeinsame Vorfahren zurückgeführt, aus denen sie sich durch den Austausch von genetischen Modulen und Punktmutationen gebildet haben (Mercenier, 1990; Neve *et al.*, 1998; Lucchini *et al.*, 1999b). *S. thermophilus*-Phagen lassen sich in *cos*-Typ und *pac*-Typ Phagen einteilen, welche die Genera der Sfi11 und Sfi21 ähnlichen Phagen bilden (Lucchini *et al.*, 1999a; Brüssow und Desiere, 2001; Proux *et al.*, 2002). Serologische Methoden, DNA-Hybridisierungen und die Bestimmung der Wirtsspektren dienen zur feineren Klassifizierung der Phagen (Jarvis, 1977; Lembke und Teuber, 1981; Jarvis, 1984; Jarvis, 1989; Prevots *et al.*, 1990; Jarvis *et al.*, 1991). Eine Differenzierung in zwei bis drei Untergruppen erfolgt anhand der Proteinprofile und des Grades der DNA-Homologie (Neve *et al.*, 1989; Benbadis *et al.*, 1990; Brüssow *et al.*, 1994).

1.2.3. Bedeutung der Phagen für die Milchwirtschaft

Bei Fermentationsprozessen führt eine Infektion durch Phagen zu einer Verminderung oder gar einem kompletten Ausfall der Säuerung. Der daraus resultierende Verlust und die Kosten für die Entsorgung der nicht weiter verwertbaren Rohstoffe sind erheblich. Die Verwendung von phagenresistenten Starterkulturen ist deshalb von wirtschaftlicher Relevanz. Verschiedene Resistenzmechanismen wurden bei den Milchsäurebakterien beschrieben (Sanders, 1988; Klaenhammer und

Fitzgerald, 1994; Dinsmore und Klaenhammer, 1995; Moineau, 1999). Die Übertragung der Resistenz-Gene in wirtschaftlich relevante Stämme wurde zur Entwicklung phagenresistenter Starterstämmen genutzt. Plasmidkodierte Resistenzmechanismen sind z.B. die Maskierung von Phagenrezeptoren auf der Zelloberfläche (Sijtsma *et al.*, 1988; Sijtsma *et al.*, 1990; Lucey *et al.*, 1992), die Blockierung der DNA-Injektion (Garvey *et al.*, 1996) und Restriktions-/Modifikationssysteme (R/M-Systeme). R/M-Systeme sind bei *S. thermophilus* selten, können aber sowohl durch das Chromosom als auch durch Plasmide kodiert werden (Solaiman und Somkuti, 1990; Solaiman und Somkuti, 1991; Benbadis *et al.*, 1991; Guimont *et al.*, 1993; Burrus *et al.*, 2001; Solow und Somkuti, 2001; Geis *et al.*, 2003). Als eine Art letzte Instanz der Phagenabwehr dienen die so genannten Abi-Systeme (abortive Infektion). In *L. lactis* sind 20 verschiedene Abi-Systeme isoliert worden (Chopin *et al.*, 2005). Die Systeme greifen an verschiedenen Stadien der Phagenreplikation ein, z.B. bei der DNA-Replikation (Hill *et al.*, 1991; Jarvis und Bianchin, 1992; Emond *et al.*, 1997), der Transkription der Phagen-DNA (Parreira *et al.*, 1996a; O'Connor *et al.*, 1999) oder der Bildung der Phagenproteine (Moineau *et al.*, 1993). Weitere Resistenzmechanismen werden von Phagen kodiert, und werden deshalb als Per-Systeme bezeichnet („phage encoded resistance“). Beispiele hierfür sind „superinfection exclusion“-Mechanismen wie das Ltp des *S. thermophilus*-Phagen TP-J34 (Sun *et al.*, 2006) oder das Sie₂₀₀₉ aus dem *L. lactis*-Phagen Tuc2009 (McGrath *et al.*, 2002).

1.3. Methoden des DNA-Transfers

Für die Entwicklung phagenresistenter Starterstämmen ist der Transfer der Resistenzmechanismen in Starterstämmen von großem Nutzen. Bei Prokaryoten sind im wesentlichen drei Methoden für den DNA-Transfer von Bedeutung: 1. Transformation, 2. Konjugation und 3. Transduktion.

1.3.1. Transformation und Konjugation

Die Transformation ist die direkte Aufnahme von DNA durch eine hierzu befähigte (kompetente) Zelle. Manche *Bacillus subtilis*, (Dubnau, 1991), *Escherichia coli* (Baur *et al.*, 1996) oder *Leuconostoc carnosum* Stämme (Helmark *et al.*, 2004) verfügen über eine natürliche Kompetenz und können DNA ohne chemische oder

physikalische Behandlung aufnehmen. Auch in *Lactococcus* kommen Gene für natürliche Kompetenz vor, der Phänotyp der natürlichen Kompetenz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Transformation durch Elektroporation wurde weitgehend optimiert (Somkuti und Steinberg, 1988; Marciset und Mollet, 1993; McLaughlin und Ferretti, 1995; Holo und Nes, 1995; O'Sullivan und Fitzgerald, 1999; Helmark *et al.*, 2004). Es gibt allerdings in dieser Gruppe zahlreiche Stämme, die trotzdem nicht transformierbar sind.

Bei der Konjugation wird DNA durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt übertragen. Für *S. thermophilus* und *L. lactis* ist sowohl intra- als auch interspezifische Konjugation nachgewiesen, wie z.B. die Übertragung des Plasmids pAM β 1 (Gasson und Davies, 1980; Kleinschmidt *et al.*, 1993) oder der Gene des Laktoseabbaus (Gasson und Davies, 1980).

1.3.2. Transduktion

Transduktion bezeichnet die Übertragung der Wirts-DNA durch einen Phagen. Im allgemeinen werden zwei Typen der Transduktion unterschieden: die spezielle und die generelle Transduktion.

Spezielle Transduktion

Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit geschieht die Freisetzung eines Prophagen aus dem Wirtschromosom ungenau, so dass ein Teil der benachbarten Wirts-DNA mit ausgeschnitten und ein Teil des Phagengenoms zurückgelassen wird. Die ausgeschnittene DNA wird mit dem übrigen Teil des Phagengenoms repliziert und während der Maturation der Phagenpartikel in dieses eingebaut. Nach der Injektion in einen neuen Wirt kann durch homologe Rekombination oder die Integration des Prophagen die transportierte Wirts-DNA in das Chromosom eingebaut werden. Charakteristisch für die spezielle Transduktion ist, dass nur dem Prophagen benachbarte DNA-Sequenzen transduziert werden können. Je weiter die Sequenzen vom Genom des Prophagen entfernt sind, desto geringer ist die Transduktionshäufigkeit dieser Elemente. Ein klassischer Fall stellt die spezielle Transduktion des Phagen Lambda dar, bei der zunächst die Transduktion der *E. coli* Gene *gal* und *bio* beschrieben wurde (Feiss *et al.*, 1972; Charon *et al.*, 1980).

Generelle Transduktion

Die Übertragung von DNA durch spezielle Transduktion ist, wie oben definiert, auf einen Teil des Wirtschromosoms beschränkt. Die generelle Transduktion umfasst einen viel breiteren Bereich übertragbarer Wirts-DNA. Für den Phagen P22 können Sequenzabschnitte auf dem Wirtschromosom als Anfangspunkt der DNA-Verpackung dienen. Über den „Headfull“-Mechanismus werden sukzessiv Teile der Wirts-DNA verpackt, so dass verschiedenste Bereiche des Wirtschromosoms transduziert werden können (Ebel-Tsipis *et al.*, 1972a; Ebel-Tsipis *et al.*, 1972b). Über diesen Mechanismus können auch Plasmide übertragen werden (Mann und Slauch, 1997).

Generelle und spezielle Transduktion schließen sich nicht gegenseitig aus. Der Phage Lambda kann auch generelle Transduktion vermitteln (Sternberg, 1986), der P22 ebenfalls spezielle Transduktion (Hoppe und Roth, 1974).

Selektive Transduktion

Der Begriff der selektiven Transduktion lässt sich von der generellen und speziellen Transduktion nicht scharf abgrenzen. Während der Phage P22 über generelle Transduktion verschiedenste chromosomale Fragmente übertragen kann, führt eine Klonierung der *pac*-Stelle des Phagen in Plasmiden zu einer selektiven Transduktion mit hohen Übertragungshäufigkeiten (Schmidt und Schmieger, 1984). Wie weiter oben beschrieben, sind bei *cos*-Phagen für die Verpackung von DNA mehrere *cos*-Stellen im richtigen Abstand zueinander notwendig. Das führt dazu, dass ähnlich zur speziellen Transduktion nur spezifische Abschnitte des Wirts-Genoms verpackt werden können.

1.3.3. Transduktion bei Milchsäurebakterien

Transduktion in Milchsäurebakterien wurde als erstes für Laktokokken beschrieben (Sandine *et al.*, 1962; Allen *et al.*, 2006). Mit den *L. lactis*-Phagen Φ LC3 und sk1 (Birkeland und Holo, 1993; Chandry *et al.*, 2002) wurde selektive Transduktion über die Klonierung der *cos*-Stellen durchgeführt. In Transduktionen mit dem *Lactobacillus gasseri* Phagen adh wurden durch Klonierung verschiedener Bereiche der Phagen-DNA in Plasmide hohe Übertragungshäufigkeiten erzielt. Die Verpackung der Wirts-

DNA erfolgte dabei über die Bildung von Plasmid-Phagen-DNA-Chimären (Raya und Klaenhammer, 1992). Der *L. lactis-Phage c2* überträgt durch Transduktion von Plasmiden die Fähigkeit zur Laktosefermentation (McKay *et al.*, 1973). Wenn die Plasmide wesentlich größer als das Phagengenom sind, kommt es zu Deletionen in den übertragenden Plasmiden. Deletionen-tragende Plasmide lassen sich in weiteren Transduktionen mit wesentlich größeren Häufigkeiten übertragen (McKay *et al.*, 1976) und werden deshalb als Hft-Plasmide bezeichnet („high frequency of transduction“). Plasmidtransduktion in *S. thermophilus* kann mit hohen Transduktionshäufigkeiten durchgeführt werden (Mercenier *et al.*, 1988; Lefringhausen, 1996). Die Bildung von Hft-Plasmiden oder Homologien zu Phagengenomen in Plasmid-Sequenzen wurden nicht beobachtet.

1.4. „Novel-food“ und Gentechnik

Zur kommerziellen Nutzung der oben beschriebenen Verfahren ist der gezielte Transfer von DNA notwendig. Hierfür gibt es eine Reihe gut etablierter Methoden. Klassische Beispiele für gezielten Gentransfer sind Transformation, Konjugation und Transduktion (siehe Kapitel 1.3, S. 13). Ihnen ist gemeinsam, dass sie zur Detektion der Genübertragung auf die Anwendung von selektiven Markern angewiesen sind. Klassische Marker sind Antibiotikaresistenzen, die sich aufgrund der Gefahr einer spontanen Übertragung auf pathogene Erreger nicht für die breite Anwendung in der Lebensmittelindustrie eignen. Laut Artikel 4 der Verordnung Nr. 1829/2003/EG über gentechnisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel dürfen diese keine Gefahr für den Verbraucher darstellen. In diesem Sinne werden so genannte „food-grade“-Marker entwickelt, die gesundheitlich unbedenklich sind. Tab. 1 zeigt Beispiele für in *S. thermophilus* verwendbare „food-grade“-Marker.

Tab. 1: Beispiele für „food-grade“-Marker in *S. thermophilus*.

Marker	Referenz
Cadmium-Resistenz	Wong <i>et al.</i> , 2003
kleines Hitzeschockprotein (sHSP)	Demerdash <i>et al.</i> , 2003
CX-Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase (PepX)	Anastasiou <i>et al.</i> , 2002
Thymidylate-Synthetase	Sasaki <i>et al.</i> , 2004

Nach Artikel 2 der Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt gelten Organismen mit rekombinanten Plasmiden als GVOs (gentechnisch veränderter Organismen). Produkte, die GVOs enthalten, müssen nach Artikel 26 (1) 2001/18/EG eindeutig gekennzeichnet werden. Für die Einführung eines Produktes mit GVOs entstehen durch die laut 2001/18/EG und 1829/2003/EG verlangten Formalien hohe Kosten. Da in Europa GVO-haltige Produkte vom Kunden nicht akzeptiert werden, ist für die Wirtschaft die Verwendung gentechnikfreier Übertragungssysteme von großem Interesse. In strenger Auslegung des Artikels 2 2001/18/EG Anhang 1A gelten auch solche Organismen als GVOs, die mit Methoden der Gentechnik hergestellt, aber nicht von gentechnikfrei hergestellten Organismen (z.B. durch Mutagenese) unterscheidbar sind. In diesem Bereich fällt z.B. auch die Nutzung eines 2-Vektoren-Systems (Emond *et al.*, 2001; Demerdash H.A. *et al.*, 2006).

Transformation, Konjugation und Transduktion gelten als natürliche Vorgänge, vorausgesetzt es werden bei der Durchführung der Verfahren keine rekombinanten Nukleinsäuren verwendet. Die Nutzung dieser Methoden zur Übertragung nicht-rekombinanter DNA, wie z.B. nativer Plasmide, fällt nicht unter die Richtlinie 2001/18/EG. Produkte auf dieser Basis gelten als gentechnikfrei.

1.5. Ziele der Arbeit

Transduktion in *S. thermophilus* ist bisher wenig charakterisiert. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die molekularen und biologischen Grundlagen der beteiligten Prozesse zu beschreiben. Darauf aufbauend sollen Anwendungen entwickelt werden, die sich zum kommerziellen Einsatz in der Lebensmittelindustrie eignen, insbesondere im Feld der Phagenresistenz und des gezielten gentechnikfreien DNA-Transfers. Die Übertragung der Plasmid-DNA mit *cos*-Phagen dient hier als Modell.

2. Material und Methoden

2.1. Kulturmedien und Lösungen

Die Medien wurden mit zweifach entionisiertem Wasser (aqua bidest.) angesetzt (SG Reinstwasser-System Clear) und, sofern nicht anders vermerkt, für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Unterschichtagar wurden den Lösungen 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Antibiotika wurden den Medien nach Autoklavieren hinzugefügt.

2.1.1. Nährmedien

Medien für *L. lactis* und *S. thermophilus*

GM17 bzw. LM17-Medium (Terzaghi und Sandine, 1975)
5 g Phyton-Pepton
5 g Poly-Pepton
2,5 g Hefeextrakt
5 g Fleischextrakt
5 g Glukose bzw. Laktose
0,5 g Ascorbinsäure
19,0 g Dinatrium-β-Glycero- Phosphat
0,25 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 ml 1 M CaCl ₂
ad 1 l mit aqua bidest

thLM17-Medium (Krusch <i>et al.</i> , 1987)
5 g wie LM17 mit 9,5 g Dinatrium-β-Glycero- Phosphat

Zuckerlösung für Unterschichtagar
5 g Laktose bzw. Glukose
10 ml 1 M CaCl ₂
ad 60 ml mit aqua bidest.

Die Angaben gelten für Flüssigmedien. Für die Herstellung von Unterschichtagar erfolgte die Zugabe von CaCl₂ und Laktose bzw. Glukose erst nach dem Autoklaviervorgang in einer separaten autoklavierten Lösung (Zuckerlösung für Unterschichtagar).

Für die Herstellung von Glycin-Unterschichtagar wurde der Agar (1% Agar) durch Erhitzen in der Mikrowelle (600 Watt, 5 bis 10 min) in thLM17-Medium gelöst und in Petrischalen gegossen. Die eingesetzte Glycinkonzentration richtete sich nach dem verwendeten Stamm.

Material und Methoden

Belliker-Medium (McLaughlin und Ferretti, 1995)
20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
2,5 g Gelatine
2,5 g Dextrose
5 g Saccharose
5 g Laktose
0,5 g Ascorbinsäure
10 g Fleischextrakt
ad 1 l mit aqua bidest.

HJL-Medium (McLaughlin und Ferretti, 1995)
30 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g KH ₂ PO ₄
2 g Fleischextrakt
5 g Laktose
pH 6,5
ad 1 l mit aqua bidest.

Magermilch
100 g Magermilchpulver
ad 1 l mit aqua bidest.

Lackmusmilch
100 g Magermilchpulver
70 ml Kubel-Thiemanns- Lackmuslösung
ad 1 l mit aqua bidest.

Das Magermilchpulver wurde durch Kochen gelöst und die Lösung bei 100°C tyndalisiert.

Stammlösung für Glycin- Weichagar (mod. nach Lillehaug, 1997)
1,2 g Phyton-Pepton
1,2 g Poly-Pepton
1 g Hefeextrakt
1,65 g Fleischextrakt
1,2 g Caseinhydrolysat
0,2 g Ascorbinsäure
6,35 g Na ₂ -β- Glycerophosphat
0,65 ml 1 M MgSO ₄
ad 500 ml mit aqua bidest.

Glycin-Weichagar (mod. nach Lillehaug, 1997)
0,8 g Ellikerbroth
0,15 g Agar-Agar
50 ml Stammlösung

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert (0,45 µm, Sartorius Minisart®) abgefüllt und bis zur Verwendung bei 50°C gelagert.

Material und Methoden

Glycin-Unterschichtagar (mod. nach Lillehaug, 1997)	
1,2 g	Phyton-Pepton
1,2 g	Poly-Pepton
1 g	Hefeextrakt
1,65 g	Fleischextrakt
1,2 g	Caseinhydrolysat
0,2 g	Ascorbinsäure
6,35 g	Dinatrium-β-Glycerophosphat
0,65 ml	1 M MgSO ₄
ad 500 ml mit aqua bidest.	

SGM17 + 1% Glycin (Holo und Nes, 1995)	
171,2 g	Saccharose
10 g	Glycin
ad 1 l mit GM17-Medium.	

0,1 bis 1,0% Glycin wurden hinzugefügt (abhängig vom verwendeten Stamm). Die Lösung wurde in der Mikrowelle bei 600 Watt für 5 min gelöst und in Aliquots von 2,5 ml abgefüllt.

Medien für *E. coli*

SOB-Medium (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)	
20 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
0,5 g	NaCl
10 ml	0,25 M KCl
	pH 7,0
ad 1 l mit aqua bidest.	

SOC-Medium (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)	
100 ml	SOB-Medium
2 ml	1 M Glukose

Nach dem Autoklavieren wurden 5 ml einer sterilen 2 M MgCl₂ hinzugefügt.

2.2. Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden Lösungen von Zuckern und Salzen in aqua bidest. hergestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Tris-HCl-Puffer und EDTA-Lösungen wurden den Medien und Puffern aus Stammlösungen zugefügt.

Antibiotika	
50 mg/ml Ampicillin	10 mg/ml Erythromycin
50 mg/ml Kanamycin	10 mg/ml Chloramphenicol
in aqua bidest.	in 98% Ethanol

Die Sterilisation der Antibiotika-Lösungen erfolgte durch Sterilfiltration (Satorius Minisart®).

2.2.1. Lösungen und Puffer für Transduktion und Transformation

Transduktionspuffer (McLaughlin und Ferretti, 1995)
10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Phagenverdünnungslösung
110 ml LM17-Bouillion 1 l Ringerlösung

Elektroporationspuffer (Holo und Nes, 1995; Maniatis <i>et al.</i> , 2000)
171,15 g Saccharose 115 ml 87% Glycerin ad 1 l mit aqua bidest.

EPM-Nährlösung (Marciset und Mollet, 1993)
5 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM MgCl ₂ 0,3 M Raffinose pH 6,1

Glycin-SGM17 (Holo und Nes, 1995)
171,2 g Saccharose 10 g Glycin ad 1 l mit GM17-Medium.

2.2.2. DNA-Extraktion und Analyse

TE-Puffer (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)
10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

Tris-SM-Puffer (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)
50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 100 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O

50x TAE-Stammlösung (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)
40 mM Tris-HCl 0,5 M EDTA 5,7% Essig pH 8,0 einstellen.

6x DNA-Auftragspuffer (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)
0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 15% Ficoll

Phagen-Dialysepuffer (Maniatis <i>et al.</i> , 2000)
2,9 g NaCl 30,3 g Tris 10,2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O pH 8,0 ad 1 l mit aqua bidest.

Extraktionspuffer für Zellextrakte (Su <i>et al.</i> , 1999)
50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 20 mM MgCl ₂ 100 mM EDTA 10 mM β-Mercaptoethanol

Material und Methoden

Puffer 1 (10x)
1 M Maleinsäure 1,5 M NaCl pH 7,5 einstellen.

Puffer 3
1 M Tris-HCl (pH 9,5) 1 M NaCl

20xSSC
3 M NaCl 0,3 M NaCitrat pH 7,0 einstellen.

Denaturierungslösung
1,5 M NaCl 0,5 M NaOH

Sonden-Waschpuffer
0,2 M NaOH 0,1% SDS

Blotting-Puffer
0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) 2x SSC

Waschpuffer
1000 ml Puffer 1 3 ml Tween20

Puffer 2
50 ml Blocking solution 50 ml Puffer 1

Blocking solution
50 g Blocking-Powder 450 ml 1x Puffer 1 unter Rühren bei 70°C lösen.

TBS-Puffer
50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl

2.3. Bakterienkulturen

2.3.1. Bereitstellung der Kulturen

Soweit nicht anders angegeben wurden tiefgefrorene Kulturen für *S. thermophilus* und *L. lactis* auf thLM17-Agar bzw. LM17-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation bei 40°C bzw. 30°C wurden Einzelkolonien in Lackmusmilch überimpft, für 2 bis 6 h bei gleicher Temperatur inkubiert und 1:100 in thLM17 bzw. LM17 verdünnt. Die anschließende Inkubation bei 40°C bzw. 30°C erfolgte über 16-20 h bis zur stationären Phase. Für die Anzucht von Stämmen mit Antibiotikaresistenz enthielten alle Nährmedien die entsprechenden Antibiotika.

2.3.2. Wachstumsversuche zur Überprüfung der Hitzeresistenz

S. thermophilus-Kulturen in der stationären Phase wurden 1:100 in 5 ml auf 42°C vorgewärmten thLM17-Medium verdünnt und im Wasserbad bei 42°C bis zu einer OD_{620nm} von 0,05 bis 0,1 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in Wasserbäder mit höheren Temperaturen überführt und weiter inkubiert. In regelmäßigen zeitlichen Abständen wurde die OD_{620nm} bestimmt.

2.3.3. Bestimmung der Überlebensrate für *S. thermophilus* a10 bei hohen Inkubationstemperaturen und Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten

Übernachtskulturen für *S. thermophilus* a10 wurden 1:100 in thLM17-Medium verdünnt und bei 42°C bis zu einer OD_{620nm} von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Die Kulturen wurde in zwei Aliquots aufgeteilt und bei 42°C bzw. bei 45,5°C für 30 min inkubiert. Durch Zentrifugation und zweimaligem Resuspendieren in ¼-starke Ringerlösung erfolgte eine Waschung der Kulturen. Schließlich wurden sie in thLM17-Medium resuspendiert und bei 60°C für 1,5 h inkubiert. Nach Probenentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Keimzahlbestimmung.

Für die Bestimmung der Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten wurden Übernachtskulturen von *S. thermophilus* 1:100 in thLM17-Medium verdünnt und bei 42°C bis zu einer OD_{620nm} von 0,5 bis 0,6 (logarithmische Phase) bzw. 1,2 bis 2,8 (spätlogarithmische bzw. stationäre Phase) inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden aus 1 ml Kultur die Zellen durch Zentrifugation geerntet (7000 upm, 4°C, 5 min, Eppendorf Tischzentrifuge) und in 1 ml Belliker-Medium (ohne Laktose, pH 4,0) resuspendiert. Der weitere Versuchsablauf geschah folgendermaßen: 1. 30-min Inkubation bei Raumtemperatur, 2. erneutes Ernten der Zellen und Resuspendierung in 1 ml Belliker-Medium (ohne Laktose, pH 3,5), 3. 30-min Inkubation bei Raumtemperatur. Parallel wurde ein Ansatz durchgeführt, bei denen ein pH-Wert von 6,1 verwendet wurde.

2.4. Versuche mit Phagen

2.4.1. Isolierung der Phagen aus Einzelplaques

Pro Ansatz wurden 2 bis 3 Einzelplaques mit einer Impföse ausgestochen und in 0,5 ml thLM17-Medium, versetzt mit 0,1 ml 40 mM CaCl₂ und 0,1 ml Magermilch, resuspendiert. Auf einem Vortexschüttler wurden die Ansätze für 10 s kräftig durchmischt. Nach Zugabe von 0,3 ml einer Übernachtskultur von *S. thermophilus* wurden die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 5 ml 40°C warmen thLM17-Medium verdünnt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 40°C. Nach Eintreten der Lyse wurden die Ansätze sterilfiltriert.

2.4.2. Bestimmung der Phagenkonzentration in Lysaten (Lillehaug, 1997)

Phagenlysate wurden in Phagenverdünnungspuffer verdünnt. Für die Plaque-Tests wurden 0,1 ml Verdünnung zu 0,1 ml 40 mM CaCl₂-Lösung und 0,3 ml einer *S. thermophilus*-Kultur (späte logarithmische Phase) gegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0,1 ml Magermilch und 2,5 ml Glycin-Weichagar auf Glycin-thLM17-Agarplatten aufgetragen.

Für Spot-Tests wurden 0,1 ml 40 mM CaCl₂, 0,3 ml Kultur und 2,5 ml Glycin-Weichagar gemischt und auf Glycin-thLM17-Agarplatten übertragen. 10 bis 30 µl Phagenverdünnung wurden auf die Platten aufgetragen.

Die Konzentration an Glycin richtete sich nach dem verwendeten Wirtsstamm. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 40 °C für 16 bis 20 h.

2.4.3. Herstellung der Phagenlysate

100 µl Übernachtskultur eines *S. thermophilus*-Stammes wurden in Anwesenheit von 10 mM CaCl₂ mit Lysat des jeweiligen Phagen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (M.O.I. 10⁻⁴ bis 10¹). Nach Zugabe von 10 ml auf 40 °C vorgewärmtes thLM17-Medium wurden die Ansätze bis zur Lyse der Zellen bei 40 °C bebrütet. Durch Verwendung geeigneter Phagenkonzentrationen setzte die Lyse der Kulturen bei einer OD_{620 nm} von 0,5 bis 0,9 ein. Bei früherer Lyse (OD_{620 nm} < 0,2) wurde dem Lysat wiederholt 1 ml einer frischen Kultur (OD_{620 nm} zwischen 0,5 und 0,9) zugegeben und wie vorher weiter inkubiert. Nach Lagerung bei 4 °C für 12 bis 16 h erfolgte abschließend eine Sterilfiltration (0,45 µm, Sartorius Minisart®).

Für die Herstellung von Lysaten in größeren Volumina, wurden die eingesetzten Mengen an Kultur, Lysat und Medien entsprechend erhöht.

Für die Herstellung von Lysaten mit dem Phagen a10/J9 aus *S. thermophilus* a10 wurde eine Kultur mit einer OD_{620 nm} zwischen 0,1 und 0,2 anstelle einer Übernachtskultur verwendet.

2.4.4. Konzentrierung der Phagenlysate (Brown et al., 1994)

Sterilfiltrierte Phagenlysate wurden mit je 2 mg/ml DNase und RNase bei 37 °C für 2 h inkubiert und anschließend erneut sterilfiltriert (0,45 µm, Sartorius Minisart®). Die Phagenpartikel wurden durch Zentrifugation (1 h bei 4 °C, 9500 upm, JA-10 Rotor,

Beckman Zentrifuge Model J2-21) sedimentiert und in 1 ml TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

2.4.5. Phagen-Inaktivierung durch UV-Licht

Lysate wurden gegen das 100fache Volumen an Transduktionspuffer oder SM-Puffer für 30 bis 60 min auf Millipore Filtern (Typ VS, 0,025 µm) dialysiert. Die Inaktivierung erfolgte durch UV-Licht Bestrahlung auf einem mit Lysat benetzten Becherglasboden (Ernst Schütt Jun. UV-Bestrahlungslampe, 254 nm). Der Abstand des Becherglasbodens zur UV-Lampe betrug 10 cm.

2.4.6. Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht

Eine *S. thermophilus*-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{620\text{ nm}}$ zwischen 0,5 bis 0,55) oder die Zellen aus einem Transduktionsansatz (siehe Kapitel 2.4.7, S. 26) wurde durch Zentrifugation geerntet (10 min bei 4°C, 7000 upm, JA-20 Rotor, Beckman Zentrifuge Model J2-21) und in 2 ml bzw. 1 ml 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert. Die Bestrahlung mit UV-Licht (Ernst Schütt Jun. UV-Bestrahlungslampe, 254 nm) erfolgte in einer Quarzglaskapillare mit einem Abstand von 10 cm zur UV-Lichtquelle. Zellen aus Transduktionsansätzen (siehe Kapitel 2.4.7, S. 26) wurden nach der Bestrahlung erneut zentrifugiert und in 2 ml thLM17 (40 mM Trinatriumcitrat) gelöst.

2.4.7. Transduktion mit *S. thermophilus*-Phagen (Mercenier et al., 1988)

S. thermophilus Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{620\text{ nm}}$ zwischen 0,5 und 0,55) wurden geerntet (10 min bei 4°C, 7000 upm, JA-20 Rotor, Beckman Zentrifuge Model J2-21), in eiskaltem 10 mM $MgSO_4$ fünffach konzentriert und bis zur Transduktion auf Eis gelagert. Unverdünntes oder in Transduktionspuffer verdünntes Phagenlysat wurde zu 0,3 ml Zellsuspension gegeben und mit thLM17-Medium auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt.

Die Adsorption der Phagen an die Zellen erfolgte bei 42°C und wurde auf Eis durch die Zugabe von 1 ml thLM17, versetzt mit einer der doppelten $CaCl_2$ -Konzentration entsprechenden Menge an Trinatriumcitrat, gestoppt. Nach einer weiteren Inkubation der Ansätze bei 42°C, wurden die Ansätze mit 3 ml Weichagar oder in geeigneten Verdünnungen auf thLM17-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) aufgetragen. Die Parameter $CaCl_2$ -Konzentration (10 mM bis 100 mM),

Adsorptionszeit (0 min bis 60 min), Expressionszeit (0 min bis 70 min) sowie die eingesetzte Zell- und Phagenkonzentration (M.O.I. zwischen 10^{-3} und 10) wurden in den verschiedenen Versuchen, wie dort beschrieben, individuell eingestellt. Für den Vergleich der Transduktionshäufigkeit verschiedener Plasmide wurden Transduktionen mit einer Phagenkonzentration entsprechend einer M.O.I. von 0,001 bis 0,1 wie folgt durchgeführt: 10 mM CaCl_2 , 10 min Adsorption und 50 min Expressionszeit bei 42 °C.

2.4.8. Zellvereinzelung in *S. thermophilus*-Kulturen durch Ultraschall

S. thermophilus-Kulturen wurden wie in 2.4.7 beschrieben geerntet, in 10 mM MgSO_4 resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Vereinzelung durch Ultraschall erfolgte mit dem Labsonic 2000, B. Braun (höchste Einstellung). Die Suspension wurde auf Eis für 20 s beschallt, dann für 30 s auf Eis inkubiert und schließlich für 15 s beschallt. Die Vereinzelung wurde im Lichtmikroskop überprüft. Bei Bedarf wurde erneut für 15 s beschallt.

2.4.9. Adsorptionstests mit Phagen

Zu 600 μl thLM17 (versetzt 10 mM CaCl_2) und 300 μl Zellsuspension in 10 mM MgSO_4 (siehe Kapitel 2.4.7, S. 26) wurden 100 μl Phagenverdünnung (in Transduktionspuffer, M.O.I. zwischen 0,1 bis 1,0) gegeben. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 300 μl 10 mM MgSO_4 ohne Zellen. Die Adsorption der Phagenpartikel erfolgte bei 42 °C. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, 1:10 in eiskalter 1/4-starker Ringerlösung (versetzt mit 1 M NaCl) verdünnt und für 10 s mit einem Vortexschüttler durchmischt. Nach einer Inkubation über 20 bis 30 min auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 7 min, 7000 upm, Eppendorf Zentrifuge 5417R) sedimentiert. Zur Bestimmung der Phagenkonzentration in den Überständen dienten „Spot-Tests“.

2.4.10. „One-Step-Growth“-Experimente

10 ml einer *S. thermophilus*-Kultur in der mittleren log-Phase ($\text{OD}_{620 \text{ nm}}$ zwischen 0,5 und 0,55) wurden geerntet (10 min bei 4 °C, 7000 upm, JA-20 Rotor, Beckman Zentrifuge Model J2-21) und in 1 ml eiskalter thLM17 (10 mM CaCl_2) resuspendiert. Hierzu wurde gegenüber der Keimzahl das 0,1- bis 10fache an Phagen (Plaque bildende Einheiten) hinzugegeben (M.O.I. 0,1 bis 10). Nach Adsorption bei 40 °C für

10 min wurden die Ansätze zweimal um den Faktor 100 und abschließend um den Faktor 10 in vorgewärmtem thLM17-Medium verdünnt und bei 40 °C weiter inkubiert. Zur Bestimmung der Phagenkonzentration der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben dienten Plaque-Tests.

2.5. DNA Analyse und Modifikation

2.5.1. Agarosegelelektrophorese (Maniatis et al., 2000)

Für die Analyse von DNA wurden Agarosegele (10 cm x 7 cm) für Elektrophoresen mit 1xTAE Puffer hergestellt. Die eingesetzte Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der zu analysierenden DNA Fragmente. Die DNA-Proben wurden mit 1x DNA-Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen.

Der Lauf erfolgte in 1xTAE Puffer bei folgenden Bedingungen (Power Supply Modell 1000/550, Bio-Rad): 5 min bei 60 V (Vorlauf ohne Proben), 1 bis 2 h min bei 70-80 V. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Färben der Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) für 20 bis 45 min. Nach dem Entfärben des Gels in aqua bidest. für 20 min wurde das Gel unter UV-Licht (302 nm; Fluo Link, Biometra) fotografiert.

2.5.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen erfolgte über den Vergleich mit definierten DNA-Standards mittels Agarosegelelektrophorese. Als DNA-Standard diente der „Molecular Weight Marker II“ von Roche.

2.5.3. Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolfällung (Maniatis et al., 2000)

Die Reinigung von DNA erfolgte durch Ausschütteln der Proteinfraction mit Phenol/Chloroform in drei Schritten. Ausschütteln mit 1. Phenol, 2. Phenol/Chloroform (1:1) und 3. Chloroform. Die organische Phase wurde jeweils im gleichen Volumen zur wässrigen Phase gegeben.

Die anschließende Fällung von DNA wurde mit Ethanol (Plasmid-DNA) oder Isopropanol (Phagen-DNA, Gesamt-DNA) durchgeführt.

Nach der Zugabe von Ethanol bzw. Isopropanol wurden die Ansätze bei –20 °C für 30 bis 60 min inkubiert. Das Waschen und sedimentieren der DNA erfolgte bei 4 °C (20 min bei 14000 upm, Eppendorf Zentrifuge 5417R). Das luftgetrocknete Sediment (5

bis 10 min) wurde mit aqua bidest. oder mit 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) resuspendiert.

2.5.4. Isolierung der Plasmid-DNA

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* Übernachtskulturen wurde das „NucleoSpin[®]-Plasmid“ Kit verwendet.

Ein modifiziertes Protokoll diente zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *S. thermophilus* und *L. lactis* Übernachtskulturen. Hierzu wurden die resuspendierten Zellen vor der alkalischen Lyse mit 5 mg/ml Lysozym (+ 50 U Mutanolysin für *S. thermophilus*) für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation des Lysats (alkalische Lyse) wurde der Überstand mit 2,5 mg/ml Proteinase K bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung durch Phenol/Chloroform (1:1)-Extraktion. Die wässrige Phase wurde durch das „NucleoSpin[®]-Plasmid“ Kit weiter aufbereitet.

2.5.5. Isolierung der Phagen-DNA (Maniatis et al., 2000)

1 l Phagenlysate (siehe Kapitel 2.4.3, S. 25) wurde mit je 1 µg/ml DNase und RNase bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Ablösung der Phagenpartikel durch Zelltrümmer erfolgte durch Zugabe von 1 M NaCl und Lagerung des Lysats bei 4°C für 18 bis 20 h. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min bei 7000 upm, Rotor JA-10, Beckman Zentrifuge Model J2-21) wurde dem Überstand 10%ig PEG 6000 hinzu gegeben. Nach einer Inkubation bei 4°C für 1 bis 2 h wurden die Phagenpartikel durch Zentrifugation (20 min, 10000 upm, Rotor JA-10, Beckman Zentrifuge Model J2-21) sedimentiert und in SM-Puffer resuspendiert. Zur Reinigung der Phagenpartikel diente die isopyknische Zentrifugation im CsCl-Gradienten (16 h bei 20000 upm und 10°C, SW32Ti-Rotor, Beckman Ultra-Zentrifuge L5-65 B). Die Lagerung der gereinigten Phagenlösung erfolgte bei 4°C.

Vor dem DNA-Aufschluss wurde das gereinigte Lysat zweimal (1 h bei Raumtemperatur) gegen das 1000fache Volumen an Dialysepuffer I dialysiert. Nach Zugabe von 20 mM EDTA (pH 8,0) und 0,5% SDS wurde das Lysat für 1 h bei 56°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform Reinigung (siehe Kapitel 2.5.3, S. 28) erfolgte eine dreifache Dialyse für 16 h bei 4°C gegen das 1000fache Volumen an TE-Puffer (pH 8,0). Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.5.6. Restriktionshydrolysen

Restriktionsenzyme der Firmen Eurogentec, Fermentas und NewEnglandBiolabs wurden im zugehörigen 1x Reaktionspuffer durchgeführt. Für die Restriktionshydrolyse der Plasmid-DNA aus *E. coli* und Phagen-DNA wurde mindestens 2 U Enzym für 1 µg DNA eingesetzt, für die Hydrolyse der DNA aus *L. lactis* und *S. thermophilus* wurden mindestens 5 U Enzym für 1 µg DNA verwendet. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Restriktionshydrolysen bei 37°C für 2-3 h.

2.5.7. Herstellung der Zell-Rohextrakte

20 ml einer *S. thermophilus*-Kultur wurden bei 42°C bis zu einer OD_{620nm} von 0,6 bis 0,8 inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet (4°C, 7000 upm, für 10 min, JA-20 Rotor, Beckman Zentrifuge Model J2-21). Nach zweimaliger Waschung in 2 ml Extraktionspuffer wurde das Zellsediment in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Zelmühle (FP120, Savant Instrument, Einstellung 6,5) mit 1 g Glasperlen (Ø 0,1 mm, B. Braun Biotech International GmbH) mit 5 Wiederholungen für 30 s. Zwischen den einzelnen Schritten wurde für 1 min auf Eis gekühlt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5 min bei 4°C, 14000 upm, Eppendorf Tischzentrifuge) entfernt. Streptomycinsulfat wurde 1%ig (wt/vol) zum Überstand gegeben, der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert und abschließend zentrifugiert (5 min bei 4°C, 14000 upm, Eppendorf Tischzentrifuge). Die Lagerung der Überstände erfolgte bei -20°C.

2.5.8. Inkubation der DNA mit Zellextrakten aus *S. thermophilus*

0,05 bis 0,5 µg DNA wurden mit 10 µl Zellextrakt aus 2.5.7 bei 37°C und 42°C inkubiert. Als Reaktionspuffer dienten Restriktionspuffer der Firma Fermentas.

2.5.9. Identifizierung der *cos*-Stellen in Phagengenomen

Phagen-DNA aus Restriktionshydrolysen wurde für 15 min bei 70°C erhitzt, anschließend auf Eis für 2 min abgekühlt und sofort in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

2.5.10. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde mit dem „Gel-Extraction-Kit“ von Qiagen durchgeführt. Die DNA wurde abschließend in 50 µl oder 20 µl TE-Puffer oder aqua bidest gelöst.

2.5.11. Mikrodialyse (Maniatis et al., 2000)

Bis zu 50 µl DNA-Lösung wurden für 10 bis 20 min gegen 10 ml aqua bidest. auf Millipore Filtern (Typ VS, 0,025 µm) durchgeführt.

2.5.12. Ligationsreaktionen

Vor der Ligation wurde die DNA einer Mikrodialyse unterzogen (siehe Kapitel 2.5.11, S. 31). Die Reaktion wurde mit 50 bis 100 ng Vektor-DNA und der ein- bis vierfachen molaren Menge an Insert-DNA durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 bis 6 h. Die verwendete Enzymkonzentration (Fermentas) im Ansatz betrug für DNA mit kohäsiven Enden 0,1 Weiss Units/µl bzw. für DNA mit „stumpfen“ Enden 0,5 Weiss Units/µl. Für die Ligation mit „stumpfen“ DNA Fragmenten wurde dem Reaktionsansatz 5% PEG 4000 hinzugefügt.

2.5.13. DNA-DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

Die Hybridisierungen wurden nach Angabe des Herstellers durchgeführt (Roche).

Sondenmarkierung

Zur Markierung der DNA durch „Random Priming“ diente das „DIG DNA Labeling Kit“ (Roche). Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 37°C für 10 bis 24 h. Die Reaktion wurde durch 20 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt und nicht eingebaute Nukleotide durch Fällung der markierten DNA mit LiCl und Ethanol nach Herstellerangaben entfernt.

Die Konzentration an DIG-markierter Sonden-DNA wurde durch Spot-Test bestimmt. Hierzu wurden Verdünnungen der DNA auf eine Nylon-Membran (Nylon 66 auf Polyestermatrix, Porengröße 0,45 µm, hydrophil mit positivem Zelloberflächenpotential, Roche) „gespottet“. Die Visualisierung der Markierung erfolgte nach dem verkürzten Detektionsprotokoll (Roche, 1995).

Inaktivierung der Restriktionsenzymen durch Hitze

Vor Southern-Blots wurden Restriktionsenzyme durch Hitze inaktiviert. Dieses erfolgte für 20 min bei 65 °C.

Southern-Blot

Die Agarosegele wurden für 5 min bei leichtem Schütteln in 250 mM HCl inkubiert. Nach kurzer Waschung in aqua bidest. wurde das Gel bei Raumtemperatur zweimal für 15 min in Denaturierungs-Lösung inkubiert. Nach erneuter Waschung in aqua bidest. erfolgte anschließend eine Inkubation in Neutralisierungs-Lösung unter gleichen Bedingungen.

Die Übertragung der DNA auf eine Nylon-Membran (positiv geladen, Roche) über das „Kapillar-Blotting“ Verfahren erfolgte für 12-16 h mit 20xSSC-Puffer.

Kolonie-Blot

Verdünnungen der *S. thermophilus*-Kulturen wurden auf thLM17-Agarplatten ausgespatelt und für 12 bis 19 h bei 40 °C bebrütet. Die Kolonien wurden auf sterile Nytran® N-Rundmembranen (Porengröße 0,45 µm, Schleicher & Schuell) übertragen. Die Membranen wurden bei Raumtemperatur für 5 min mit der Kolonieseite Seite nach oben auf zwei Lagen mit Denaturierungslösung gesättigtem Whatman-Paper (GB002) inkubiert. Die gleiche Prozedur wurde mit 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und anschließend mit Blotting-Puffer durchgeführt. Nach der Fixierung der DNA durch Inkubation bei 80 °C für 1 h wurden die Membranen in 1xTBS-Puffer getränkt und Rückstände von Kolonien mit einem weichem Cellulosepapier und 1xTBS-Puffer von der Membran entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran bei 37 °C mit 1xTBS-Puffer und 200 µg/ml Proteinase K. Die Membran wurde in 1x TBS-Puffer für 5 min gewaschen. Die getrockneten Membranen wurden bis zur Hybridisierung bei –20 °C eingefroren.

Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte nach dem Protokoll von Roche (1995).

Die eingesetzte Konzentration an markierter denaturierter Sonden-DNA betrug für Southern-Blots 10 bis 20 ng/ ml, für Kolonie-Blots 20-40 ng/ml. Die Hybridisierung erfolgte im „DIG-EasyHyb“-Puffer bei 42 °C für 15 bis 18 h.

Die Detektion wurde ohne Modifizierung nach dem Chemolumineszenzverfahren von Roche durchgeführt. Zur Visualisierung wurde die markierte Membran auf einen Röntgenfilm (Medical X-Ray Film, Fuji) für 2 bis 16 h aufgelegt.

Präparation der Membranen für eine zweite Hybridisierung

Um Membranen in einer zweiten Hybridisierung einzusetzen, wurden sie für eine Minute in aqua bidest. gewaschen. Die markierte Sonde wurde durch zweimaliges Waschen mit Sonden-Waschpuffer bei 37°C für jeweils 10 min entfernt und anschließend in 2xSSC neutralisiert. Damit war die Membran für eine weitere Hybridisierung verwendbar.

2.5.14. PCR

Die Amplifizierung der DNA zu Nachweiszwecken wurde mit dem 2xPCR Master Mix (Fermentas) durchgeführt. Zur Klonierung der *cos*-Region des Phagen P53 wurde der „High Fidelity Enzym Mix“ (Fermentas) mit 15 mM MgCl₂ verwendet.

Die optimale Menge an Ausgangs-DNA wurde experimentell ermittelt. Die für die Amplifizierung eingesetzten Primer zur Klonierung der *cos*-Region von P53 sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die Konzentration der Primer im PCR Ansatz betrug 0,1 bis 1 µM.

Tab. 2: PCR-Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P53Fwd	TTT GAA TTC ACC CGT TGA AAT AGC TCC
P53Rev	TTT GAA TTC TGC CGT TTT CTT TTA TGT CC

Tab. 3: Programm für die PCR im Mastercycler 5330 (Eppendorf).

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	30
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72 °C	1,5 min	
Denaturierung	94°C	90 s	1
Annealing	55°C	30 s	
Elongation	72°C	5 min	

2.5.15. DNA-Sequenzierung

Ungefähr 1 µg DNA wurde in 20 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) gelöst und durch die Firma MWG-Biotech sequenziert. Zu sequenzierende PCR-Produkte wurden durch das „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen) gereinigt.

Die DNA für die Ermittlung des Überhanges der *cos*-Stelle wurde mit Ethanol gefällt (siehe Kapitel 2.5.3, S. 28) und im ungelösten Zustand verschickt. Die verwendeten Primer der Sequenzierungen sind in Tab. 4 zusammengefasst. Für Sequenzierungen der Inserts im Klonierungsvektor pBluescriptII SK+ (, 2000) siehe Tabelle dienten T3- und T7-Promotor-Primer.

Tab. 4: Sequenzierungs-Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
SP53Fwd	ACC CGT TGA AAT AGC TCC AG
SP53Rev	TGC CGT TTT CTT TTA TGT CC

2.5.16. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte in einem 1,1%-igem Agarosegel (Typ II Agarose, Biorad, in 0,5x TBE-Puffer). Die aufgetragene DNA wurde mit 10 bis 50 µl 0,8%ige Low-Melt-Agarose (Biorad) überschichtet. Die Elektrophorese wurde über 16 h in 0,5x TBE-Puffer bei 14 °C, 175 V und einer Pulszeit von 2 s durchgeführt (Chef-DRII „pulse-field“ Gelelektrophoreseanlage und Model 1000 „Mini Chiller“, Bio-Rad).

2.6. Klonierungen

2.6.1. Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* (Hanahan et al., 1991)

200 ml SOB-Medium wurden 1%ig mit einer *E. coli* Kultur beimpft und unter Schütteln (180 upm, „Swip“ Edmund Bühler) bei 37 °C bis zu einer OD_{620 nm} von 0,6 bis 0,7 inkubiert. Nach Ernten der Zellen (15 min, 8000 upm, 4 °C; Beckman J-21 Kühlzentrifuge, JA-14 Rotor) wurden die Zellen zweimal mit 200 ml und einmal mit 40 ml eiskaltem Glycerin (10%ig) gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschsritten wurden die Zellen für 1 bis 2 h auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 1 ml Glycerin (10%ig) resuspendiert und in 100-µl-Portionen im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.6.2. *E. coli* Transformation durch Elektroporation

Ligationsansätze wurden vor der Elektroporation durch das „PCR Purification Kit“ (Qiagen) gereinigt. DNA aus Plasmid-Präparationen wurden einer Mikrodialyse unterzogen. 100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und sofort 5 bis 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-DNA hinzugegeben (ungefähr 10 bis 100 ng). Die Elektroporation erfolgte in eisgekühlten Elektroporationsküvetten (1 mm Elektrodenabstand; Bio-Rad) mit dem Gene-Pulser (Eppendorf Elektroporator 2510) bei 1500 V, 200 W und 25 µF. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml eiskaltem SOC-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln (170 upm, „Swip“ Edmund Bühler) für 1 h inkubiert. Geeignete Verdünnungen wurden auf SOB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (siehe Tab. 7) ausgestrichen und für 16 bis 19 h bei 37°C inkubiert. Für die Anwendung von Blau-Weis-Selektion unter Verwendung von *E. coli* XL1-Blue oder Easypore Zellen wurden dem SOB-Agar 80 µg/ml X-Gal (Sigma) und 20 mM IPTG (Sigma) hinzugefügt.

2.6.3. Herstellung elektrokompetenter Zellen für *S. thermophilus* (Holo und Nes, 1995)

100 ml Belliker Medium versetzt mit 0,1 bis 1 % Glycin (abhängig vom verwendeten Stamm) wurden 1%ig mit einer Kultur von *S. thermophilus* beimpft und bei 40°C inkubiert. Bei einer OD_{620 nm} von 0,4 bis 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15 min, 8000 upm, 4°C; Beckman J-21 Kühlzentrifuge, JA-14 Rotor). Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen und in eiskaltem Elektroporationspuffer resuspendiert. Zwischen den einzelnen Waschrissen wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Die OD_{620 nm} der Suspension betrug ungefähr 1,9. Aliquots der Suspension wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.4. Herstellung elektrokompetenter *S. thermophilus*-Zellen (Marciset und Mollet, 1993)

Für den Stamm a10 wurde alternativ die folgende Methode zur Herstellung elektrokompetenter Zellen verwendet.

30 ml HJL-Medium wurden 1%ig mit einer *S. thermophilus* a10 Kultur beimpft, bei 40°C bebrütet und bei einer OD_{620 nm} von 0,1 bis 0,2 durch Zentrifugation geerntet (15 min, 6000 upm, 4°C; Beckman J-21 Kühlzentrifuge, JA-20 Rotor). Die Zellen

wurden in 5 ml 5 mM KH_2PO_4 (pH 7,0) gewaschen, erneut geerntet und in 3 ml EPM-Nährlösung (+ 10% Glycin) aufgenommen. Die Suspension wurde in Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.5. Herstellung kompetenter *L. lactis*-Zellen (Holo und Nes, 1995)

GM17-Medium wurde 1%ig mit einer *L. lactis* Bu2-60 Kultur beimpft und bei 30°C für 19 h bebrütet. Hieraus wurde 200 ml SGM17-Medium (+1% Glycin) 1%ig angeimpft. Nach Inkubation bei 30°C wurden die Zellen bei einer $\text{OD}_{620 \text{ nm}}$ von 0,3 bis 0,8 geerntet (15 min, 6,000 upm, 4°C ; JA-14 Rotor; Beckman J-21 Kühlzentrifuge), anschließend zweimal mit 20 ml eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen und in 1 ml des Puffers resuspendiert. Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.6. Transformation mit *S. thermophilus* und *L. lactis* durch Elektroporation

Die Transformation mit *S. thermophilus* und *L. lactis* erfolgte bei einer Feldstärke von 21kV/cm. Nach der Elektroporation wurden *S. thermophilus* Zellen mit 1 ml eiskaltem HJL-Medium bzw. *L. lactis* Zellen mit SGM17-Medium (+ 20 mM Saccharose) verdünnt und bei 42°C bzw. 30°C für 4 bis 5 h inkubiert. Verdünnungen wurden mit 3 ml Weichagar auf thLM17-Agarplatten bzw. GM17-Agarplatten mit geeigneten Antibiotikum aufgetragen. Die Platten wurden für 2 bis 3 Tage bei 40°C bzw. 30°C inkubiert.

2.7. Phagen, Stämme und Plasmide

Tab. 5: Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften [†]	Referenz
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
EC1000	<i>Km^r, repA⁺</i> (pWV01) in <i>glgB</i> , Derivat von <i>L. lactis</i> MC1000, plasmidfrei	Leenhouts <i>et al.</i> , 1996
<i>L. lactis</i>		
Bu2-60	plasmidfreies Derivat von <i>L. lactis</i> Bu2, <i>Sm^r, Rm^r</i>	Neve <i>et al.</i> , 1984
<i>S. thermophilus</i>		
a10	plasmidfrei	Stammsammlung BFEL-Kiel
55n	plasmidfrei, <i>sm^r, rif^r</i>	"
St	pSt1 (2,1 kb)	"
A054	plasmidfrei	"
St11	"	"
St106	pSt106 (5,3 kb)	"
J34	lysogener Wildtyp, pJ34 (3,4 kb)	Neve <i>et al.</i> , 2003
J34-6'	Derivat von J34, kuriert von TP-J34	Neve <i>et al.</i> , 2003
J34-12	Derivat von J34, defekter nicht induzierbarer TP-J34	Neve <i>et al.</i> , 2003
DC2	Wildtyp-Stamm	Danisco, Niebüll
DC10	"	"
DC14	"	"
DC15	"	"
DC134	pDC134 (3,1 kb)	"

[†]: Resistenz gegenüber Sm: Streptomycin, Rm: Rifampicin.

Material und Methoden

Tab. 6: Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBluescriptII SK(+) bzw. KS(+) „phagemid“	2,9 kb, „phagemid“, Amp ^r , f1(+) origin, <i>colE1</i> origin, <i>lacZ</i> (N-terminale Region), Derivat des Vektors pUC19	Stratagene
pNZ273	4,7 kb, <i>cat</i> , <i>ori</i> ⁺ , <i>repA</i> , <i>repC</i>	Platteeuw <i>et al.</i> , 1994
pAGJ34E	pJ34 (EcoRV)::pBSII-SK+(EcoRV); <i>erm</i> ^r	Geis <i>et al.</i> , 2003
pAGJ34EΔ <i>ori</i> -1	6,7 kb, Derivat von pAGJ34E, Δ <i>Phi ori</i> ¹ (teilweise)	Geis (pers. Mitteilung)
pAGJ34EΔ <i>cos</i> -1	6,5 kb, Derivat von pAGJ34E, Δ <i>cos</i> (teilweise)	“
pAGJ34EΔ <i>cos</i> -2	6,2 kb, Derivat von pAGJ34E, Δ <i>cos</i>	“
pAGJ34EΔΦ-1	6,0 kb, Derivat von pAGJ34E, ΔΦ <i>ori</i> ¹ (teilweise), Δ <i>cos</i> (teilweise)	“
pAGJ34EΔΦ-2	5,7 kb, Derivat von pAGJ34E, ΔΦ <i>ori</i> ¹ (teilweise), Δ <i>cos</i>	“
pAGS4E	7,2 kb, pSt04::HinP1pBSII SK+(Clal), <i>erm</i> ^r	Geis <i>et al.</i> , 2003
pAGS4E1	6,5 kb, Derivat von pAGS4E, Δ <i>shsp</i>	“
pAGS4E2	5,8 kb, Derivat von pAGS4E1, Δ <i>ssso</i> , ΔΦ <i>ori</i> ¹	“
pSHE1	7,2 kb, <i>amp</i> ^r , <i>erm</i> ^r	Janzen, 1993
pAG106AE	9,2 kb pSt106(AatII)::charomid 9-36; <i>erm</i> ^r Δ <i>spacer</i> und Δ <i>cos</i> von charomid 9-36	Geis <i>et al.</i> , 2003
pAG106AE1	9,2 kb, Derivat von pAG106AE, Startcodon von ORF2 deletiert	“
pBcos53	3,6 kb, 0,7 kb PCR-Produkt von P53 mit <i>cos</i> -Region(EcoRI)::pBS SK+(EcoRI)	diese Arbeit
pBori53	3,7 kb, 0,8 kb Fragment von P53 mit <i>ori</i> -Region (EcoIR)::pBS SK+(EcoRI)	“
pNcos53	5,3 kb, 0,8 kb Fragment von P53 aus pBcos53(EcoRI)::pNZ273(EcoRI)	“
pBcos1109	6,3 kb, 3,4 kb Fragment von P1109 mit <i>cos</i> -Region(Eco47III)::pBS SK+(EcoRV)	“
pBcosPST	5,8 kb, 2,9 kb Fragment von PST mit <i>cos</i> -Region(XbaI)::pBS SK+(XbaI)	“
pAMB1	26,5 kb, <i>Erm</i> ^r	Clewell <i>et al.</i> , 1974
pSt04	3,1 kb, <i>repA</i> , <i>shsp</i>	Geis <i>et al.</i> , 2003
pMG36E	3,7 kb; <i>erm</i> ^r	van de <i>et al.</i> , 1989
pXMS2	4,4 kb, Derivat von pMG36E, <i>ltp</i> , <i>erm</i> ^r	Sun <i>et al.</i> , 2006

¹: ΔΦ*ori*: Deletion in der Homologie zu Replikationsursprüngen von *S. thermophilus*-Phagen

^r: Resistenz gegenüber *amp*: Ampicillin, *erm*: Erythromycin, *cat*: Chloramphenicol

Tab. 7: Verwendete Antibiotikakonzentrationen.

	Antibiotika
<i>E. coli</i>	Ampicillin (Agarplatten: 50 µg/ml, Flüssigmedium: 100 µg/ml), Chloramphenicol (10 µg/ml), Tetracyclin (12,5 µg/ml)
<i>S. thermophilus</i>	Erythromycin (10 µg/ml), Chloramphenicol (10 µg/ml)
<i>L. lactis</i>	Erythromycin (10 µg/ml)

Tab. 8: Bakteriophagen.

Phage	<i>S. thermophilus</i> Wirtsstämme	Referenz
P53	a10, 55n	Neve <i>et al.</i> , 1989
a10/J9	a10	Neve <i>et al.</i> , 1989
PST	St, A054	Neve <i>et al.</i> , 1989
P1109	a10, 55n, St11	Dansico, Niebüll

3. Ergebnisse

3.1. Übersicht

Die Ergebnisse gliedern sich in drei Bereiche: 1. die Sequenzanalyse der verwendeten Phagen und Plasmide, 2. die Charakterisierung der Transduktion und 3. deren praktische Anwendungen (Abb. 3). Zunächst wird auf die Charakterisierung der verwendeten Phagen und Plasmide eingegangen, aus der sich in Verbindung mit den Transduktionsergebnissen die Voraussetzungen und Abläufe von Transduktionen in *S. thermophilus* ergeben. Die Charakterisierung der Transduktion umfasste weiterhin die Betrachtung des Spektrums an möglichen Empfängerstämmen. Anhand der Ergebnisse der Charakterisierungen konnten praktische Anwendungen entwickelt werden.

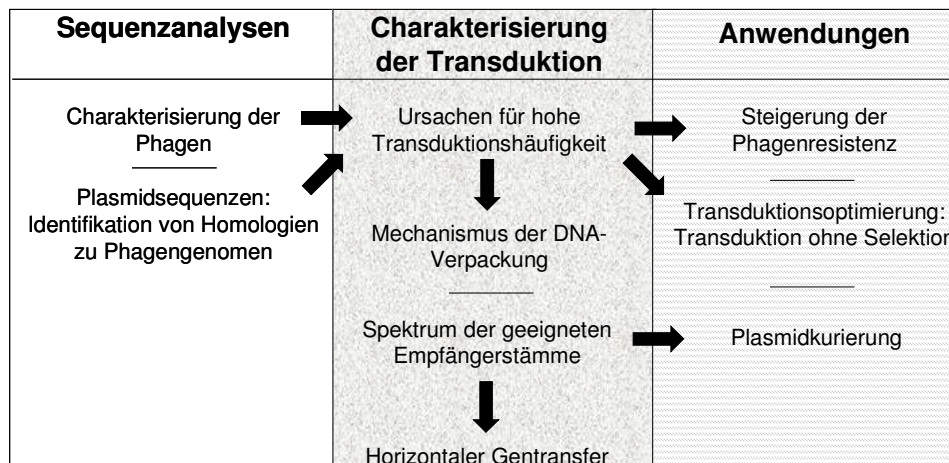


Abb. 3: Überblick über die Gliederung des Ergebnisteils. Die Ergebnisse gliedern sich in die drei Blöcke Sequenzanalyse, Transduktion und Anwendung. Thematisch verknüpfte Ergebnisse sind durch schwarze Pfeile verbunden.

3.2. DNA-Sequenzanalysen

3.2.1. Charakterisierung der verwendeten *S. thermophilus*-Phagen

Für den Mechanismus der Übertragung sind die Eigenschaften der verwendeten Phagen, insbesondere die Genomgröße und der Phagen-Typ (*cos* oder *pac*) von Bedeutung.

In DNA-Präparationen der *cos*-Phagen liegt die DNA zum Teil in zirkulärer Form vor, da an der *cos*-Stelle das DNA-Molekül über Wasserstoff-Brückenbindungen der komplementären Basen geschlossen wird. Diese lockere Bindung kann durch

Ergebnisse

Erhitzen der DNA gelöst werden (Hershey *et al.*, 1963). In DNA-Restriktionsprofilen zeigt sich dieses durch DNA-Banden, die sich nach Erhitzung der DNA in je zwei kleinere Banden auflösen.

Für alle getesteten Phagen konnten DNA-Banden gefunden werden, die nach Erhitzung der Phagen-DNA auf 70°C auf dem Agarosegel nicht mehr nachweisbar waren (Beispiele siehe Abb. 4). Dafür zeigten sich im Vergleich zu der unerhitzten DNA je ein bis zwei neue niedermolekulare Banden. Die Phagen P1109, P53, a10/J9 und PST gehören daher zu der Gruppe der *cos*-Phagen (Tab. 9). Weitere Restriktionsprofile sind im Anhang dargestellt (siehe Abb. 50 bis Abb. 53).

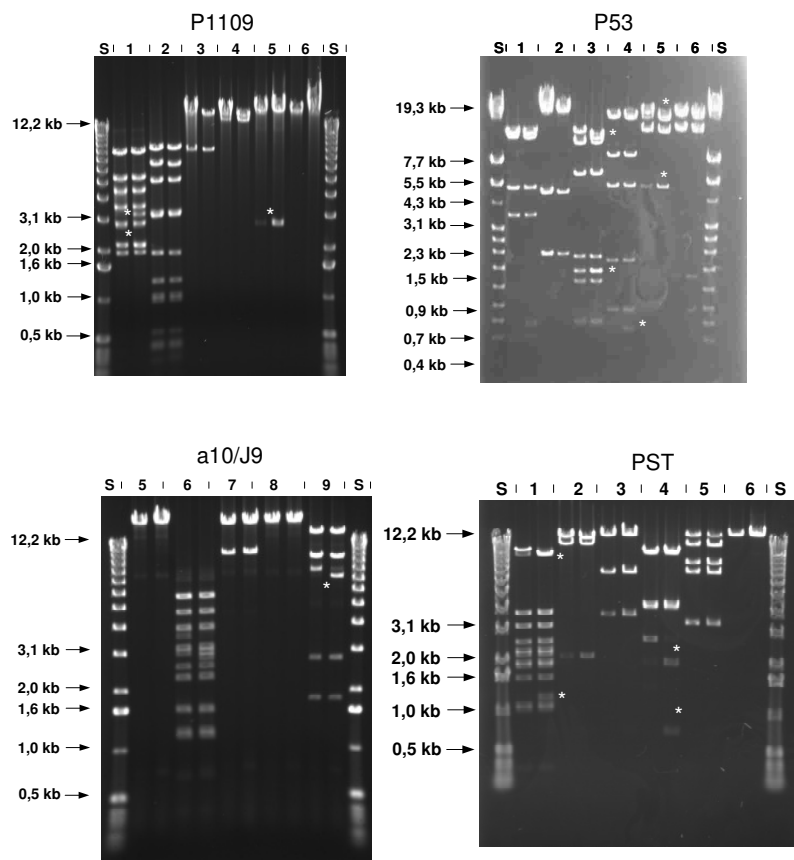


Abb. 4: Nachweis der *cos*-Stellen durch Restriktionshydrolyse der Phagen-DNA. 0,8%ige Gele, 0,2 bis 0,5 µg DNA aufgetragen. Jeweils rechte Spur mit hitzedenaturierter DNA beladen. P1109: S: Molecular Marker X; 1. HindIII, 2. EcoRI, 3. SacI, 4: XhoI, 5. EagI, 6. PstI. P53: S: Molecular Marker IV (Roche), 1. Avall, 2. Stul, 3. EcoRI, 4. XbaI, 5. Sall, 6. Aval. a10/J9: S: Molecular Marker X (Roche), 1. Accl, 2. Apal, 3. NotI, 4. BstXI, 5. HincII. PST: S: Molecular Marker X (Roche), 1. Avall, 2. Stul, 3. EcoRI, 4. XbaI, 5. Sall, 6. Aval. Sternchen markieren durch Hitze dissoziierte Banden.

Tab. 9: Lokalisierung der *cos*-Stellen.

Phage	Restriktionsenzym	Größe ¹ des <i>cos</i> -Fragments [kb]	Größe ¹ der dissoziierten <i>cos</i> -Fragmente [kb]	
P1109	BstXI	5,9	5,1	0,8
P53	EcoRI	14,2	12,5	1,7
a10/J9	HincII	4,3	3,9	0,4
PST	Avall	13,0	11,0	2,0

¹: Die Größe der DNA Fragmente wurde mit dem Programm Quantity One (Bio-Rad) bestimmt.

Sequenzierung der *cos*-Regionen

Nach Lokalisierung auf verschiedenen DNA-Restriktionsfragmenten konnten die *cos*-Region der Phagen P1109, PST und P53 kloniert werden (Tab. 10). Als Klonierungsvektor diente pBluescriptIIISK+.

Die Sequenz von P53 war bis auf eine Base identisch zur der entsprechenden Sequenz des *S. thermophilus*-Phagen Sfi19, dessen Genom vollständig sequenziert ist (Lucchini *et al.*, 1999b). Die Lage der *cos*-Stelle wurde für den Phagen P53 durch Sequenzierung dissoziierbarer DNA-Fragmente ermittelt. Die Länge des 3'-Überhanges betrug 11 bp (siehe auch Kapitel 3.2.2 Abb. 8). Sie unterscheidet sich damit von derjenigen des Phagen Sfi19, dessen 3'-Überhang 15 bp lang ist. Die Sequenzen von PST und P1109 zeigten deutliche Unterschiede zu denen der Phagen P53 und Sfi19. Ein Sequenzvergleich der *cos*-Regionen verschiedener *S. thermophilus*-Phagen liegt im Anhang bei (Abb. 49). Es gibt Bereiche von bis zu 11 bp, in denen es keine Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenzen gibt. Weiterhin lassen sich vier scharf abgegrenzte Abschnitte mit nur schwacher Sequenzübereinstimmung ausmachen. Beides spricht dafür, dass die konservierten Sequenzbereiche eine wichtige funktionale Bedeutung haben. Innerhalb der *cos*-Stelle selbst gibt es an drei Positionen Unterschiede. Dabei liegen alternativ an der ersten Stelle A oder G, an der zweiten Stelle G oder C und an der letzten T oder C vor. Trotz der übrigen Sequenzunterschiede ist die *cos*-Stelle selbst somit sehr konserviert. Circa 40 bp hinter der *cos*-Stelle endet der Bereich starker Sequenzübereinstimmungen. Dies ist das Ende der *cos*-Region.

Tab. 10: Klonierte Phagen-DNA Fragmente.

Phage	Restriktions-Fragment	Größe des Fragmentes [kb]	Insertionsort in pBluescriptIIISK+	Bezeichnung des Plasmids	funktionelle Sequenz
P1109	Eco47III ¹	3,4	EcoRV	pBcos1109	<i>cos</i> -Region
P53	PCR-Produkt ^{1,2}	0,7	EcoRI	pBcos53	<i>cos</i> -Region
P53	EcoRI	0,8	EcoRI	pBori53	<i>ori</i> -Region
PST	XbaI ¹	3	XbaI	pBcosPST	<i>cos</i> -Region

¹: Die Restriktionsfragmente und das PCR-Produkt wurden aus ligierter Phagen-DNA gewonnen.

²: Vorwärts gerichteter Primer P53Fwd: TTT GAA TTC ACC CGT TGA AAT AGC TCC; rückwärts gerichteter Primer P53Rev: TTT GAA TTC TGC CGT TTT CTT TTA TGT CC.

Ergebnisse

Innerhalb der konservierten Regionen lagen für *cos*-Stellen typische direkte und indirekte Sequenzwiederholungen. Die Lage dieser Stellen ist im Anhang (Abb. 49) aufgeführt. Bei einem Vergleich der *cos*-Regionen von *S. thermophilus*-Phagen und Phagen von *Lactococcus* und *Lactobacillus* mit Blast2n konnten keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen identifiziert werden. Durch einen auf die *cos*-Stelle selbst und auf die benachbarten konservierten Bereiche eingegrenzten Sequenzvergleich (Abb. 5) wurden Sequenzhomologien zu den Phagen adh (*L. gasseri*) und BK5-T (*Lactococcus lactis*), sowie zu Prophagen von *L. lactis* IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001) deutlich.

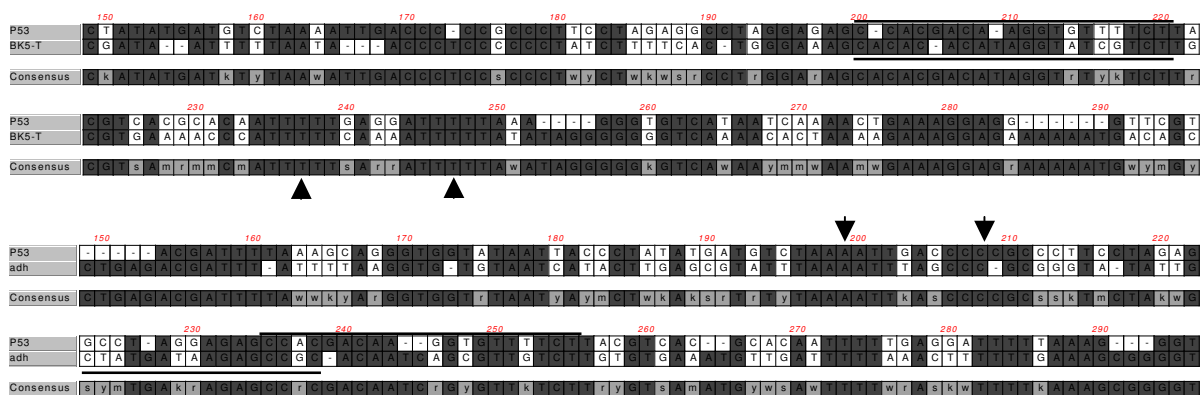


Abb. 5: Sequenzvergleich des *S. thermophilus*-Phagen P53 mit dem *L. lactis*-Phagen BK5-T (Desiere *et al.*, 2001) und dem *L. gasseri* Phagen adh (Altermann *et al.*, 1999). *Cos*-Stellen sind durch Linien markiert, Pfeile markieren in *S. thermophilus*-Phagen genom konservierten Abschnitte.

Größe der Phagen Genome

Anhand der Restriktionsprofile und den daraus abgeleiteten Größen der DNA-Fragmente ergeben sich die in Tab. 11 zusammengefassten Genomgrößen.

Tab. 11: Bestimmung der Genomgrößen der *S. thermophilus*-Phagen durch Analyse der DNA-Restriktionsprofile.

Phage	Genomgröße [kb]	Standardabweichung [kb]	Verwendete Restriktionsprofile ¹
P1109	33,2	1,5	HindIII, EcoRI, BstXI, ClaI/EagI ² , ClaI/BstXI ²
P53	36,7	0,7	EcoRI, HindIII, XbaI, Avall, EcoRI/StuI ² , Avall/Aval ² , XbaI/Aval ²
a10/J9	38,9	0,2	KpnI, ClaI
PST	34,2	<0,1	Avall, StuI

¹: Für die Größenbestimmung (Quantity One, Bio-Rad) wurden nur Restriktionsprofile verwendet, in denen alle DNA-Banden deutlich unterscheidbar und innerhalb der Reichweite des DNA-Markers lagen.

²: Hydrolyse mit 2 Restriktionsenzymen.

Vergleich der Restriktionskarten der Phagen P53 und Sfi19

Die Sequenzen der *cos*-Regionen der Phagen P53 und Sfi19 unterschieden sich nur in einer Base, die der *ori*-Region waren vollständig identisch. Die Sequenzierung der *ori*-Region des Phagen P53 zeigte, dass diese identisch zu der von Sfi19 war. Um zu prüfen, ob sich die Genome der beiden Phagen generell sehr ähneln, wurde eine Restriktionskarte von P53 (36,7 kb, siehe Tab. 11) erstellt. Diese weist eine große Ähnlichkeit zu der des *S. thermophilus*-Phagen Sfi19 (37,4 kb) auf. Die Restriktionsprofile der beiden Phagen sind in Abb. 6 gegenübergestellt. Kleinere Unterschiede können ihre Ursache in der beschränkten Genauigkeit einer experimentell ermittelten Restriktionskarte haben. Ein deutlicher Unterschied war das Vorkommen zweier *EcoRI*-Schnittstellen im P53-Genom, die zwischen 10 und 20 kb liegen. *EcoRI*-Schnittstellen kommen im Genom von Sfi19 in der Nähe der *cos*-Stelle nur auf einer Seite vor. Abgeleitet vom übrigen Restriktionsmuster liegen die fehlenden *EcoRI*-Schnittstellen im ORF1626 („minor tail protein“) und ORF1291 (tail-host specificity factor) des Phagen Sfi19. Der Vergleich der Restriktionskarten zeigt, dass es sich bei P53 und Sfi19 um verschiedene, aber sehr ähnliche Phagen handelt.

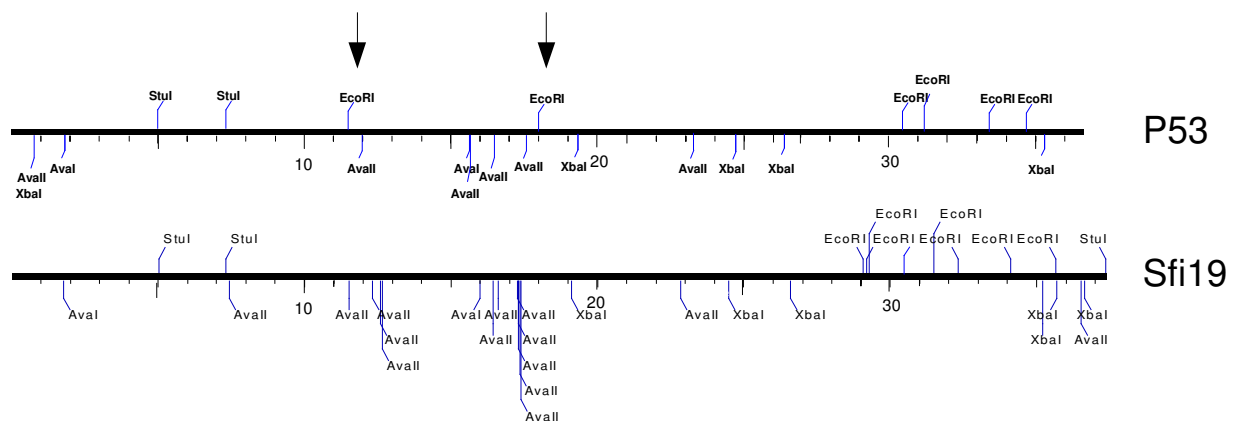


Abb. 6: Vergleich der Restriktionskarten der *S. thermophilus*-Phagen P53 (Daten aus Restriktionshydrolysen) und Sfi19 (Daten aus DNA-Sequenz, (Lucchini *et al.*, 1999b)); Der Anfang und das Ende der Karten ist jeweils durch die *cos*-Stelle begrenzt. Die Skalierung ist in kb angegeben. Schnittstellen von *EcoRI*, die nur in der P53-Sequenz vorkommen, sind mit zwei senkrechten Pfeilen markiert.

3.2.2. Plasmid-Sequenzen

Nur Plasmid-Konstrukte auf der Basis nativer *S. thermophilus*-Plasmide waren transduzierbar. Um die Ursachen hierfür zu klären, wurden Sequenzanalysen der

Plasmide durchgeführt. Die allgemeinen Eigenschaften der Plasmide sind in Kapitel 2.7 in der Tab. 6 beschrieben.

Die DNA-Sequenzen der verwendeten nativen *S. thermophilus*-Plasmide wiesen kurze homologe Abschnitte zu Sequenzen verschiedener *S. thermophilus*-Phagen auf. Die Homologien betrafen ausschließlich Bereiche um die *cos*-Stelle und den Replikationsursprung der Phagen. Die Lage dieser Sequenzen auf den Plasmiden zeigt Abb. 7. Die Homologien zu den Phagen-Regionen lagen bei den Plasmiden pST1 und pJ34 eng beieinander. In pSt04 befindet sich das *shsp* Gen zwischen den Regionen. Für das Plasmid pSt106 konnten nur Homologien zur *cos*-Region gefunden werden. Auf den Plasmiden pJ34 und pSt106 lagen zwei Kopien der *cos*-Region eng beieinander. *Cos*- und *ori*-Region ähnliche Sequenzen ließen sich auf weiteren nativen *S. thermophilus*-Plasmiden identifizieren. Tab. 12 fasst die Länge und das Ausmaß dieser Homologien zusammen. Ein Sequenzvergleich der *cos*-Region von Phagen und Plasmiden zeigte stark konservierte Bereiche auf. In diesen Bereichen befinden sich „direct repeats“, „inverted repeats“ und drehsymmetrische Sequenzen (Abb. 8).

Ergebnisse

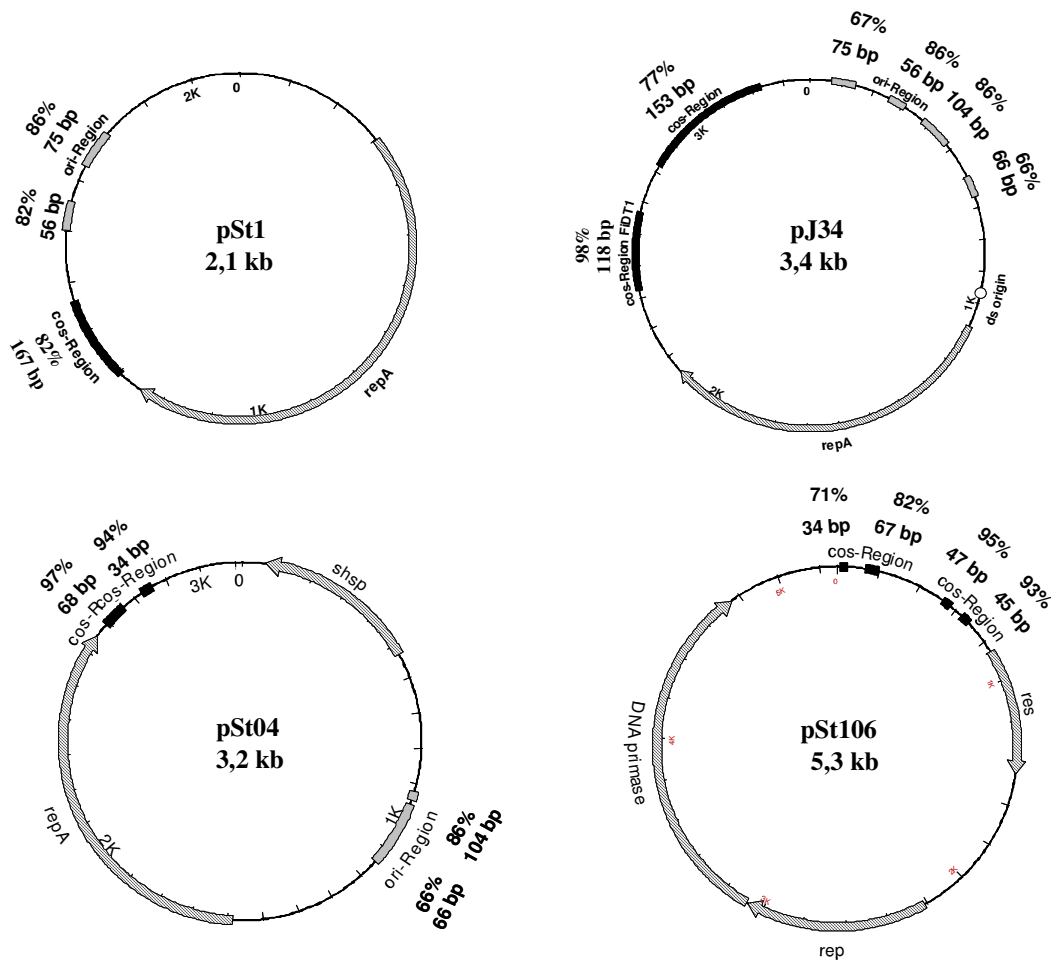


Abb. 7: Homologien zu Phagen *cos*-Regionen und Replikationsursprüngen auf den nativen Plasmiden pSt1 (Janzen *et al.*, 1992), pJ34, pSt04 und pSt106 (Geis *et al.*, 2003). Die zur *cos*-Region des Phagen P53 homologen Sequenzabschnitte sind durch schwarze, die zu dessen *ori*-Region durch graue Boxen gekennzeichnet. *Shsp*: kleines Hitzeschockprotein, *ds origin*: Replikationsursprung, *res*: Resolvase, *rep*: Replikase.

Tab. 12: *Cos*- und *ori*-Region ähnliche Sequenzen auf nativen *S. thermophilus*-Plasmiden.

Plasmid	Homologien zu <i>cos</i> -Regionen ¹	Homologien zu <i>ori</i> -Regionen ¹	Gene	Referenz
pER35	88% (181 bp), 87% (164 bp), 97% (37 bp)	-	<i>repA</i> , <i>shsp</i> , Typ I R/M-System: <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdS</i> , <i>epsilon</i>	Solow und Somkuti, 2000
pER36	88% (181 bp); 85% (164 bp); 79% (183 bp)	-	<i>repA</i> , <i>shsp</i> , <i>epsilon</i>	"
pND103	83% (143 bp)	84% (91 bp); 84% (82 bp)	<i>repA</i> , <i>shsp</i>	Su <i>et al.</i> , 2002
pT38	91% (48 bp) 93% (32 bp)	79% (107 bp); 82% (62 bp)	<i>repA</i> , <i>shsp</i>	Petrova <i>et al.</i> , 2003
pER1-1	78% (166 bp) 93% (48 bp)	-	<i>repA</i> , <i>shsp</i>	Geis <i>et al.</i> , 2003
pCI65st	82% (152 bp), 81% (93 bp)	-	<i>repA</i> , <i>shsp1</i> , <i>shsp2</i> , <i>enolase</i> , <i>hsdS</i>	O'Sullivan <i>et al.</i> , 1999

¹: Der Grad der Homologie zum Phagen P53 ist in % angegeben, die Länge dieser Bereiche auf den Plasmiden in Basenpaaren.

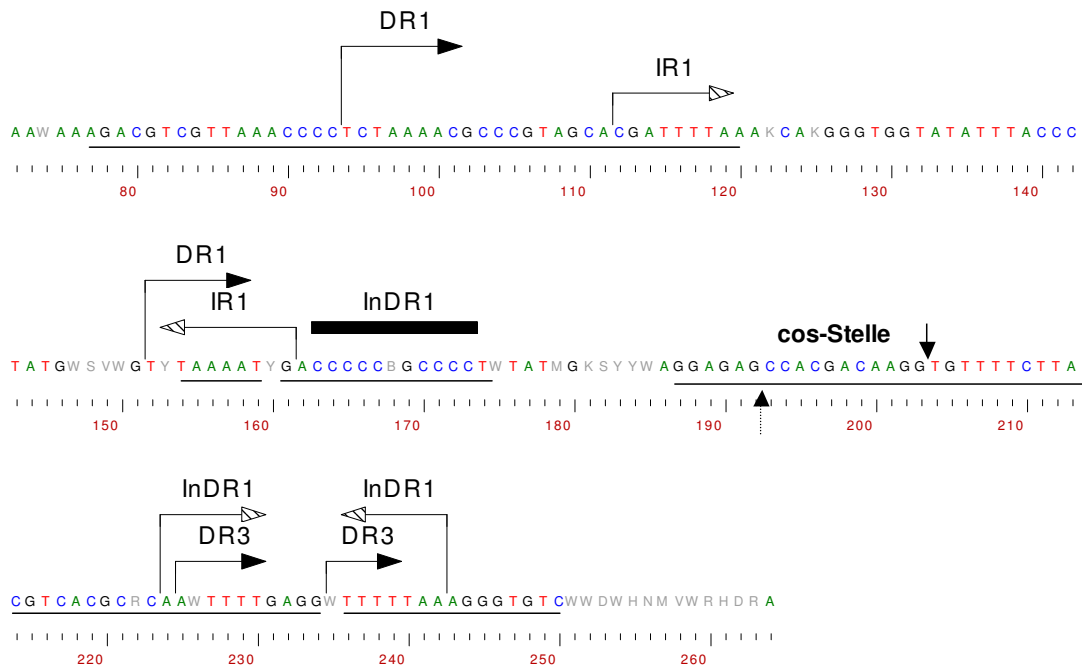


Abb. 8: Sequenzwiederholungen in der *cos*-Region der *S. thermophilus*-Phagen und Plasmide. Die Konsensussequenz wurde aus dem Vergleich der *cos*-Regionen der *S. thermophilus*-Phagen und nativen *S. thermophilus*-Plasmiden gebildet (insgesamt 17 Sequenzen). DR: „direct repeats“, IR: „inverted repeats“, InDR: drehsymmetrische Sequenzen. Die senkrechten Pfeile markieren das 3'-Ende der *cos*-Stelle des Phagen P53, der gestrichelte senkrechte Pfeil das des Gegenstranges. Abschnitte, in denen mindestens 80% der Sequenzen mit der Konsensussequenz übereinstimmen, sind unterstrichen.

3.3. Charakterisierung der Transduktion in *S. thermophilus* mit *cos*-Phagen

3.3.1. Transduktion verschiedener Plasmide in *S. thermophilus*

Die Transduktionsversuche wurden mit zwei Gruppen von Plasmiden durchgeführt. Zum einen wurden rekombinante Plasmid-Konstrukte bestehend aus einem nativen *S. thermophilus*-Plasmid und einem Klonierungsvektor mit Erythromycinresistenzgen in Transduktionen eingesetzt. Zweitens wurde der in Gram-positiven Bakterien replizierende Shuttle-Vektor pNZ273 und das durch Konjugation übertragbare Plasmid pAMB1 verwendet.

Die Plasmide pAMB1 und pSt106AE1 replizieren nach dem theta-Mechanismus, die übrigen nach dem „rolling-circle“-Mechanismus. Die detaillierten Eigenschaften der Plasmide sind in Tab. 6 aufgeführt. In Transduktionsversuchen wurden die Plasmide der ersten Gruppe erfolgreich übertragen (siehe Abb. 9), eine Übertragung der Plasmide pNZ273 und pAMB1 konnte nicht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag bei 10^{-8} Kolonie-bildenden Einheiten/Plaque-bildender Einheit

Ergebnisse

(KbE/PbE). Der *S. thermophilus*-Stamm a10 diente hierbei sowohl als Donor als auch als Rezipient. Eine Ausnahme bildeten Transduktionen mit dem Phagen PST, wofür *S. thermophilus* A054 als Donor und Rezipient diente.

Für das Plasmid pAG106AE wurden für alle getesteten Phagen die höchsten Transduktionshäufigkeiten erzielt, während das Plasmid pSHE1 mit deutlich geringeren Häufigkeiten übertragbar war. Die Abhängigkeit der Transduktionshäufigkeit vom übertragenden Phagen war für pAGJ34E und pAGS4E stärker ausgeprägt als für die übrigen Plasmide.

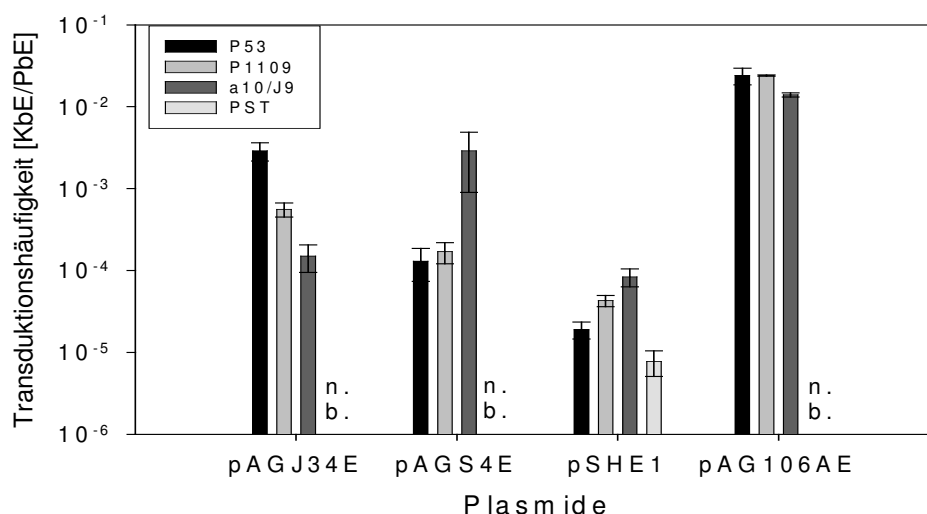


Abb. 9: Transduktion der Plasmide mit *S. thermophilus* cos-Phagen. Die Transduktionen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt: M.O.I. 0,01 bis 0,1; 10 mM CaCl; 10 min Adsorption bei 42°C; 50 min Expressionszeit. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 bis 16 Versuchen. Donor und Rezipient für PST Transduktionen war A054. n.b.: nicht bestimmt.

Abhängigkeit der Transduktionshäufigkeit vom verwendeten Donorstamm

Die Transduktionen mit dem Phagen P1109 wurden vergleichsweise mit den Stämmen a10 und St11 als Donorstamm durchgeführt. Ein Vergleich der Transduktionshäufigkeiten zeigt Tab. 13. Die Unterschiede zwischen den ermittelten Transduktionshäufigkeiten waren klein. Das Plasmid pAGJ34E ließ sich aus *S. thermophilus* St11 ungefähr 3 mal, das Plasmid pAGS4E ungefähr 2 mal besser als aus a10 transduzieren.

Tab. 13: P1109 Transduktion in *S. thermophilus* St11 mit verschiedenen Donorstämmen; Transduktionen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 bis 4 Versuchen.

Donorstamm	Transduktionshäufigkeiten [KbE/PbE]	
	pAGJ34E	pAGS4E
a10	$2,6 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-4}$
St11	$7,7 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-4}$

Nachweis einer vollständigen Plasmid-Übertragung

Bei einer Übertragung mittels Transduktionen kann die Sequenz der Plasmide verändert werden, z.B. durch Verkürzung oder durch Integration der Phagen-DNA. In den durchgeführten Transduktionen konnten weder Deletionen noch Insertionen beobachtet werden (Beispiele im Anhang Abb. 54 bis Abb. 57). Die aus Transduktanten isolierten Plasmide wiesen keine sichtbaren Unterschiede zu den Original-Plasmiden auf. Auch in Restriktionshydrolysen war kein Unterschied zu erkennen (Anhang, Abb. 58).

3.3.2. Die Bedeutung der *cos*- und *ori*-Region für die Transduktion

Da in der Sequenz der transduzierbaren Plasmide *cos*- und *ori*-Regionen aus *S. thermophilus*-Phagen vorlagen, wurde der Einfluss dieser Sequenzen auf die Höhe der Transduktionshäufigkeit untersucht. Hierzu wurden Deletionsderivate der Plasmide pAGJ34E (Abb. 10) und pAG106AE in Transduktionsexperimenten eingesetzt. Derivate ohne Homologien zu *cos*-Stellen konnten nicht übertragen werden (Abb. 12). Die Deletion eines Teils der *cos*-Stellen Homologie hatte keine Auswirkung auf die Transduktionshäufigkeit. Derivate des Plasmids pAGJ34E, denen ein großer Teil der Homologie zur *ori*-Region fehlte, konnten im Vergleich zu pAGJ34E mit etwas geringeren Häufigkeiten übertragen werden. In dem pAGS4E-Derivat pAGS4E2 ist die *ori*-homologe Region vollständig deletiert. Das Plasmid ließ sich dennoch mit einer Häufigkeit transduzieren, die sich nicht deutlich von der Transduktionshäufigkeit der Plasmide pAGS4E1 und pAGS4E unterschied (Abb. 11). Die *cos*-Region war somit für hohe Transduktionshäufigkeiten notwendig, während das Vorhandensein einer Phagen *ori*-Region keinen deutlichen Einfluss hatte.

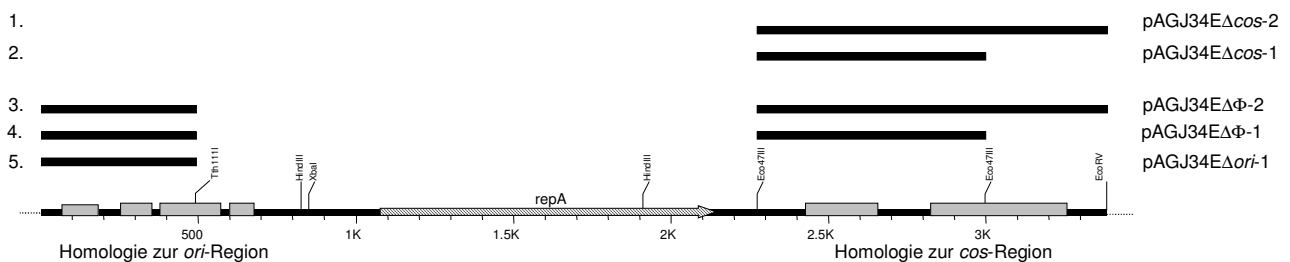


Abb. 10: Schematische Darstellung der Deletionsderivate des Plasmids pAGJ34E anhand der pJ34-Sequenz. Graue Boxen: Homologie zu *ori*- und *cos*-Regionen. Schwarze Balken markieren deletierte Sequenzabschnitte.

Ergebnisse

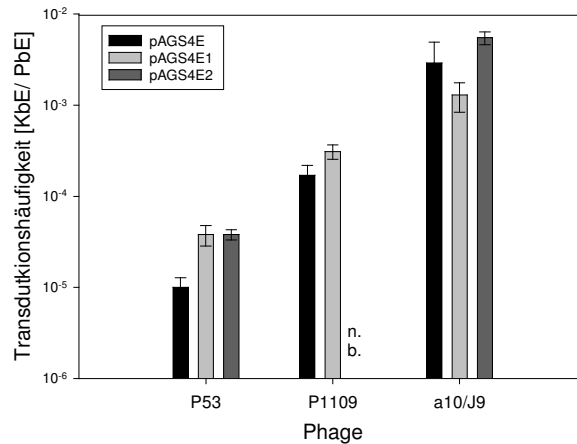


Abb. 11: Transduktion der pAGS4E-Derivate. Die Transduktionen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 9 beschrieben durchgeführt. n.b.: nicht bestimmt.

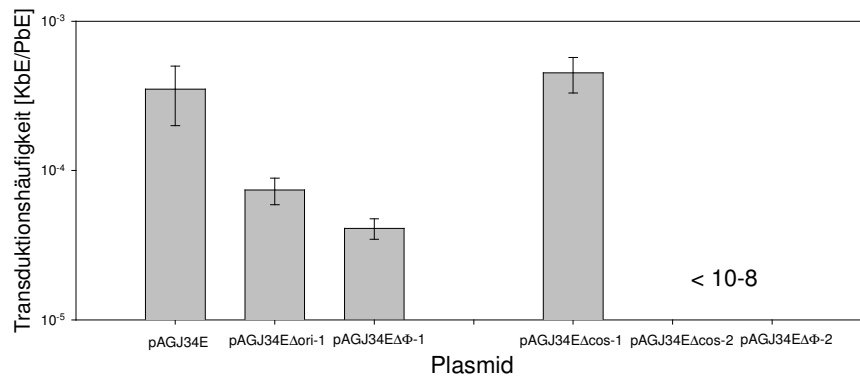


Abb. 12: Transduktion der Deletionsderivate des Plasmids pAGJ34E mit dem Phagen P53. Die Transduktionen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 9 beschrieben durchgeführt.

Um zu zeigen, dass das Vorkommen einer *cos*-Region für die Transduktion nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend ist, wurde die *cos*-Region des Phagen P53 in die EcoRI-Schnittstelle des nicht transduzierbaren Shuttle-Vektors pNZ273 kloniert (Abb. 13, Abb. 14). Mittels einer DIG-markierten P53-Sonde wurden Transformanten in Koloniehybridisierung auf das Vorhandensein von P53-DNA überprüft. Es konnte ein Klon isoliert werden, dessen Plasmid in Restriktionshydrolysen zwei EcoRI-Fragmente aufwies, eines in der Größe des Vektors pNZ273 und eines in der Größe des klonierten *cos*-Fragmentes. Nach Übertragung dieses Plasmids (pNcos53) in *S. thermophilus* a10 konnte es mit den getesteten Phagen a10/J9, P53 und P1109 mit Transduktionshäufigkeiten von bis zu $2,6 \times 10^{-2}$ KbE/PbE übertragen (siehe Tab. 14).

Ergebnisse

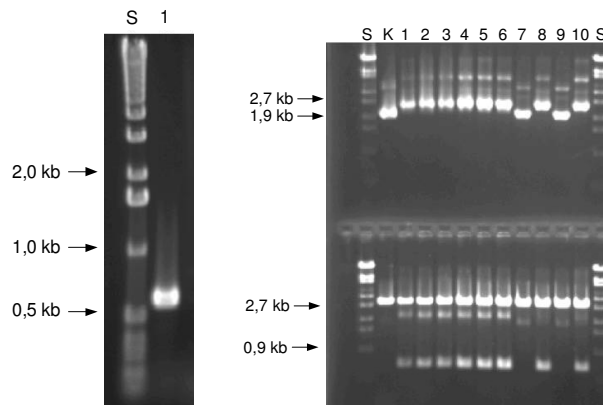


Abb. 13: Klonierung der *cos*-Region des Phagen P53 in den Vektor pBluescriptII SK+. **Links:** 0,8%iges Agarosegel mit dem PCR-Produkt der Primer P53Fwd1 und P53Fwd2 (siehe Tab. 2); S: Molecular Marker X, 0,25 µg; 1: PCR-Ansatz, 10 µl. **Rechts:** 0,8%iges Agarosegel der Plasmide aus EC1000 Transformanten; S: Lambda/Styl, 0,1 µg; K: pBluescriptII SK+, 1-10: Plasmide aus EC1000 Transformanten; oben nicht hydrolysiert; unten hydrolysiert mit EcoRI.

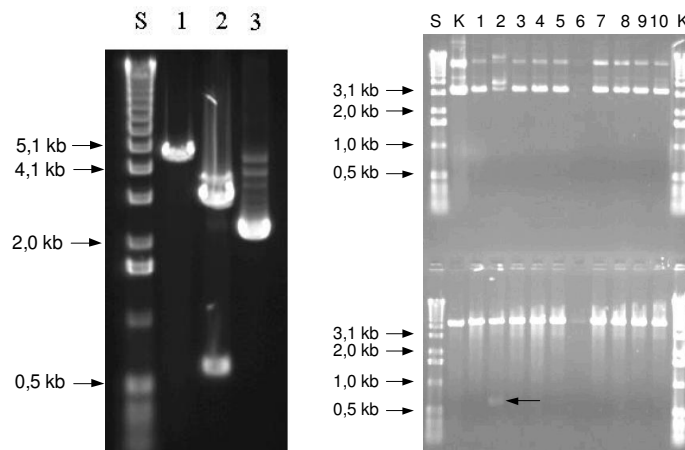


Abb. 14: Klonierung der *cos*-Region des Phagen P53 in den Vektor pNZ273. **Links:** 0,8%iges Agarosegel; S: Molecular Marker X, 0,25 µg; 1: pNZ273/EcoRI, 1 µl; 2: pBcos53/EcoRI 1 µl, 3: pBcos53, 1 µl. **Rechts:** 0,8%iges Agarosegel mit Plasmiden isoliert aus EC1000 Transformanten; S: Molecular Marker X 0,1 µg; K: pNZ273, 1 µl; 1-10: Plasmide isoliert aus den Transformanten; oben nicht hydrolysiert; unten Hydrolyse mit EcoRI. Der schwarze Pfeil markiert das *cos*-Fragment des Phagen P53.

Tab. 14: Transduktion des Plasmids pNcos53.

Phage	Transduktionshäufigkeit ¹ [KbE/PbE]
P1109	$8,4 \times 10^{-4}$ (+/- $0,5 \times 10^{-4}$)
P53	$7,4 \times 10^{-4}$ (+/- $0,8 \times 10^{-4}$)
a10/J9	$2,0 \times 10^{-2}$ (+/- $1,2 \times 10^{-2}$)

¹: Transduktion unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 2.4.7, S. 26); Rezipient und Donor war *S. thermophilus* a10; M.O.I. 0,1; Werte sind Mittelwerte aus 2 bis 7 Versuchen.

Verpackung der Plasmid-DNA in den Phagenkopf

In DNA-Präparationen aus transduzierenden Lysaten der Phagen P53 und PST konnten die Plasmide pAGJ34E und pSHE1 durch DNA-DNA-Hybridisierung als

Ergebnisse

hochmolekulare Bande nachgewiesen werden (siehe Abb. 15 Abb. 16). Als Sonde für die Hybridisierungen mit P53-DNA wurde DIG-markiertes pBluescriptIIISK+ verwendet, da sowohl pAGJ34E und pSHE1 ein Derivat dieses Plasmids beinhalten. Als Sonde für die Hybridisierungen mit PST-DNA diente DIG-markiertes pSHE1. Das Signal der Plasmid-DNA lag ungefähr auf der Höhe der Bande der Phagen-DNA. In hydrolysierten DNA-Präparationen war anstelle dessen eine Bande auf der Höhe linearer Plasmide DNA zu beobachten. Als Restriktionsenzyme (EcoRI, Sall, StuI) dienten hierbei Enzyme, für die genau eine Schnittstelle in der Plasmid-DNA vorhanden war. Restriktionshydrolyse mit Aval, welches das Plasmid zweimal schneidet, führte zu zwei Banden, die unter der Bande der Plasmid-DNA lag. Unter Verwendung eines Enzyms, das keine Schnittstellen in der Plasmid-DNA, sondern nur in der Phagen-DNA hatte, blieb die hochmolekulare Bande bestehen. Dieses zeigte, dass die Plasmid-DNA als konkatemeres Molekül vorlag. Als Negativkontrolle für die Plasmid-Sonde diente P53-DNA aus nicht transduzierenden Lysaten. Diese ergab mit der Sonde kein Signal. Hybridisierungen mit markierter P53-DNA als Sonde zeigten ausschließlich Banden auf der Höhe von P53-Fragmenten. Banden auf der Höhe von Plasmid-Signalen traten nicht auf.

Die pAGJ34E-DNA war auch ohne Hybridisierung auf dem Agarosegel sichtbar. Sie erschien in Restriktionshydrolysen der P53-DNA mit EcoRI und Sall als 7,2 kb Bande, die im Restriktionsprofil des Phagen P53 nicht vorhanden war. Die Kopienzahl des Plasmids und die des Phagen waren nahezu gleich groß, da die Stärke der pAGJ34E Banden und Phagenbanden fast identisch waren.

Die für das Plasmid pSHE1 erhaltenen Signalstärken waren wesentlich geringer als für das Plasmid pAGJ34E. Dies zeigt, dass es deutlich seltener in den Phagenkopf verpackt worden war.

Bei der Hybridisierung der P53-DNA aus *S. thermophilus* a10 (pSHE1) war unter der intensiven pSHE1 Bande noch je eine schwächere DNA Bande sichtbar. Wenn ein lineares konkatemeres DNA-Molekül geschnitten wird, können je nach verwendetem Restriktionsenzym kleinere Fragmente entstehen, welche die Enden des Konkatemers darstellen. Die Signale für die kleineren Fragmente lagen bei der Hybridisierung auf einer Höhe von ungefähr 5 kb und kleiner 2 kb (EcoRI), 4,1 kb (Aval) und 5 kb (Sall). Durch den Vergleich dieser Fragmente mit der pSHE1-Restriktionskarte konnte jedoch kein definiertes Ende des Konkatemers bestimmt

Ergebnisse

werden. Bei den Fragmenten handelte es sich wahrscheinlich um Artefakte aus der Hybridisierung.

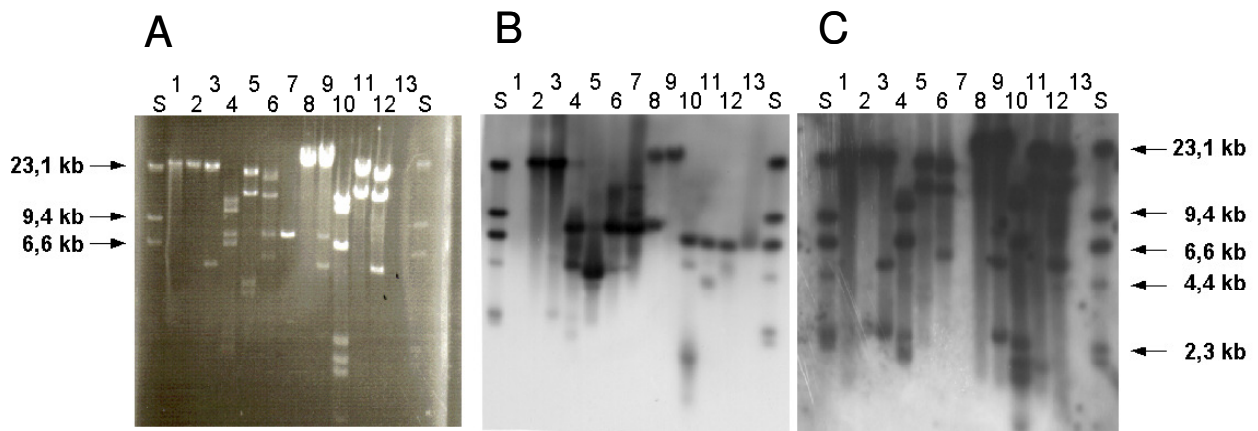


Abb. 15: DNA-DNA-Hybridisierung zur Detektion der Plasmide pAGJ34E und pSHE1 in DNA Präparationen aus dem Phagen P53. S: Lambda/HindIII (DIG markiert), 0,5 µg; DNA mit Stul (3, 9), EcoRI (4, 10), Aval (5, 11) und Sall (6, 12) hydrolysiert; 1: P53-DNA aus *S. thermophilus* a10; 2-6: P53-DNA aus *S. thermophilus* a10 (pAGJ34E); 7: pAGJ34E hydrolysiert mit Sall; 8-12: P53-DNA aus *S. thermophilus* a10 (pSHE1); 13: pSHE1 hydrolysiert mit Sall; **A:** 0,8%iges Agarosegel; **B:** DIG-markierte pBluescriptIIISK+ DNA als Sonde; **C:** DIG-markierte P53-DNA als Sonde.

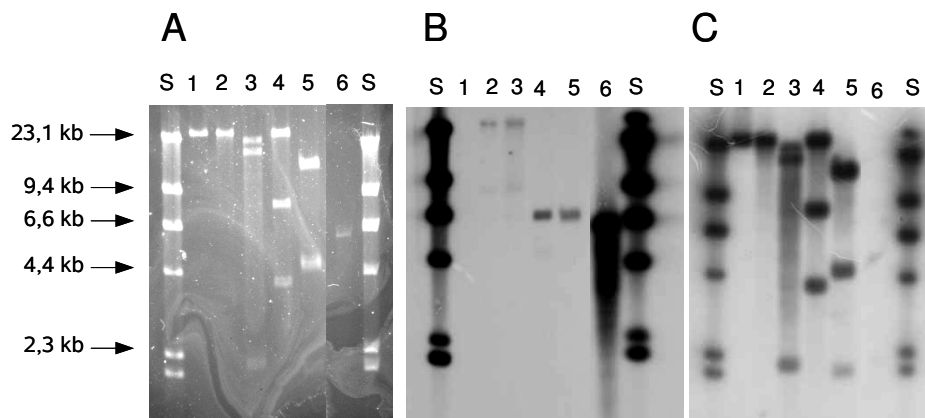


Abb. 16: DNA-DNA-Hybridisierung zur Detektion der pSHE1-DNA in DNA-Präparationen aus dem Phagen. 0,8%iges Agarosegel; S: Lambda/HindIII (DIG markiert), 0,5 µg; 1: PST-DNA aus *S. thermophilus* A054; 2: PST-DNA aus *S. thermophilus* A054 (pSHE1) 3-5: PST-DNA aus *S. thermophilus* A054 (pSHE1) hydrolysiert mit Stul (3), EcoRI (4), XbaI (5); 6: pSHE1 aus *E. coli* Easycore. **A:** 0,8%iges Agarosegel; **B:** DIG-markierte pSHE1-DNA als Sonde; **C:** DIG-markierte PST-DNA als Sonde.

Das Auftreten der Plasmid-DNA in Phagen-DNA Präparationen konnte zusätzlich zu den anderen Experimenten durch Transformation des *E. coli* Stammes EC1000 mit Präparationen der Phagen-DNA gezeigt werden.

Nach der Transformation mit P53-DNA aus *S. thermophilus* a10 (pAGJ34E) und a10 (pAG106AE) konnten EC1000 Klone mit pAGJ34E bzw. pAG106AE isoliert werden. Plasmidisolierungen aus solchen Klonen zeigt Abb. 17.

Ergebnisse

Mit einer Transformationsrate von 220 KbE/ μ g P53-DNA wurde das Plasmid pAG106AE 110fach häufiger übertragen als das Plasmid pAGJ34E, das eine Transformationsrate von 2 KbE/ μ g DNA erzielte.

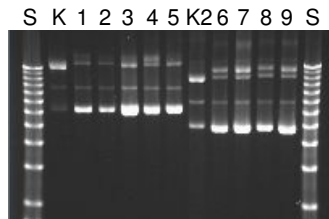


Abb. 17: Plasmidpräparationen aus *E. coli* EC1000 nach Transformation mit P53-DNA. Plasmidpräparationen aus *S. thermophilus* a10 (pAGJ34E) und a10 (pAG106AE); 0,8%iges Agarosegel; S: Molecular Marker X, 0,5 μ g; K1: pAG106AE aus *E. coli* Easypore; 1-5: pAG106AE aus *E. coli* EC1000; K2: pAGJ34E aus *E. coli* Easypore; 6-9: pAGJ34E aus *E. coli* EC1000.

Auftrennung der Plasmid-DNA und Phagen-DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Da in DNA-Präparationen transduzierender Phagen-DNA und konkatemere Plasmid-DNA als unabhängige Moleküle vorlagen, wurde getestet, ob sich beide durch PFGE trennen lassen (Abb. 18). Bei den Präparationen der Phagen-DNA aus plasmidtragenden Stämmen waren zwei Banden auf dem Gel zu beobachten, anstelle von einer, wie es bei der P53-DNA aus plasmidfreien Stämmen der Fall war. Für die Hybridisierung mit P53-DNA als Sonde gab es kein Signal auf der Höhe dieser schmalen Bande. Damit handelte es sich nicht um P53-DNA, sondern wahrscheinlich um konkatemere Plasmid-DNA.

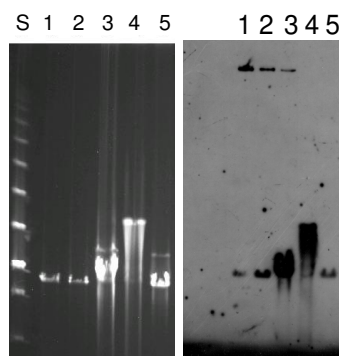


Abb. 18: Pulsfeldgelelektrophorese mit Präparationen aus Phagen-DNA. S: „Low Range PFGE-Marker“ (Biolabs), 2mm; ungerade Ziffern: nicht denaturierte DNA; gerade Ziffern: hitzedenaturierte DNA; 1-2: P53-DNA aus *S. thermophilus*; 3-4: P53-DNA aus *S. thermophilus* a10 (pAGJ34E); 5: P53-DNA aus *S. thermophilus* a10 (pAG106AE), **Rechts:** Hybridisierung des PFGE-Gels mit P53-DNA als Sonde.

Der Einfluss der Plasmidgröße auf die Transduktionshäufigkeit

Die Größe der DNA, die ein Phage in seinen Kopf verpacken kann, entspricht ungefähr seiner Genomgröße. Ein DNA-Fragment, das transduziert werden kann, muss ungefähr dieselbe Größe aufweisen. Ansonsten kann es gar nicht oder nur selten in einen Phagenkopf verpackt werden, da *cos*-Phagen beim Verpacken der DNA diese spezifisch an der *cos*-Stelle abschneiden. Anhand der Größe der transduzierten Plasmide und der erzielten Transduktionshäufigkeiten für P53 (36,7 kb) konnte allerdings kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Quotienten aus Phagengenomgröße/Plasmidgröße und Transduktionshäufigkeit beobachtet werden (siehe Abb. 19). Für das Plasmid pAGJ34E ist der Quotient nahezu ganzzahlig. Das Plasmid ließ sich besser transduzieren als seine beiden Deletionsderivate pAGJ34Δ*cos*-1 und pAGJ34Δ*ori*-1 deren Quotient nahe bei 5,5 liegt. Für die Derivate des Plasmids pAGS4E galt das Gegenteil. Zu beachten ist, dass die Deletionen in den meisten Derivaten Homologien zu Phagengenomen betrafen. Weiterhin kommen in den Homologiebereichen des Plasmids pAGJ34E Sequenzabschnitte mehrfach vor. Diese liegen etwa 200 bis 300 Basenpaare auseinander. In den Derivaten pAGJ34Δ*cos*-1 und pAGJ34ΔΦ-1 ist eine Wiederholung deletiert.

Daher kann mit den Derivaten der Einfluss der Plasmid-Größe auf die Transduktionshäufigkeit nicht unabhängig von dem Einfluss der *cos*-Homologien betrachtet werden.

Ergebnisse

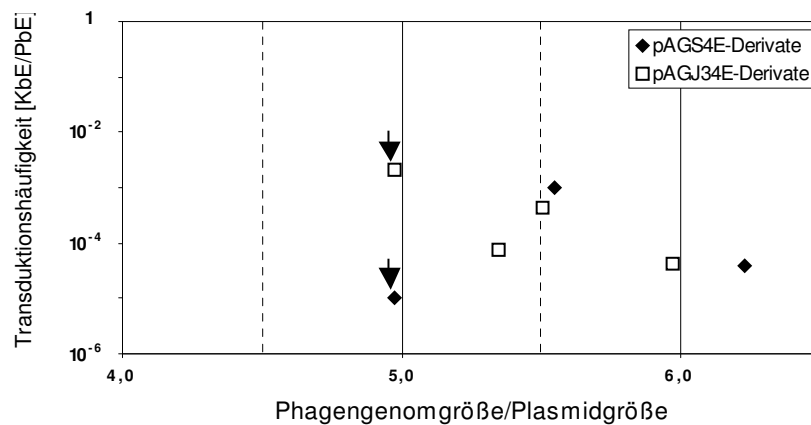


Abb. 19: Transduktionshäufigkeit und Phagengenomgröße/Plasmidgröße im Vergleich. Die schwarzen Pfeile markieren die Plasmide pAGS4E und pAGJ34E.

3.3.3. Transduktion mit *S. thermophilus*-Phagen in Wirts- und Nichtwirtsstämmen

Die oben genannten Transduktionen wurden ausschließlich mit Wirtsstämmen als Rezipienten durchgeführt. Das Spektrum möglicher Rezipienten wurde anhand verschiedener Wirt- und Nichtwirtstämmen überprüft.

Zunächst wurde das Wirtsspektrum verschiedener *S. thermophilus*-Phagen durch Spot-Tests ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tab. 15.

Tab. 15: Wirt-Spektren der Phagen P53, P1109 und a10/J9; Die Ermittlung der Wirtsspektren erfolgte durch Spot-Tests mit Verdünnungsreihen der Phagenlysate. +: phagensensitiv; -: phagenresistent.

Stamm Phage	a10	55n	St	A054	St11	St106	DC2	DC10	DC14	DC15	DC134
P1109	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
P53	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a10/J9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PST	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Die Transduktionen wurden mit den Phagen P53, P1109 und a10/J9 durchgeführt und erfolgten nach dem Standardprotokoll. Die verwendeten Rezipientenstämmen ließen sich in zwei Gruppen einordnen. 1. Stämme, für die Transduktion mit allen drei verwendeten Phagen erfolgreich war, und 2. solche, die sich unabhängig vom verwendeten Phagen nicht als Rezipienten eigneten (Abb. 20). Zu den nicht transduzierbaren Stämmen gehörten *S. thermophilus 55n* (Wirt für P53 und P1109) und St (Wirt für PST). Im allgemeinen jedoch lieferten Transduktionen in

Ergebnisse

Wirtsstämme die höchsten Transduktionshäufigkeiten. Eine Ausnahme hiervon ist der Stamm DC15, der für alle Phagen hohe Transduktionshäufigkeiten aufwies.

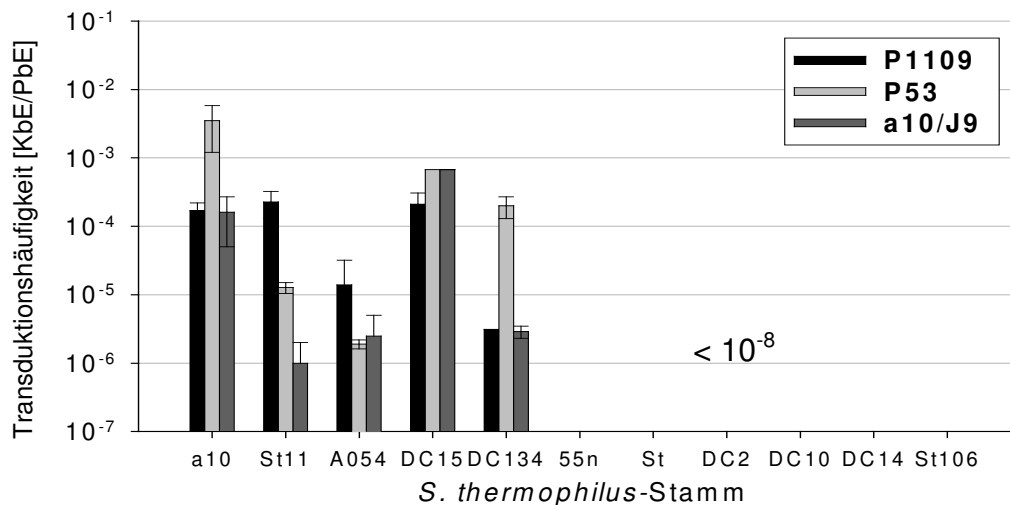


Abb. 20: Transduktion in verschiedene *S. thermophilus*-Stämme. Die Transduktionen erfolgten unter Standardbedingungen; die Phagenkonzentration für Wirtsstämme betrug 3×10^6 PbE/ml, die für Nichtwirtsstämme 3×10^7 PbE/ml. Transduzierte Plasmide waren pAGJ34E (P53 und a10/J9), pAGS4E (P1109) und pAGJ34E (P1109, Stamm A054). Die Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 6 Versuchen.

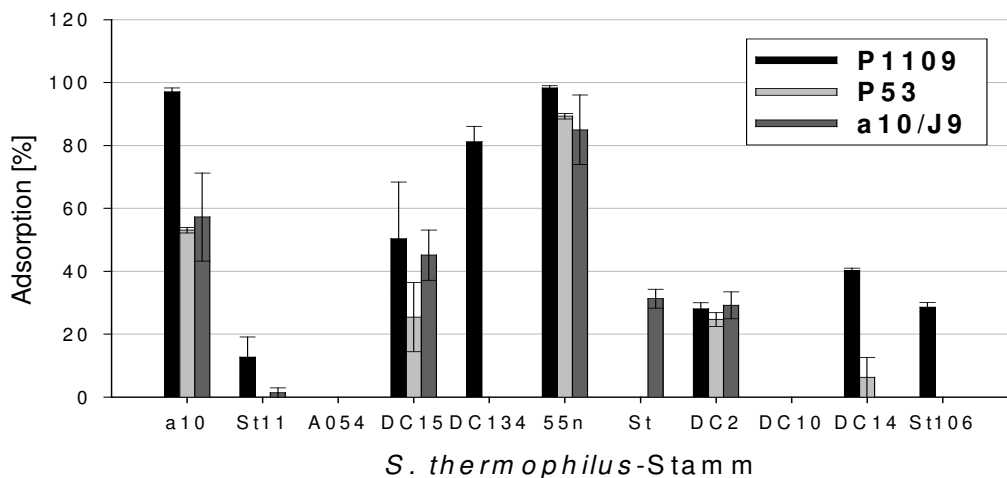


Abb. 21: Adsorption der Phagen P53, P1109 und a10/J9 an die verschiedenen *S. thermophilus*-Stämme der Transduktionsexperimente. Die Adsorptionsversuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Transduktionsversuche durchgeführt. Nach Adsorption erfolgte eine zehnfache Verdünnung der Ansätze in $\frac{1}{4}$ -starke Ringerlösung (mit 1 M NaCl). Die Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 6 Versuchen.

Transduktionslimitierende Faktoren

Um herauszufinden, warum sich einige der Stämme nicht als Rezipienten in Transduktionsexperimenten eigneten, wurden zwei wesentliche Faktoren untersucht, die hierfür eine Rolle spielen können: die Adsorption der Phagen an die Zellen und das Vorkommen von Restriktions-/Modifikationssystemen.

Phagenadsorption

Zur Bestimmung der Adsorption wurden die Ansätze der Adsorptionsversuche nach Phagenadsorption in verschiedenen Puffern verdünnt. Eine zehnfache Verdünnung der Adsorptionsansätze in $\frac{1}{4}$ -starker Ringerlösung (1M NaCl) oder in einer Saccharid-Lösung (je 0,5 M Glukose, Rhamnose und Glucosamin) war geeignet, um reversibel adsorbierte Phagen von den Zellen abzulösen. Erwartungsgemäß zeigten Wirtsstämme trotz des angewandten Verdünnungsverfahrens eine hohe irreversible Adsorption von 50% bis 100%.

Über die Verdünnung in $\frac{1}{4}$ -starker Ringerlösung (1M NaCl) wurde die Adsorption der Phagen P53, P1109 und a10/J9 an alle Stämme der Transduktionsversuche gemessen. Die Versuchsbedingungen für die Adsorption waren identisch zu denen der Transduktionsexperimente. Die Ergebnisse zeigt Abb. 21. Es zeigte sich, dass alle Stämme, für die Transduktionshäufigkeiten über 10^{-4} KbE/PbE erzielt wurden, messbare irreversible Phagenadsorption aufwiesen. Für Stämme mit nachweisbarer aber niedriger Transduktionshäufigkeit war die Adsorption unter der Nachweisgrenze. Letzteres galt ebenso für den Stamm DC10, der sich nicht transduzieren ließ. Die Höhe der gemessenen Adsorption hing von der jeweiligen Phagen/Stamm-Kombination ab (Abb. 21).

Für die meisten nicht transduzierbaren Stämme konnte allerdings eine hohe Adsorption gemessen werden. Fehlende Adsorption ist somit nicht für das Scheitern der Transduktion verantwortlich.

Nachweis von Restriktions-/Modifikationssystemen

In Transduktionen wurden Phagenlysate eingesetzt, die durch die Lyse der *S. thermophilus*-Stämme a10 oder *S. thermophilus* St11 hergestellt wurden. Der Stamm 55n eignete sich in diesen Transduktionen nicht als Rezipient für die in Abb. 20 beschriebenen Plasmide. Nur das Plasmid pNcos53 konnte aus *S. thermophilus* a10 in 55n übertragen werden (2×10^{-4} KbE/PbE). Das Plasmid ist ein Derivat des Plasmids pNZ273 mit klonierter *cos*-Region des Phagen P53. Da in Transformationsexperimenten pNZ273 durch Transformation in 55n übertragbar war, nicht jedoch andere Plasmide, deutet dies auf das Vorhandensein von R/M-Systemen hin. Diese stellen eine häufige Ursache für Probleme bei Transformationen und Transduktion dar. Ein einfacher biologischer Nachweis der R/M-Systeme ist der Vergleich der Plaquebildung auf verschiedenen Stämmen. Bei Titerbestimmungen

Ergebnisse

auf Stämmen mit R/M-Systemen fällt die Anzahl an Plaques geringer aus als bei Stämmen, die über kein R/M-System verfügen. Für den Nachweis eines R/M-Systems in 55n wurden P53-Phagenlysate aus den Stämmen a10 und 55n gewonnen. Anschließend erfolgte eine Bestimmung des Phagentiters durch Spot-Tests mit beiden Stämmen. Für Lysate aus dem Stamm a10 war die „Efficiency of Plating“ (Titer gemessen in 55n/Titer gemessen in a10, EOP) um den Faktor 500 geringer als für Lysate aus dem Stamm 55n (Abb. 22). Um auszuschließen, dass sich dieses Verhalten aus einer Mutation im Phagengenom ergibt, wurden aus den Plaques durch Verdünnung Phagen isoliert und zur Anzucht in a10 und 55n verwendet. Wiederum war die EOP abhängig vom jeweiligen Spenderstamm.

Entsprechende Versuche mit dem Phagen P1109 wurden mit den Stämmen DC2, a10 und 55n durchgeführt (siehe Tab. 16). Die Stämme DC2 und 55n wiesen gegenüber Phagenlysaten aus dem Stamm a10 eine hohe Resistenz auf. Die Stämme DC2 und 55n zeigen somit die Eigenschaften, die für R/M-Systeme typisch sind.

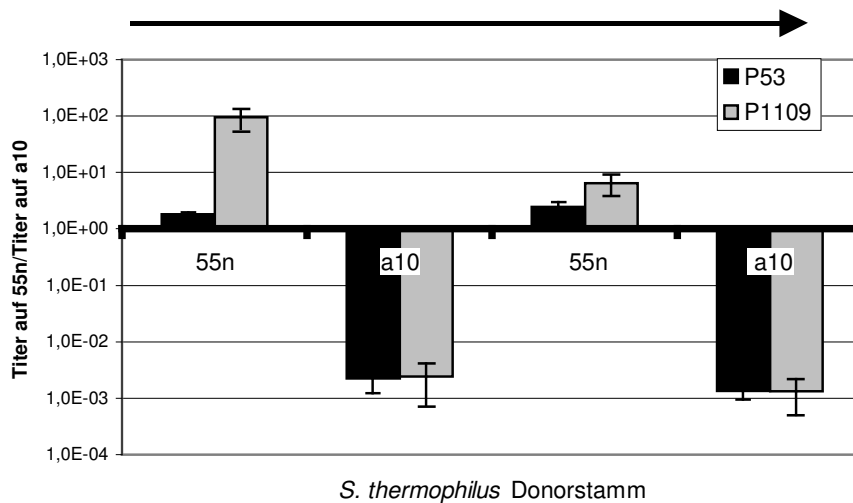


Abb. 22: „Efficiency of plating“ (Titer_{55n}/Titer_{a10}) für P53 und P1109-Lysate in Abhängigkeit des Donorstammes. Auf der X-Achse ist die Herkunft des Lysats aufgetragen. Die Lysate stammten aus sukzessiven Plaquesisolierungen (markiert durch schwarzen Pfeil). Die Werte sind Mittelwerte aus 2 bis 6 Versuchen.

Tab. 16: „Efficiency of plating“ (Titer_{55n}/Titer_{a10}) für P1109-Lysate in Abhängigkeit des Donorstammes.

	<i>S. thermophilus</i> Donor-Stamm		
	a10	DC2	55n
Titer _{DC2} / Titer _{a10}	0 ¹	13,3	n.b. ²
Titer _{55n} / Titer _{DC2}	n.b. ²	1,3	1,2

¹: Es waren keine Plaques auf dem Stamm DC2 zu erkennen; Aufgrund des gemessenen Phagentiters auf dem Stamm a10 entspricht dieses mindestens einer Reduzierung um den Faktor 10⁴.

²: Nicht bestimmt.

Ergebnisse

Ein biochemischer Nachweis der Restriktionsenzyme durch Inkubation der Plasmid-DNA mit Zellrohextrakten ist jedoch nicht gelungen.

Hemmung der Transduktion durch Prophagen

Prophagen können sich durch die Mechanismen der so genannten „superinfection exclusion“ vor der Auslöschung ihres Wirtsstammes durch eine weitere Phageninfektion schützen. Der *S. thermophilus*-Stamm J34 trägt den Prophagen TP-J34, dessen Lipoprotein Resistenz gegenüber Phageninfektionen vermittelt. Um den Einfluss des Prophagen auf die Transduktion zu testen, wurden Transduktionen mit den Phagen P1109 und a10/J9 durchgeführt. Die Transduktionshäufigkeiten waren im allgemeinen sehr gering, weil J34 kein Wirtsstamm der beiden Phagen ist.

Neben dem *S. thermophilus*-Stamm J34 wurden die Derivate J34-6 und J34-12 in Transduktionen mit einbezogen. Der Prophage ist im Derivat J34-12 vorhanden aber nicht mehr induzierbar, der Stamm J34-6 ist vollständig vom Prophagen kuriert. In Transduktionen mit J34-6 ließen sich im Vergleich zu J34-12 und J34 deutlich höhere Transduktionshäufigkeiten erzielen, was zeigt, dass das Vorhandensein des Prophagen die Transduktion inhibiert.

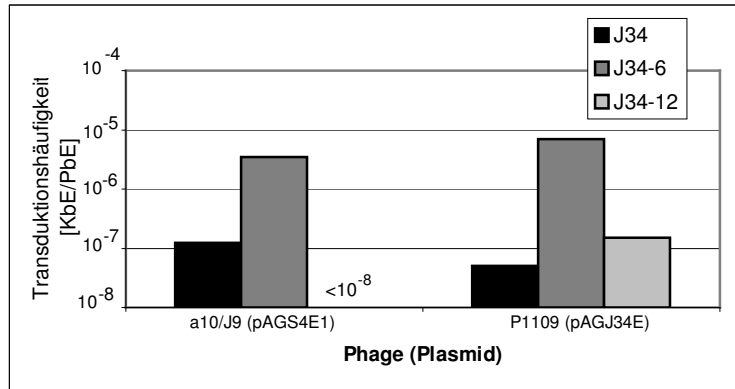


Abb. 23: Transduktion in J34-Derivate. Transduktionsbedingungen: 40 mM CaCl₂, 30 min Adsorption, 50 min Expression. Die Phagenkonzentration entsprach einer M.O.I. von ungefähr 1,0. Die verwendeten Phagen und Plasmide sind auf der x-Achse angegeben. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 4 Versuchen.

Der Prophage exprimiert ein Lipoprotein, das in *S. thermophilus* und *L. lactis* eine Phagenresistenz vermittelt (Sun *et al.*, 2006). Um einen möglichen Einfluss des Lipoproteins auf die Transduktionshäufigkeiten der J34 Derivate zu zeigen, wurden Transduktionsversuche mit den bereits verfügbaren Stämmen *S. thermophilus* 55n(pXMS2) und 55n(pMG36e) (Sun *et al.*, 2006) durchgeführt. Das Plasmid pXMS2 ist ein Derivat des Klonierungsvektors pMG36 mit kloniertem Lipoprotein-Gen. Der Stamm 55n(pMG36e) diente als Kontrolle. Die Transduktion des Plasmids pNcos53

mit P1109, P53 und a10/J9 war jedoch weder für 55n(pXMS2) noch für die Kontrolle 55n(pMG36E) erfolgreich. Das Lipoprotein hatte keinen Einfluss auf die Adsorption.

Transduktion als horizontaler Gentransfer

Anhand der Transduktion in verschiedene *S. thermophilus*-Stämme wurde horizontaler Gentransfer innerhalb der Art *S. thermophilus* gezeigt. Dass Transduktion aber auch horizontalen Gentransfer zwischen Gattungen vermitteln kann, zeigten die Transduktionen mit *S. thermophilus*-Phagen in *L. lactis* Bu2-60.

Diese wurden bei einer CaCl_2 -Konzentration von 100 mM, Adsorptionszeiten von 30 min und einer Phagenkonzentration von 1×10^7 bis 3×10^8 PbE/ml durchgeführt. Das verwendete Plasmid pAG106AE konnte mit Transduktionshäufigkeiten zwischen 4×10^{-9} KbE/PbE und 3×10^{-7} KbE/PbE übertragen werden. Dass es sich bei den Transduktanten um *L. lactis* Bu2-60 handelte, wurde durch einen Spot-Test mit Verdünnungen eines Bu2-60-spezifischen P008-Lysats nachgewiesen. Um auszuschließen, dass evtl. im Lysat vorhandene freie Plasmid-DNA über eine eventuelle natürliche Kompetenz des Stammes Bu2-60 aufgenommen wurde, erfolgten drei Kontrollen: 1. DNase-Zugabe zu den Transduktionsansätzen, 2. Verwendung konzentrierter Plasmid-DNA anstelle des Lysates (bis 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA) und 3. eine Inaktivierung der *S. thermophilus*-Phagenlysate mit polyklonalem Antikörper gegen P53. Verwendung von DNase zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Zahl der erhaltenen Erythromycin-resistenten Klone. Versuche mit Plasmid-DNA anstelle der Phagenlysate verliefen negativ. Die Inaktivierung der Phagen mit Antikörpern zeigte, dass die Transduktionshäufigkeit durch die Antikörper im gleichen Maße reduziert wurde wie die Konzentration freier Phagen (Abb. 24, Tab. 17).

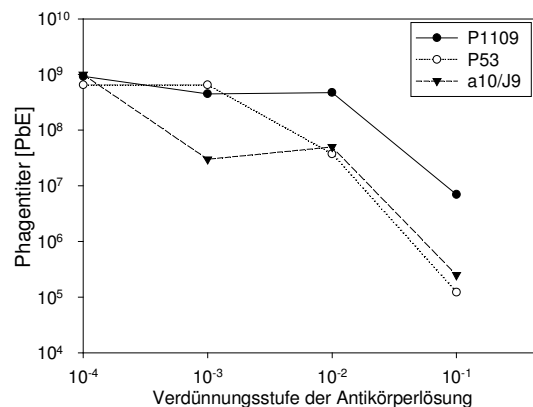


Abb. 24: Inaktivierung der *S. thermophilus*-Phagen durch polyklonalem P53-spezifischen Antikörper. Die Antikörperlösung wurde in 1xPBS Puffer verdünnt. Phagenlysate und Antikörper wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Phagenkonzentration erfolgte über Spot-Tests mit dem *S. thermophilus*-Stamm a10.

Ergebnisse

Tab. 17: Transduktion des Plasmids pAG106AE mit *S. thermophilus*-Phagen in *L. lactis* Bu2-60. Die Daten sind Mittelwerte aus 4 Versuchen.

	<i>S. thermophilus</i> a10			<i>L. lactis</i> Bu2-60		
	P1109	P53	a10/J9	P1109	P53	a10/J9
Transduktionshäufigkeit ohne Antikörper [KbE/PbE]	$2,3 \times 10^{-2}$	$8,5 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$9,3 \times 10^{-7}$	$4,8 \times 10^{-9}$
Transduktionshäufigkeit mit Antikörper ² [KbE/PbE]	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-3}$	0 ¹	$2,0 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-7}$	0 ¹
Hemmung durch Antikörper [%]	28,0	85,7	100,0	40,3	85,4	100,0

¹: Transduktionshäufigkeit unter der Nachweisgrenze von 1×10^8 KbE/PbE.

²: Der Antikörper wurde um den Faktor 10^2 verdünnt (vergl. Abb. 24).

Unabhängig vom verwendeten Phagen war für alle Transduktionen in *L. lactis* eine im Vergleich zu *S. thermophilus* um den Faktor 10^4 geringere Transduktionshäufigkeit charakteristisch.

Plasmidisolierungen zeigten, dass die Plasmide unverändert übertragen wurden (siehe Anhang Abb. 59). Eine Ausnahme bildete das Plasmid pAG106AE, das in Bu2-60 in konkatemerer Form vorlag. Das gleiche Bild zeigte sich, wenn pAG106E durch Transformation übertragen wurde (siehe Anhang Abb. 60).

Trotz verhältnismäßig niedriger Transduktionshäufigkeiten konnte Adsorption des Phagen P53 an *L. lactis* Bu2-60 nachgewiesen werden (Abb. 25). Die gemessene Adsorption lag im Versuch höher als die Adsorption des Phagen P53 an den *S. thermophilus*-Stamm St11. Eine Bu2-60-Transduktante zeigte im Adsorptionsverhalten keine deutlichen Unterschiede zu Bu2-60.

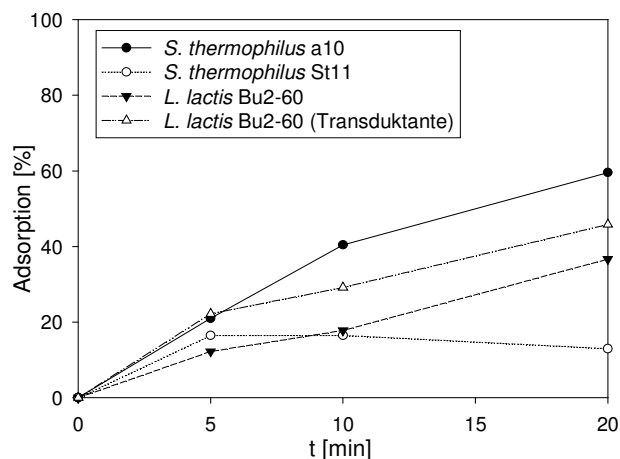


Abb. 25: Adsorption des Phagen P53 an *S. thermophilus* und *L. lactis*. Adsorption bei Raumtemperatur. Die Adsorption errechnet sich aus dem Titer zum Zeitpunkt t und dem Titer zum Zeitpunkt t_0 wie folgt: $100 \times (1 - t/t_0)$.

3.4. Anwendungen der Transduktion

3.4.1. Plasmidkurierung mittels Transduktion von Plasmiden

Viele nativen *S. thermophilus*-Plasmide replizieren sehr stabil, was eine Plasmidkurierung schwierig macht. Transduktionen mit *S. thermophilus* J34 zeigten jedoch, dass das native Plasmid pJ34 in Transduktanten durch das transduzierte Plasmid pAGJ34E ersetzt worden war (siehe Abb. 26). Selektion und Plasmid-Inkompatibilitäten führten also in allen Fällen zum Verlust des nativen Plasmids. Dies konnte genutzt werden, um plasmidfreie Derivate des Stammes J34 durch Replika-Plating zu isolieren.

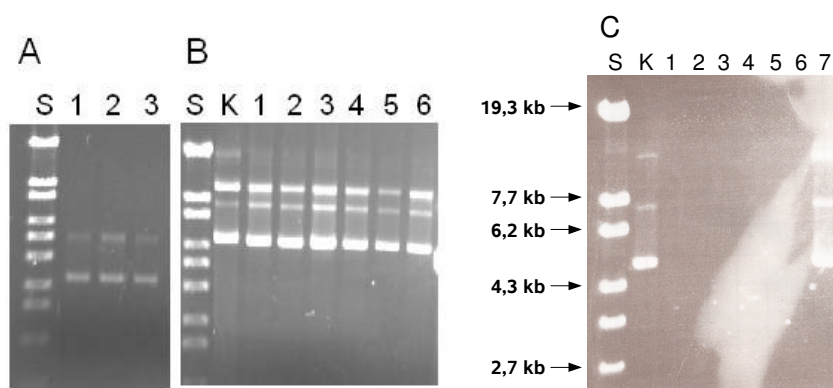


Abb. 26: **A:** 0,8%iges Agarosegel. S: Lambda Styl 0,25 µg; 1-3: pJ34-DNA aus *S. thermophilus* J34 vor Transduktion; **B:** 0,8%iges Agarosegel; S: Lambda Styl 0,25; K: pAGJ34E aus *E. coli* Easypore; 1-6: pAGE34E aus J34. **C:** Plasmidaufschlüsse aus *S. thermophilus* J34-6 nach Plasmidkurierung. 0,8%iges Agarosegel; S: Lambda/Styl, 0,25 µg; K: pAGJ34E aus *S. thermophilus* J34-6; 1-7: J34-6 Klone aus der Plasmidkurierung.

Hierfür wurden Kulturen der Transduktanten ohne Selektionsdruck bis zur stationären Phase angezüchtet, anschließend 1:1000 in frischem Medium verdünnt und wiederum bis zur Stationärphase inkubiert. Nach zehnfacher Wiederholung wurden geeignete Verdünnungen auf thLM17 Agar ausgespatelt und bei 42°C bis zur Koloniebildung inkubiert. Durch Replika-Plating der Kolonien auf thLM17-Agarplatten mit 10 µg/ml Erythromycin konnten sensitive Klone identifiziert werden. Der Anteil an sensitiven Klonen betrug ungefähr 2%. Plasmidaufschlüsse aus den entsprechenden Klonen zeigten, dass in den meisten Fällen das Plasmid pAGJ34E nicht nachweisbar war (siehe Abb. 26). Allerdings trat bei einigen als sensitiv eingestuft Klonen Plasmid-DNA auf. Dennoch ist dieses Verfahren eine effektive Methode zur Plasmidkurierung.

3.4.2. Einfluss der *cos*-Region auf die Phagenresistenz

Für die Lyse einiger *S. thermophilus* St11-Derivate waren im Vergleich zum plasmidfreien Stamm hohe Konzentrationen an P1109 notwendig.

St11 (pAG106AE) konnte gegenüber dem Stamm St11 erst mit einer hundertfach höheren Zahl an Phagen lysiert werden (siehe Abb. 27).

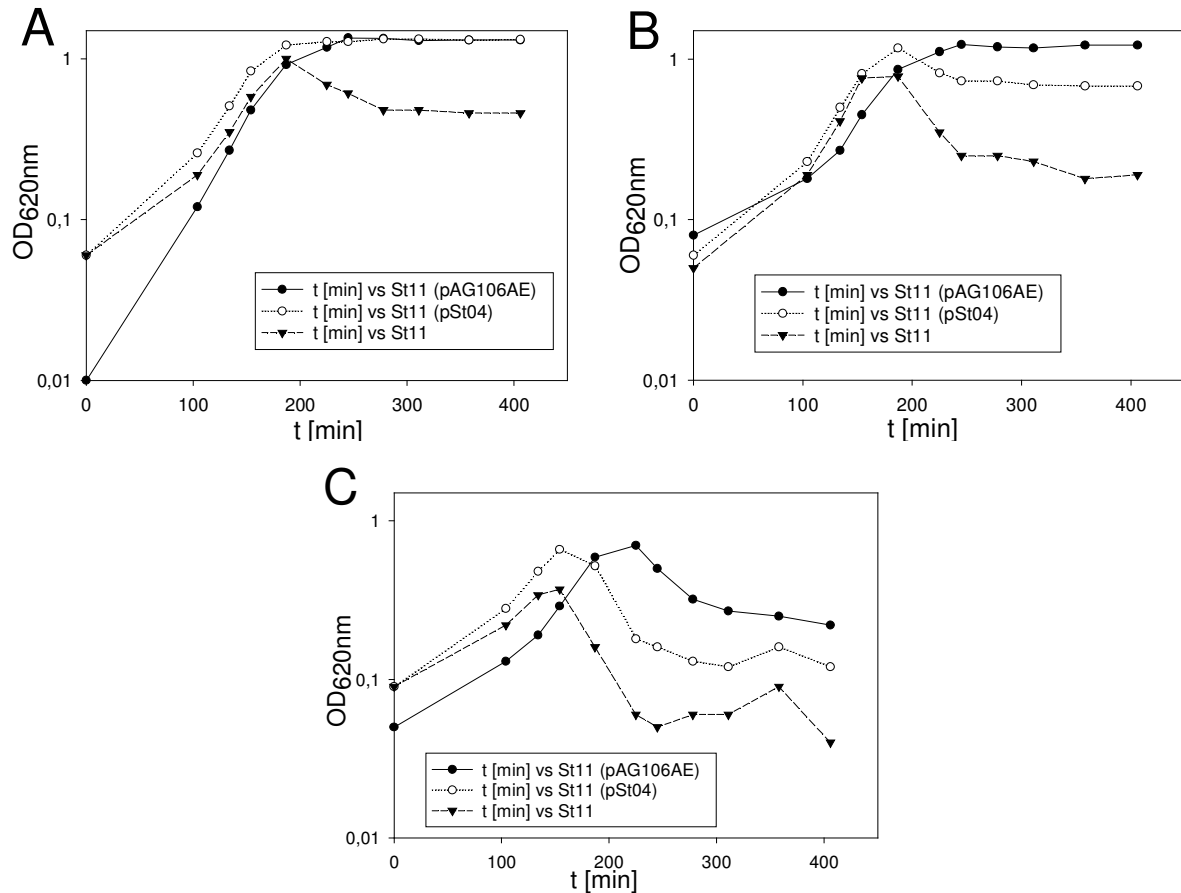


Abb. 27: Lyse der *S. thermophilus*-Stämme St11, St11(pSt04) und St11(pAGSt06E). 0,1 ml Übernachtskultur der Stämme wurde bei Raumtemperatur für 10 min mit P1109-Lysat inkubiert. Die Phagenmenge pro Ansatz betrug A: 10⁶, B: 10⁷ und C: 10⁸ PbE/ml. Anschließend wurde mit 10 ml vorgewärmtem thLM17-Medium verdünnt und bei 42°C bebrütet.

Tab. 18: In Spot-Tests verwendete *S. thermophilus*-Derivate zur Charakterisierung der Phagensensitivität mit den Phagen P53, P1109, a10/J9 (*S. thermophilus* a10) bzw. P1109 (*S. thermophilus* St11).

<i>S. thermophilus</i> -Stamm	pAGS4E-Derivate	pAGJ34E-Derivate	pAG106AE-Derivate	sonstige
a10	pAGS4E pAGS4E1 pAGS4E2	pAGJ34E pAGJ34EΔΦ-1 pAGJ34EΔΦ-2 pAGJ34EΔ <i>cos</i> -1 pAGJ34EΔ <i>cos</i> -2	pAG106AE*	pNZ273 pNcos53 plasmidfrei pSHE1
St11	pAGS4E pAGS4E1*	pAGJ34E pAGJ34EΔ <i>cos</i> -2	pAG106AE* pAG106AE1	plasmidfrei pSHE1 pSt04*

*: Vermittelte eine Verringerung der Sensitivität gegenüber P1109.

Ergebnisse

Spot-Tests, in denen Verdünnungen des Phagen P1109 auf *S. thermophilus* St11-Derivate gespottet wurden (Abb. 28), zeigten, dass einige Plasmide Phagenresistenz vermitteln können. Dies zeigte sich in Spot-Tests mit St11-Derivaten, welche die Plasmide pAGSt016E, pAGS4E1 oder das native *S. thermophilus*-Plasmid pSt04 enthielten. Ein St11-Derivat, welches das nicht transduzierbare Deletionsderivat pAG106AE1 enthielt, in dem die *cos*-Stelle des Plasmids pAG106AE deletiert war, wies keine Resistenz auf.

Obwohl das Plasmid pAGS4E1 eine deutlich verminderte Phagensensitivität vermittelte, war dies für pAGS4E nicht der Fall. Beide Plasmide tragen die selbe *cos*-homologe Region, sind gleichermaßen transduzierbar, unterscheiden sich aber dadurch, dass pAGS4E1 das Gen für das kleine Hitzeschockprotein, sowie die *ori*-homologe Region der *S. thermophilus*-Phagen fehlt. Eine Ursache für die unterschiedlichen Eigenschaften der Plasmide hinsichtlich der Phagenresistenz konnte nicht gefunden werden.

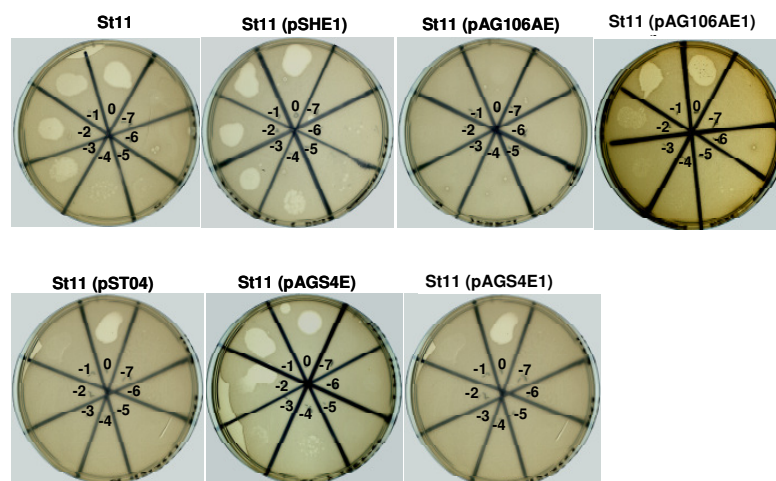


Abb. 28: Spot-Tests mit dem *S. thermophilus*-Phagen P1109 auf *S. thermophilus* St11-Derivaten. Je 20 μ l Verdünnung wurden aufgetragen. In den einzelnen Plattenabschnitten ist der Exponent der Verdünnungsstufe angegeben.

Bei entsprechenden Experimenten mit dem *S. thermophilus*-Stamm a10 vermittelte nur das Plasmid pAG106AE eine verringerte Sensitivität gegen den Phagen P1109. Die Sensitivität gegenüber anderen Phagen blieb jedoch unbeeinflusst (Abb. 29).

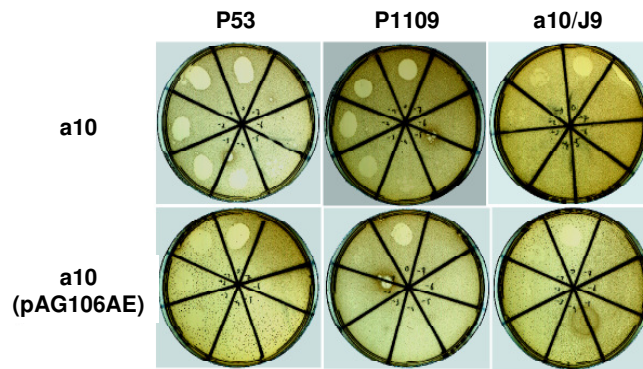


Abb. 29: Spot-Tests mit drei *S. thermophilus*-Phagen auf *S. thermophilus* a10-Derivaten. Je 20 μ l Verdünnung wurden aufgetragen. Links neben den Abbildungen ist der ausplattierte *S. thermophilus*-Stamm angegeben, über den Abbildungen der gespottete Phage.

Einen Überblick über alle getesteten Phagen/Plasmid/Stamm-Kombinationen gibt Tab. 18.

„One-step-growth“-Experimente

Eine mögliche Ursache für die durch Plasmide vermittelte Steigerung der Resistenz gegenüber Phagen ist die Verpackungshäufigkeit der Plasmide in die Phagenpartikel. Diese kann so hoch sein, dass hierdurch die Menge an infektiösen Phagenpartikeln deutlich reduziert wird. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden mit dem Phagen P1109 und Derivaten des Stammes St11 „One-step-growth“-Experimente durchgeführt. Neben der Bestimmung des „Phagen Bursts“ erfolgte zusätzlich eine Bestimmung der Phagenadsorption. Dies war notwendig, weil der Phage P1109 eine verhältnismäßig geringe Adsorption an den Stamm St11 aufweist und daher für die Berechnung der „Burst-Size“ der Anteil an nicht adsorbierten Phagen herausgerechnet werden muss. Der errechnete Wert war für alle getesteten Stämme verhältnismäßig klein und lag zwischen 1 bis 8 freigesetzten virulenten Phagen pro infizierter Zelle. Die Burst-Size für die Stämme St11 (pSt04) und St11 (pAG106AE), deren Plasmide Homologien zu *cos*-Regionen aufwiesen, waren um den Faktor 2 bis 4 geringer als die für St11 (pAG106AE1) und die des plasmidfreien Stammes St11. Eine Auswirkung auf die Latenzzeit konnte nicht beobachtet werden.

Ergebnisse

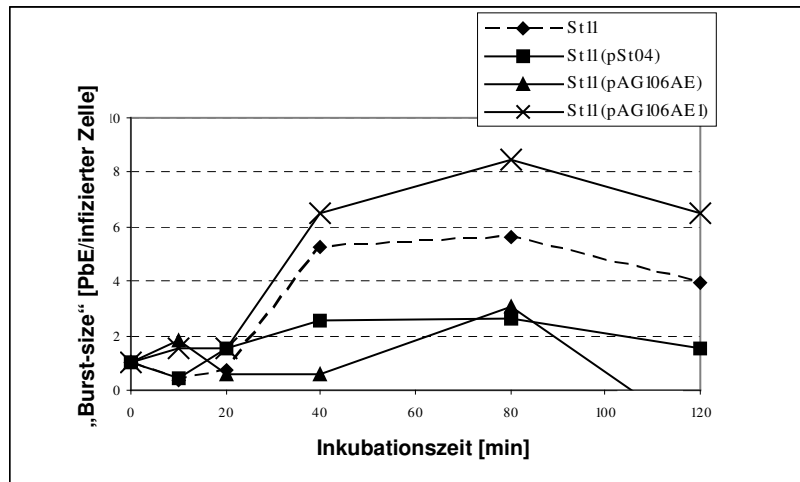


Abb. 30: „One-step-growth“-Experimente mit Derivaten des *S. thermophilus*-Stammes St11. Die Zellen wurden mit P1109 entsprechend einer M.O.I. von 0,1 für 10 min bei 42°C inkubiert. Die Ansätze wurden um den Faktor 10^5 verdünnt und anschließend bei 42°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeiten. Die Burst-Size berechnet sich aus dem Verhältnis zwischen dem Phagentiter zum Zeitpunkt der Probenentnahme und dem Zeitpunkt $t=0$.

3.4.3. Transduktion ohne Selektion: Optimierung des Transduktionsprotokolls

Die in den vorangegangenen Kapiteln genannten Transduktionsbedingungen sind für die Bestimmung der Transduktionshäufigkeiten ausreichend. Die erzielten Transduktionshäufigkeiten sind allerdings nicht hoch genug, um Transduktanten ohne die Anwendung selektiver Markern zu detektieren (vergleiche Kapitel 1.4, S. 17). Um dieses zu ermöglichen, wurden verschiedene Parameter der Transduktion optimiert.

Die Optimierungen umfassten die Methode der Lysatherstellung, die Parameter der Transduktionsversuche (Verdünnungspuffer, Phagen- und Zellmenge, CaCl_2 -Konzentration, Adsorptions- und Expressionszeiten), Behandlung der Zellen und Lysaten (Zellvereinzellung, Verwendung von UV-Licht) und den Einsatz von Methoden zur Erhöhung der Zell/Phagen-Dichte. Die einzelnen Optimierungsversuche werden im Folgendem beschrieben.

Methoden zur Herstellung der Phagenlysate für Transduktionen

Bei der Herstellung der Lysate aus *S. thermophilus*-Kulturen in thLM17-Medium konnten für alle Phagen nur relativ geringe Phagenkonzentrationen von 10^7 PbE/ml bis 6×10^9 PbE/ml erzielt werden. Diese niedrigeren Titer sind typisch für viele *S. thermophilus*-Phagen. Folgende Methoden zur Titererhöhung wurden durchgeführt.

Konzentrierung über Zentrifugation

Zentrifugation der Phagenlysate (Methode nach Brown *et al.* (1994)) oder Reinigung über einen CsCl₂-Gradienten ergaben keine wesentlich höheren Konzentrationen an infektiösen Phagen. Zudem traten noch Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Transduktionen auf. In der Regel ist die Transduktionshäufigkeit bei Anwendung geringer Phagenkonzentrationen (M.O.I. < 1) von der Höhe der verwendeten Phagenkonzentration unabhängig. In Transduktionen mit zentrifugierten P53- und a10/J9-Lysaten war die Transduktionshäufigkeit auch bei niedrigen Phagenkonzentrationen deutlich abhängig von der Phagenkonzentration. Die Größe der Unterschiede schwankte zwischen dem Faktor 3 bis 100. Eine Abschwächung dieses Effekts konnte erreicht werden, indem Verdünnungen der Transduktionsansätze in thLM17 ausplattiert wurden. Der Effekt der Verdünnung war insbesondere bei hohen Phagenkonzentrationen sehr deutlich, bei einer M.O.I. von 10⁻³ war der Effekt dagegen sehr schwach (Abb. 31). Dies zeigt, dass die Lyse der Transduktanten durch infektiöse Phagen nicht vernachlässigt werden kann.

Alternativ wurden Ansätze vor dem Ausplattieren durch Zentrifugation sedimentiert und mit thLM17-Medium gewaschen. Gemessen wurde die Keimzahl der Überstände und die des Sediments. Die Ergebnisse zeigt Tab. 19. Es zeigte sich, dass der Waschschrift die Transduktionshäufigkeit um mehr als den Faktor zehn senkte. Um auszuschließen, dass ein wesentlicher Anteil der Transduktionseignisse erst nach dem Ausplattieren stattgefunden hat, wurde eine Transduktion durchgeführt, bei der die Ansätze direkt nach Zugabe der Phagen zu den Zellen mit 1 ml thLM17-Medium (mit 10 mM Trinatriumcitrat) verdünnt und ausplattiert wurden. Hierbei wurden keine Transduktanten erzielt.

Ergebnisse

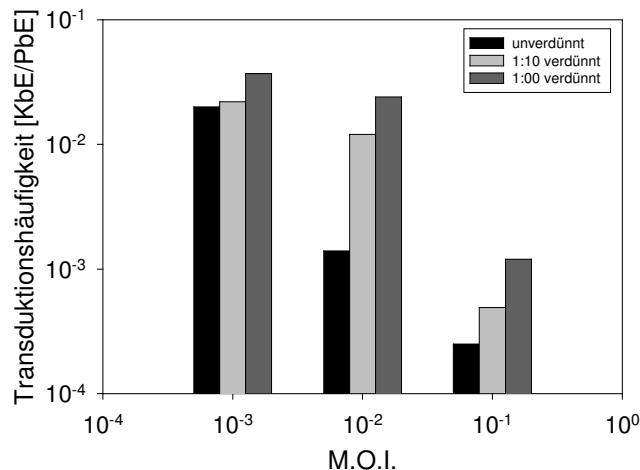


Abb. 31: pAGJ34E-Transduktion mit aufkonzentrierten P53-Lysaten (Brown *et al.*, 1994) in *S. thermophilus* a10. Parameter der Transduktion: 10 mM CaCl₂, 10 min Adsorption, 60 min Expression. Nach der Expression wurden die Ansätze in verschiedenen Verdünnungen mit 3 ml Weichagar ausplattiert.

Tab. 19: Transduktion des Plasmids pAGJ34E mit P53: Effekt des Waschschrilles auf die Transduktionshäufigkeit.

Phagenkonzentration [PbE/KbE]	Transduktionshäufigkeit [KbE/PbE]		
	ohne Waschschrill	Waschrill (Überstand) ¹	Waschschrill (Sediment) ¹
10 ⁻¹	3,4 × 10 ⁻⁴	0 ²	3,3 × 10 ⁻⁵
10 ⁻²	5,6 × 10 ⁻⁴	0 ²	2,5 × 10 ⁻⁵
10 ⁻³	7,0 × 10 ⁻⁴	0 ²	< 2 × 10 ⁻⁵

¹: Der Waschschrill erfolgte durch Zentrifugation der Ansätze (1 min bei 5000g). Das Sediment wurde mit thLM17 (10 mM Trinatriumcitrat, 10 mM MgSO₄) gewaschen, nach erneuter Zentrifugation in 1 ml thLM17 (10 mM Trinatriumcitrat) resuspendiert und mit 3 ml Weichagar ausplattiert. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

²: Es wurden keine Kolonien erhalten.

Nicht aufkonzentrierte Lysate zeigten eine geringere Abhängigkeit der Transduktionshäufigkeit von der Phagenkonzentration.

Eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede ist eine methodisch bedingte Fehlbestimmung der Phagenkonzentration. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigten konzentrierte Lysate Phagenpartikel-Aggregate und an Zelltrümmer adsorbierte Phagen (Abb. 32), was eine geringe Phagenkonzentration vortäuschen kann. Da mit konzentrierten Phagenlysaten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde im Folgenden auf eine Aufkonzentrierung verzichtet.

Ergebnisse

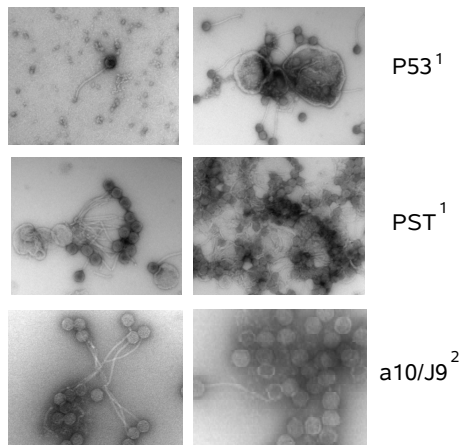


Abb. 32: Elektronenmikroskopische Bilder konzentrierter Lysate. Negativkontrastierung mit Uranylacetat. ¹: Aufkonzentriert durch die Methode nach (Brown *et al.*, 1994). ²: Aufkonzentriert durch Dichtegradienten-Zentrifugation.

Steigerung der Phagenkonzentration durch wiederholte Zugabe frischer Kultur

Als Alternative zur Steigerung der Phagenkonzentration in Lysaten wurden bei der Lysatherstellung eine sukzessive Zugabe frischer Kultur getestet. Beim Einsetzen der Lyse werden Phagen in großen Mengen frei. Durch gezielte Zugabe frischer Zellen und deren Lyse kann im allgemeinen die Phagenkonzentration gesteigert werden.

Bei der Phagenanzucht in *S. thermophilus*-Stämme wurde nach Einsetzen der Lyse 1:10 Volumen einer entsprechenden *S. thermophilus*-Kultur gegeben. Bei dieser Kultur handelte es sich um eine Kultur in der mittleren bis späten logarithmischen Wachstumsphase. Die Zugabe frischer Kultur wurde mehrmals jeweils beim Einsetzen der Lyse wiederholt. Dieses Verfahren ergab jedoch einen Titer, der kleiner war als derjenige, der durch das herkömmliche Verfahren erzielt werden konnte (siehe Tab. 20).

Da der pH-Wert des Mediums einen Einfluss auf die Stärke der Phagenproliferation haben kann (Overcast *et al.*, 1951), wurde die Verwendung eines mit Tris-HCl (pH 7,1) gepuffertem thLM17-Mediums getestet. Der Verlauf der Lyse und die erzielte Phagenkonzentration für diesen Puffer war annähernd identisch zu der im herkömmlichen thLM17-Medium (siehe Abb. 33 und Tab. 20).

Da manche Phagenlysate nach Herstellung schwer zu filtrieren waren, wurde ebenfalls getestet, ob bei der Filtration ein wesentlicher Anteil der im Lysat vorhandenen Phagen mit abfiltriert wird. Im Vergleich sterilfiltrierter Lysate mit

Ergebnisse

unfiltrierten Lysaten war allerdings kein Unterschied in der gemessenen Phagenkonzentration erkennbar.

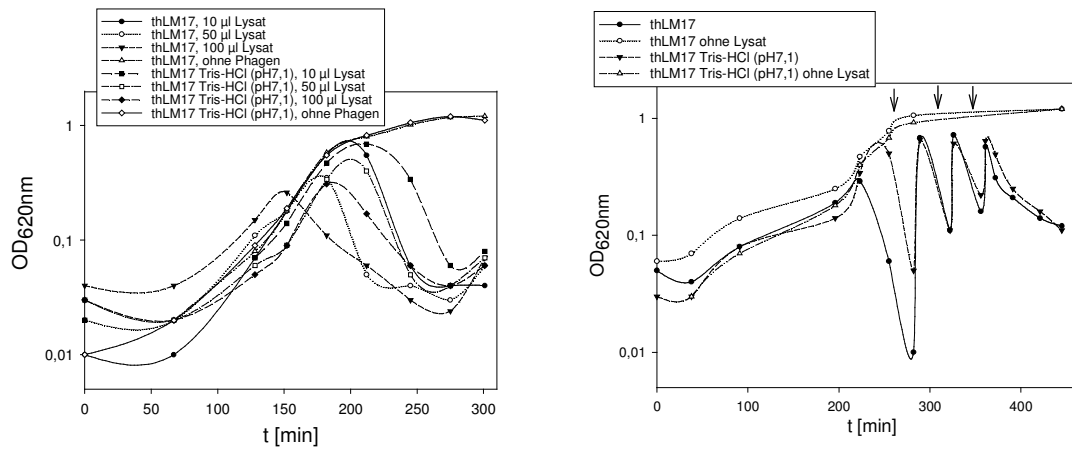


Abb. 33: Herstellung der P53 Lysate mit *S. thermophilus* a10. Vergleich zwischen der Verwendung von thLM17 und thLM17 mit Tris-HCl (pH 7,1). Je 0,1 ml Übernachtskultur wurde mit unterschiedlichen Mengen einer P53-Verdünnung (ungefähr 10^5 PbE/ml) inkubiert. Die Kulturen wurden bei 42°C bis zu vollständigen Lyse inkubiert. Rechts: Zugabe von 1/10 Volumen einer *S. thermophilus* a10 Kultur (mittlere bis späte logarithmische Phase) sind durch schwarze Pfeile markiert.

Tab. 20: Titerbestimmungen für die Lysate aus Abb. 33 durch Plaque-Tests mit *S. thermophilus* a10.

Lysemedium	Kultur-Zugabe bei Lyse ¹	Phagentiter [PbE/ml]
thLM17	ohne	$2,9 \times 10^9$
thLM17 Tris-HCl (pH 7,1)	ohne	$2,5 \times 10^9$
thLM17	3x	$3,7 \times 10^8$
thLM17 Tris-HCl (pH 7,1)	3x	$1,1 \times 10^8$

¹: 1:10 Volumen eine logarithmischen *S. thermophilus*-Kultur wurden beim Einsetzen der Lyse zu den Ansätzen hinzugegeben.

Behandlung der Phagenlysate und *S. thermophilus*-Stämme vor der Transduktion

Einen Überblick über die angewendeten Methoden und deren Effekte auf die Transduktionshäufigkeit gibt Tab. 21.

Tab. 21: Methoden zur Behandlung der Lysate und Zellen für die Steigerung der Transduktion.

	Methode	Effekt
Lysate	Inkubation mit DNase (1 µg/ml)	Verbesserung der Transduktionshäufigkeit um den Faktor 2
	Bestrahlung mit UV-Licht	Verbesserung der Transduktionshäufigkeit um den Faktor 5 bis 100
Zellen	Bestrahlung mit UV-Licht	keine Verbesserung
	Zellvereinzellung durch Ultraschall	Verbesserung des Transduktanten/Zellen Quotienten um den Faktor 2 bis 4
	Vorkultur aus logarithmischer Wachstumsphase	Verbesserung des Transduktanten/Zellen Quotienten um den Faktor 2 bis 4

Auswirkung der Behandlung der Phagenlysaten mit DNase

DNase wird bei Transduktionen in Kontrollen eingesetzt, um eine DNA-Übertragung durch Transformation auszuschließen. Bei den Transduktionen mit *S. thermophilus* konnte eine leichte Zunahme der Transduktionshäufigkeit beobachtet werden.

Abb. 34 zeigt Transduktionen mit P53-Lysaten nach Behandlung der Lysate mit DNase. Die Lysate wurden bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen an DNase inkubiert. Anschließend wurden sie in Transduktionen eingesetzt. Zusätzlich wurde bei einer Probe während der Lysatherstellung beim Eintreten der Lyse DNase hinzu gegeben (1 µg/ml). Die ermittelten Transduktionshäufigkeiten waren für alle eingesetzten DNase-Konzentrationen sehr ähnlich. Die Lysate mit einer DNase-Konzentration von 1 µg/ml lieferten jedoch eine knapp doppelt so hohe Transduktionshäufigkeit wie die unbehandelten Lysate. Der Einsatz höherer Konzentrationen an DNase führte zu einer leichten Verminderung der Übertragungshäufigkeit.

Ergebnisse

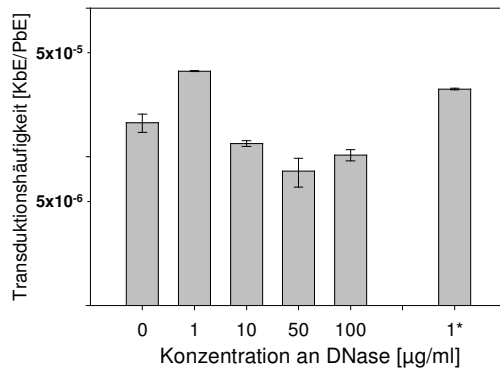


Abb. 34: Transduktion des Plasmids pSHE1 mit P53-Lysaten in *S. thermophilus* a10 nach Behandlung mit DNase. Die Transduktion erfolgte unter Standardbedingungen. Nach Filtration der Lysate wurden sie mit DNase bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend für die Transduktion eingesetzt. * 1 µg/ml DNase wurde bei der Lysatherstellung hinzugegeben.

Bestrahlung der Lysate mit UV-Licht

In Transduktionen kann durch die Bestrahlung der Phagenlysate mit UV-Licht die Zahl an infektiösen Phagen gesenkt werden. Die Transduktionshäufigkeit nimmt in der Regel in geringerem Maße ab. Weiterhin kann UV-Bestrahlung Rekombinationsprozesse anregen, was zu einer Erhöhung der Transduktion führen kann. Um den Einfluss der UV-Licht-Bestrahlung auf Transduktionen in *S. thermophilus* zu untersuchen, wurden Phagenlysate unmittelbar vor der Transduktion, wie in 2.4.5 (Seite 26) beschrieben, mit UV-Licht bestrahlt. Die Abnahme der Konzentration an infektiösen Phagen zeigt Abb. 36. Die Reduktion des Titers verlief annähernd logarithmisch. Abb. 35 zeigt die erzielten Übertragungshäufigkeiten und die Auswirkung der Bestrahlung auf die Phagenkonzentration. Die Transduktionshäufigkeit wurde sowohl mit der Phagenkonzentration vor als auch nach UV-Bestrahlung berechnet. Auf der Grundlage der Phagenkonzentration nach UV-Behandlung berechnet, erhöhte sich die Transduktionshäufigkeit für das Plasmid pAGJ34 leicht, während für das Plasmid pSHE1 sogar die absolute Zahl an erzielten Transduktanten anstieg. Damit ist die Bestrahlung eine Methode, um Transduktionshäufigkeiten zu erhöhen.

Ergebnisse

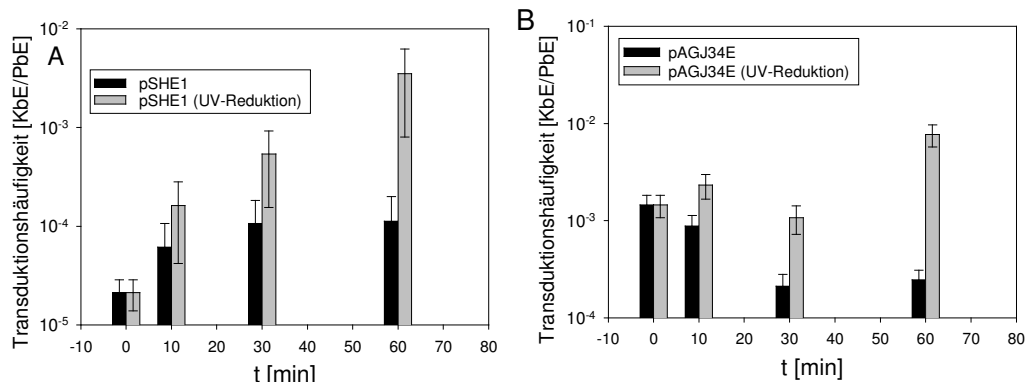


Abb. 35: Transduktion mit P53 in *S. thermophilus* a10. Lysate wurden unmittelbar vor der Transduktion mit UV-Licht bestrahlt (254 nm). Die Transduktion erfolgte unter Standardbedingungen. Die Dauer der Bestrahlung ist auf der X-Achse angegeben. Die Transduktionshäufigkeit wurde einerseits aufgrund der ursprünglichen Phagenkonzentration berechnet (schwarze Balken) und andererseits auf der Basis der Phagenkonzentration nach UV-Reduktion (graue Balken). Die Daten sind Mittelwerte aus 4 Versuchen.

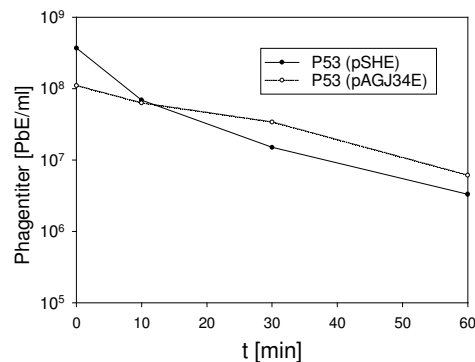


Abb. 36: Reduktion der Titer in P53-Lysaten durch UV-Bestrahlung. Auf der X-Achse ist die Dauer der Bestrahlung aufgetragen. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Auswirkung der Bestrahlung der *S. thermophilus*-Zellen mit UV-Licht

Die UV-Bestrahlung der Rezipienten-Zellen führte zu keiner deutlichen Erhöhung der Transduktionshäufigkeit, unabhängig davon, ob die Bestrahlung vor oder nach der Adsorption der Phagen an die Zellen stattfand (Abb. 37). Die Bestrahlung der Zellen nach Adsorption hatte eine Reduzierung der Übertragungshäufigkeit um den Faktor 10 zur Folge. Die entsprechende Kontrolle ohne UV-Bestrahlung zeigte allerdings ebenfalls eine Abnahme der Übertragungshäufigkeit. Die geringsten Übertragungshäufigkeiten wurden für die Durchflussgeschwindigkeiten 1000 und 750 (gerätespezifische Einheiten) gemessen. Der statistische Fehler dieser Messungen war groß.

Ergebnisse

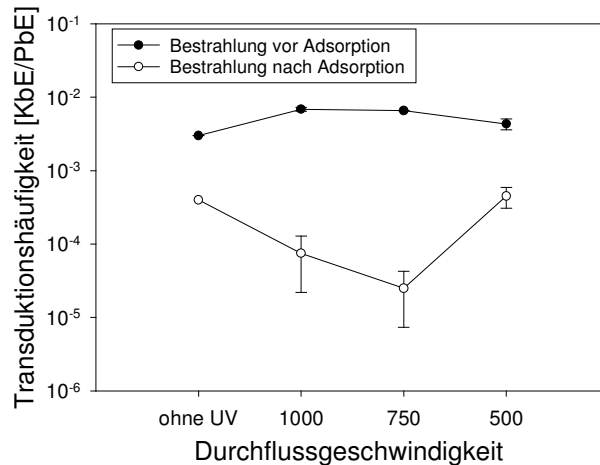


Abb. 37: Transduktion des Plasmids pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* a10. Die *S. thermophilus* a10 Zellen wurden entweder vor oder nach der Adsorption der Phagen an die Zellen mit UV-Licht bestrahlt. Transduktionsbedingungen: 40 mM CaCl₂, Zellkonzentration 3 × 10⁶ KbE/ml, Adsorptionszeit 30 min, Expressionszeit 50 min. Die Durchflussgeschwindigkeit ist in gerätespezifischen Einheiten angegeben.

Vereinzelung der *S. thermophilus* Rezipienten-Zellen vor Transduktion

Für die Identifizierung der Transduktanten ohne Selektion ist es notwendig, dass die Empfängerzellen als Einzelzellen vorliegen, da innerhalb einer Zellkette die Transduktante durch eine Überzahl an plasmidfreien Zellen überwachsen werden würde.

S. thermophilus-Zellen sind in Ketten angeordnet. Die verwendeten *S. thermophilus*-Stämme wiesen unterschiedliche Zellzahlen pro Kette auf, die innerhalb einer Kultur sehr variabel waren. Die Bestimmung der Anzahl der Zellen pro Kette erfolgte durch mikroskopisches Auszählen von 50 bis 100 Zellketten verschiedener *S. thermophilus*-Kulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (OD_{620nm} von 0,5 bis 0,55). In Kulturen des Stammes 55n traten Ketten mit bis zu 80 Zellen auf (Tab. 22).

Um eine Zellvereinzelung zu erreichen, wurden zwei Methoden angewendet: Inkubation der Zellkulturen mit Lysozym und Behandlung mit Ultraschall. Die Behandlung durch Lysozym erwies sich als wenig geeignet, da nur ein kleiner Anteil an Zellen die für eine Zellvereinzelung benötigte Enzymkonzentration überlebte.

Die Ultraschallbehandlung (siehe Kapitel 2.4.8, Seite 27) lieferte eine gute Vereinzelung (Abb. 38) bei relativ hoher Ausbeute an lebenden Zellen (ca. 7-48%).

Ergebnisse

Tab. 22: Bestimmung der Anzahl an Zellen pro Kette für Kulturen verschiedener *S. thermophilus*-Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen der *S. thermophilus*-Stämme a10, St und 55n wurden geerntet und in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Für St11 wurde direkt die Kultur in thLM17 verwendet.

Zellen/Kette	<i>S. thermophilus</i>			
	a10	55n	St	St11
Median (Zellzahl)	7	12	8	3
Standardabweichung	7	11	6	3

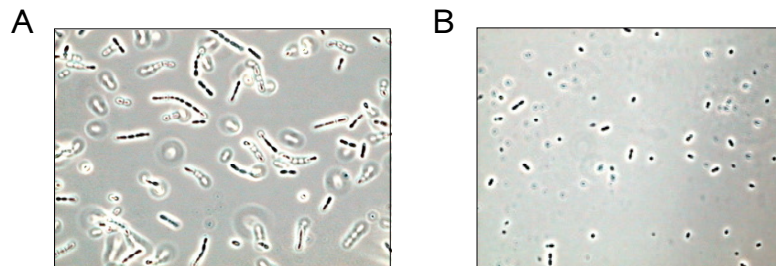


Abb. 38: *S. thermophilus*-Kultur a10 vor (A) und nach (B) der Behandlung mit Ultraschall in 10 mM MgSO₄.

Die Vereinzelung der Zellen vor der Transduktion hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der Transduktionshäufigkeit. Da allerdings in einer Kultur nach Zellvereinzelung im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur bis zu 20% an lebenden Zellen vorliegen, ist der Anteil an Transduktanten/Gesamtkeimzahl für die Zellvereinzelung etwas größer (Tab. 23).

Tab. 23: Transduktion des Plasmids pAGS4E1 mit P53 in *S. thermophilus* a10. Die Transduktion wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

Phagenkonzentration [Phagen/Zelle]	Transduktionshäufigkeit [KbE/PbE]		Transduktanten/Zelle	
	ohne Ultraschall ¹	mit Ultraschall ¹	ohne Ultraschall ¹	mit Ultraschall ¹
0,1	$9,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-5}$
1	$9,6 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$

¹: Ultraschallbehandlung wie in 2.4.8, Seite 27 beschrieben durchgeführt. Anteil an KbE/ml gegenüber unbehandelter Kultur betrug in diesem Versuch 48%. Unter Berücksichtigung der Anzahl der Zellen pro Zellkette entspricht das einem Anteil an lebenden Zellen von 7%.

Status der Vorkultur

Dass der Status der Vorkultur einen Einfluss hat, ist aus früheren Arbeiten bekannt (Lefringhausen, 1996). Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden (siehe Tab. 24). Die Bestimmung des Quotienten Transduktanten/Zelle ergab eine Steigerung um den Faktor 2 bei Verwendung einer Vorkultur in der logarithmischen Phase.

Ergebnisse

Tab. 24: Transduktion in Abhängigkeit vom Status der Vorkultur. Transduktion des plasmids pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* unter Standardbedingungen.

Status der Vorkultur	Transduktionshäufigkeit [KbE/PbE]
Übernachtskultur	$5,0 \times 10^{-3}$
log-Phasen Kultur ($OD_{620nm}=0,5$)	$1,1 \times 10^{-2}$

Optimierung des Transduktionsprotokolls

Eine Übersicht über die zu optimierenden Parameter gibt Tab. 25.

Tab. 25: Übersicht zur Optimierung verschiedener Parameter des Transduktionsprotokolls.

Parameter	Methode	Erhöhung der Transduktionshäufigkeit bzw. des Transduktanten/Zelle Quotienten
Phagenkonzentration	Verwendung einer Phagenkonzentrationen größer als 3×10^7 PbE/ml	3x (Transduktanten/Zelle)
Zellkonzentration	Zellkonzentration von 2×10^6 bis 2×10^7 KbE/ml	2-300x (Transduktanten/Zelle)
Adsorptionszeit	Adsorptionszeiten 5-10 min (<i>S. thermophilus</i> a10) bzw. bis 60 min (<i>S. thermophilus</i> St11)	1x (Transduktionshäufigkeit) <i>S. thermophilus</i> a10 50x (Transduktionshäufigkeit) <i>S. thermophilus</i> St11
Expressionszeit	Expressionszeit zwischen 30 und 50 min	1-10x (Transduktionshäufigkeit)
CaCl ₂ -Konzentration	>80 mM	50x (Transduktionshäufigkeit)

†: Die Erhöhung ist im Vergleich zu den Transduktionshäufigkeiten unter Standardbedingungen angegeben: 10mM CaCl₂, 10 min Adsorptionsphase, 50 min Expressionsphase, 2×10^7 KbE/ml (*S. thermophilus* a10) bzw. 2×10^8 KbE/ml (*S. thermophilus* St11), Phagenkonzentration 2×10^6 PbE/ml.

Optimierung der Phagenkonzentration

Durch das häufige Auftreten von Mehrfachinfektionen tritt bei hohen Phagenkonzentrationen (M.O.I. > 1) eine Abnahme der Transduktionshäufigkeit auf. Vor dem Hintergrund einer selektionsfreien Übertragung der Plasmide durch Transduktion ist jedoch der Quotient Transduktanten/Zelle zu maximieren. Aus statistischen Grundüberlegungen zu Mehrfachinfektionen und Transduktionshäufigkeiten kann von einer Erhöhung des Transduktanten/Zellverhältnis für hohe Phagenkonzentrationen ausgegangen werden (Abb. 39). Für Zell- und Phagenkonzentrationen größer als 1×10^6 KbE/ml bzw. 1×10^6 PbE/ml ist der Anteil an Zellen, der durch die Anzahl „n“-Phagen infiziert wird, nach der Poisson-Verteilung zu berechnen. Betrachtet man die Konzentration an Phagenpartikeln mit Plasmid-DNA getrennt von der Konzentration der infektiösen Phagen, ergibt sich für die Transduktionseignisse eine eigene Verteilung. Da für die Versuche hohe Phagenkonzentrationen verwendet werden, können die

Ergebnisse

Ereignisse „Zelle durch virulenten Phagen infiziert“ und „Zelle nimmt Plasmid durch einen Phagen auf“ als unabhängig voneinander bezeichnet werden. Die Wahrscheinlichkeit P , dass eine Zelle mindestens durch einen Phagen Plasmid-DNA aufnimmt aber durch keinen infektiösen Phagen infiziert wird, ist daher gleich dem Produkt $P_{\text{Plasmid}}(>0)$ und $P_{\text{Infektion}}(0)$. Dieser Ausdruck wird dividiert durch den Anteil an Zellen, der weder Plasmid-DNA aufgenommen hat, noch durch einen Phagen infiziert wurde. Durch Kürzen und Vereinfachen kommt man für den Quotienten Transduktanten/Zelle zu folgender Formel:

$$\text{Transduktanten/Zelle} = (1 - P_{\text{Plasmid}}(0)) / P_{\text{Plasmid}}(0).$$

Die Anwendung dieser Formel zeigte, dass der Quotient Transduktanten/Zelle linear mit der Phagenkonzentration ansteigt (Abb. 39 links).

Zum Testen dieser Hypothese wurden in Transduktionsversuchen verschiedene Phagenkonzentrationen eingesetzt und sowohl die Transduktionshäufigkeit, als auch die Keimzahl nach Transduktion gemessen (Abb. 39). Mit zunehmender Phagenkonzentration nahmen sowohl die Keimzahl, als auch die Transduktionshäufigkeit ab, wobei letztere etwas stärker als die Keimzahl abnahm. Für hohe Phagenkonzentrationen traten jedoch verhältnismäßig große Schwankungen in den Messungen auf. Mit einer M.O.I. von 10 konnte ein dreimal so hoher Transduktanten/Zelle Quotient erzielt werden wie für eine M.O.I. von 1.

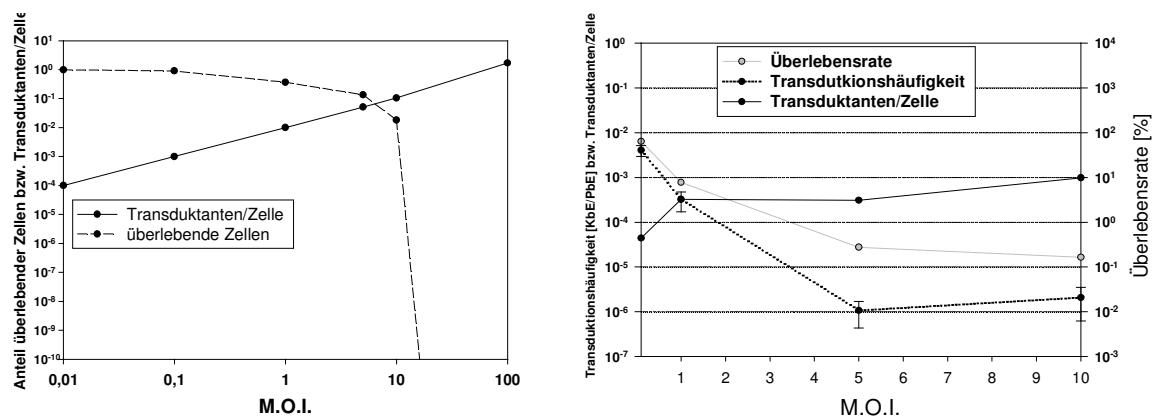


Abb. 39: Links: Theoretische Berechnung des Quotienten Transduktanten/Zelle und des Anteils an überlebenden Zellen. Exemplarisch berechnet unter der Annahme, dass jedes hundertste Phagenpartikel Plasmid-DNA enthält. **Rechts:** Transduktion des Plasmids pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* St11. Transduktionsbedingungen: 40 mM CaCl₂, 30 min Adsorption, Expression 50 min, Zellkonzentration 3x10⁷ KbE/ml. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Optimierung der Zellkonzentration

Die Infektionswahrscheinlichkeit von Zellen durch Phagen ist für hohe Zell- und Phagenkonzentrationen poissonverteilt. Für geringere Zellkonzentrationen ist das Aufeinandertreffen von Phagen und Zellen weniger wahrscheinlich. Für die Transduktion bedeutet dies eine Verringerung der Übertragungshäufigkeit. Falls jedoch die Abnahme der Transduktionshäufigkeit kleiner ist als die Verringerung der Zellkonzentration, könnte die Verwendung geringer Zellkonzentrationen ein größeres Transduktanten/Zell Verhältnis ergeben. Um dieses zu prüfen, wurden Transduktionen in *S. thermophilus* a10 und St11 mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen durchgeführt. Zellsuspensionen in 10 mM MgSO₄ wurden unverdünnt sowie in einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 eingesetzt. Die Unterschiede der Zellkonzentrationen für *S. thermophilus* a10 und St11 in Tab. 26 ergaben sich aus den Unterschieden der Keimzahl bei einer OD_{620nm} von 0,5 (siehe auch Tab. 22, Seite 76). Für *S. thermophilus* a10 konnte mit einer Zellkonzentration von 2x10⁶ KbE/ml eine 300fache Steigerung des Quotienten Transduktanten/Zelle erreicht werden. Dieses ging einher mit einer Steigerung der Transduktionshäufigkeit. Für die Transduktionen in *S. thermophilus* St11 mit P1109 konnte mit einer Zellkonzentration von 2x10⁷ die höchste Transduktionseffizienz erzielt werden.

Tab. 26: Transduktion des Plasmids pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* a10 und pAGS4E mit P1109 in St11 mit verschiedenen Zellkonzentrationen. Transduktionsbedingungen: Phagenkonzentration 10⁹ PbE/ml, 100 mM CaCl₂, 30 min Adsorption, 50 min. Die Daten sind Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen.

pAGJ34E mit P53 in <i>S. thermophilus</i> a10			
Verdünnung der Zellsuspension	Zellkonzentration [KbE/ml]	Transduktanten/Zelle	Transduktionshäufigkeit
unverdünnt	2x10 ⁷	9,4x10 ⁻⁶	1,6x10 ⁻⁷
1:10	2x10 ⁶	2,8x10 ⁻³	8,9x10 ⁻⁷
1:100	2x10 ⁵	- ¹	- ¹
pAGS4E mit P1109 in <i>S. thermophilus</i> St11			
Verdünnung der Zellsuspension	Zellkonzentration	Transduktanten/Zelle	Transduktionshäufigkeit
unverdünnt	2x10 ⁸	8,33x10 ⁻³	1,1x10 ⁻⁴
1:10	2x10 ⁷	1,85x10 ⁻²	1,2x10 ⁻⁵
1:100	2x10 ⁶	1,24x10 ⁻²	9,8x10 ⁻⁷

¹: Für diese Zellkonzentration wurden keine Transduktanten erhalten.

Optimierung der Adsorptionszeit

Aus den Adsorptionsversuchen ging hervor, dass nach 10 min, abhängig von der verwendeten Phagen/Rezipientenkombination, nur zwischen 10% bis 50% der Phagen nicht an Rezipienten-Zellen adsorbiert waren. Um maximale

Ergebnisse

Transduktionshäufigkeiten zu erzielen, erfolgten Transduktionen mit variablen Adsorptionszeiten. Die Dauer der Inkubation nach Ende der Adsorptionsphase (Expressionszeit) betrug hierbei 50 min. Als zweiter Parameter wurde außerdem unter Verwendung einer Adsorptionszeit von 10 min die Dauer der Expressionsphase variiert. Für den Phagen P1109 waren in Adsorptionsversuchen nach 10 min Inkubation mit *S. thermophilus* St11 nur etwa 10% der Phagen adsorbiert (siehe Phagenadsorption, S. 58). Durch eine Verlängerung der Adsorptionszeit konnte die Transduktionshäufigkeit um den Faktor 50 gesteigert werden. Nach 10 min Adsorption (gesamte Inkubationszeit 60 min) trat zunächst jedoch eine starke Abnahme der Übertragungshäufigkeit auf. Diese Abnahme war auch bei den Versuchen mit variabler Expressionsdauer zu beobachten und trat zu einem vergleichbaren Zeitpunkt ein. Nach Erreichen eines Minimums erhöhte sich mit zunehmender Dauer der Adsorptionsphase die Transduktionshäufigkeit bis zu einem maximalem Wert von 2×10^{-3} KbE/PbE. Ein Anstieg der Transduktionshäufigkeit nach Erreichen eines Minimums konnte für Experimente mit variablen Expressionszeiten nicht beobachtet werden, was die Adsorption als Ursache für den Anstieg der Transduktionshäufigkeit ausweist. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Transduktionen des Plasmids pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* a10. Ein Maximum wurde hier bereits mit einer Adsorptionszeit von 5 min erreicht. Die Versuche zeigen, dass die optimale Adsorptionszeit für jede Phagen/Empfängerstammkombination individuell ermittelt werden muss.

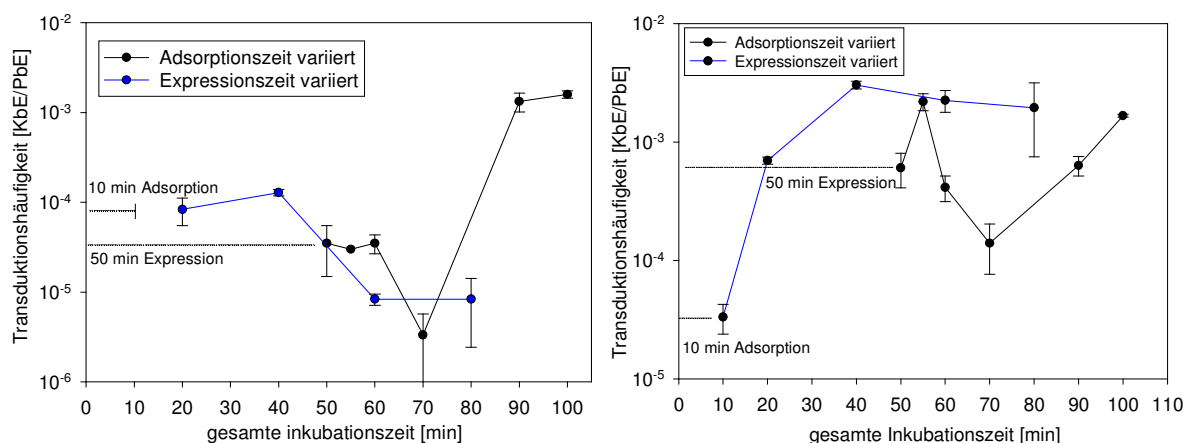


Abb. 40: Transduktionen des Plasmids pAGS4E mit P1109 in *S. thermophilus* St11 (links) und pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* a10 (rechts): variable Adsorptions- und Expressionszeiten. Die Transduktionen wurden unter Verwendung der Standardbedingungen durchgeführt. Die M.O.I. betrug 10^{-3} (St11) und 10^{-2} (a10). Transduktion mit variabler Adsorptionszeit wurden mit einer Expressionszeit von 50 min durchgeführt, für die Variation der Expressionszeit dauerte die Adsorptionsphase 10 min. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Optimierung der CaCl_2 -Konzentration

Ca^{2+} wird für die Injektion der Phagen-DNA benötigt (Steensma und Blok, 1979). Transduktionsexperimente mit dem Phagen P53 zeigten, dass eine Erhöhung der CaCl_2 -Konzentration die Häufigkeit der Plasmidübertragungen steigern konnte (Abb. 41). Bei einer CaCl_2 -Konzentration von 80 mM konnte gegenüber der Konzentration von 10 mM eine 50fache Steigerung der Transduktionshäufigkeit erzielt werden. Bei dieser Konzentration trat ein intensiver Niederschlag auf, der wahrscheinlich aus Calciumphosphat bestand. In Transduktionsansätzen ohne CaCl_2 konnten keine Transduktanten erhalten werden.

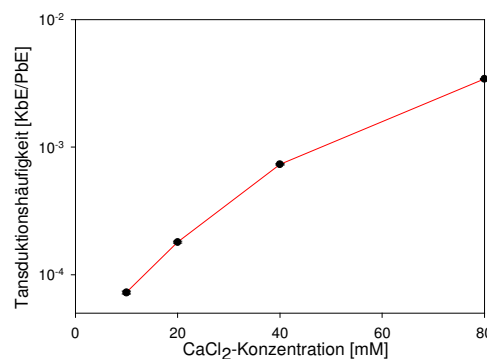


Abb. 41: Einfluss der CaCl_2 -Konzentration auf die Transduktionshäufigkeit des Plasmids pAGJ34E mit P53 in *S. thermophilus* a10. Transduktion unter Standardbedingungen bei einer M.O.I. von 0,1.

Versuche zur Erhöhung der Zell/Phagendichte

Die Möglichkeit das Transduktanten/Zelle-Verhältnis zu erhöhen war stark durch die geringen Phagenkonzentrationen in Lysaten aus *S. thermophilus* begrenzt. Eine Erhöhung der Phagenkonzentration konnte jedoch nicht erreicht werden (vgl. S. 67). Da *S. thermophilus*-Phagen sehr schnell reversibel an Zellen adsorbieren konnten, wurde der Versuch unternommen, nach Zugabe der Phagen die Zell/Phagendichte durch Zentrifugation der Ansätze zu erhöhen. Diese Methode erbrachte jedoch weder eine Erhöhung der Transduktionshäufigkeit, noch eine Erhöhung des Transduktanten/Zelle Quotienten. Beide Faktoren nahmen sogar geringfügig ab.

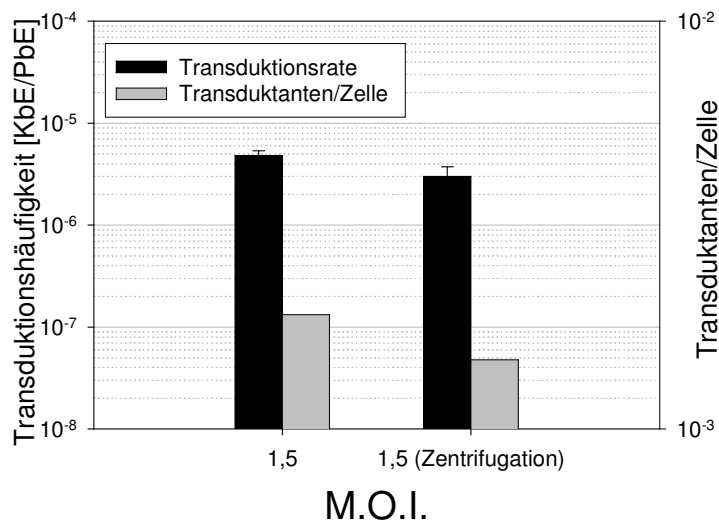


Abb. 42: Transduktion mit Erhöhung der Zell/Phagendichte durch Zentrifugation. Transduktion des Plasmids pAGS4E mit P1109 in *S. thermophilus* St11. Phagenkonzentration: $3,5 \times 10^8$ /ml; 40 mM CaCl₂, 30 min Adsorption, 50 min Expression, Zellen durch Ultraschall vereinzelt.

Übertragung der Plasmide durch Transduktion ohne Selektion

Nach Optimierung verschiedener Parameter (CaCl₂-Konzentration, Zellkonzentration, Adsorptionszeit, Phagenkonzentration, etc., für Details siehe Tab. 27) konnten die Plasmide pAG106AE und pNcos53 durch Transduktion in *S. thermophilus* a10 und St11 übertragen werden, ohne die Transduktanten über ihre Antibiotikaresistenz zu selektieren. Die Transduktionseffizienz für die Übertragung des Plasmids pAG106AE in *S. thermophilus* St11 war dabei so hoch, dass Transduktanten direkt über „Plasmid Screening“ identifiziert werden konnten. In 3 aus 20 Plasmidpräparationen aus Transduktanten war das Plasmid pAG106AE nachweisbar (Abb. 43). Das entspricht einer Übertragungshäufigkeit von $1,5 \times 10^{-1}$ Transduktanten/Zelle. Für Plasmidübertragungen in *S. thermophilus* a10 war die Transduktionseffizienz mit 5×10^{-2} Transduktanten/Zelle etwas kleiner. Eine etwa gleich große Transduktionseffizienz ergab die Transduktion des Plasmids pNcos53 mit a10/J9 in *S. thermophilus* a10. Die Identifizierung der Transduktanten und die Bestimmung der Transduktionseffizienz geschah in diesen Fällen nach Koloniehybridisierung (Abb. 44) und anschließender Plasmidpräparationen.

Ergebnisse

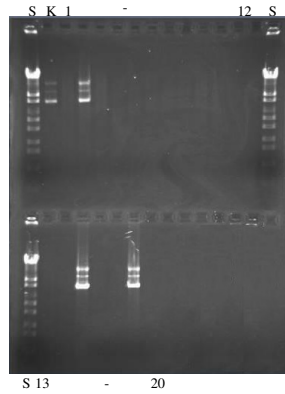


Abb. 43: Plasmidpräparationen aus *S. thermophilus* St11 nach Transduktion des Plasmids pAG106AE mit P1109. S: Lambda/Styl 0,25 µg; K: pAG106AE aus *E. coli* Easypore; 1-20: Plasmidpräparationen aus *S. thermophilus* St11 nach Transduktion.

pAG106AE mit P1109 in <i>S. thermophilus</i> a10	pAG106AE mit P1109 in <i>S. thermophilus</i> DC15	pAG106AE mit P1109 in <i>S. thermophilus</i> DC134	
pNcos53 mit a10/J9 in <i>S. thermophilus</i> a10	pNcos53 mit a10/J9 in <i>S. thermophilus</i> DC15	pSt04 mit P1109 in <i>S.</i> <i>thermophilus</i> a10	pSt04 mit P1109 in <i>S.</i> <i>thermophilus</i> DC15

Abb. 44: Ergebnisse der Koloniehybridisierungen mit Agarplatten aus Transduktionsexperimenten. Für die Hybridisierungen wurden DIG-markierte pSt106AE, pNcos53 und pSt04- DNA verwendet.

Der Versuch, *S. thermophilus* a10 mit dem nativen Plasmid pSt04 ohne Selektion zu transduzieren, war nicht erfolgreich. Es ließen sich durch Koloniehybridisierungen oder Plasmidpräparationen keine Transduktanten identifizieren. Der Nachweis über Koloniehybridisierung mit DIG-markierter pSt04-DNA lieferte ausschließlich eine große Zahl falsch positiver Signale.

Einen Überblick über die durchgeführten Transduktionen und die jeweiligen Versuchsbedingungen gibt Tab. 27.

Ergebnisse

Tab. 27: Versuche zur Identifizierung der Transduktanten ohne Selektion.

Plasmid	Phage	Donorstamm	Rezipienten-Stamm	Transduktionsbedingungen ¹	Transduktanten/Zelle ²
pAG106AE	P1109	St11	St11	30 min Adsorption; Phagenmenge: 0,3 ml Lysat ¹ ; Zellkonzentration 2×10^7 KbE/ml	$1,5 \times 10^{-1}$
	P1109	St11	a10, DC15, DC134	60 min Adsorption; Phagenmenge: 0,3 ml Lysat ¹ ; Zellkonzentration 2×10^6 KbE/ml	5×10^{-2} (nur <i>S. thermophilus</i> a10)
pSt04	P1109	St11	a10, DC15, DC134	60 min Adsorption; Phagenmenge 0,3 ml Lysat ¹ ; Zellkonzentration 2×10^6 KbE/ml	-
pNcos53	a10/J9	a10	a10,	10 min Adsorption; Phagenmenge 0,3 ml Lysat ¹ ; Zellkonzentration 2×10^6 KbE/ml	5×10^{-2}
		a10	DC15	60 min Adsorption; Phagenmenge 0,3 ml Lysat ¹ ; Zellkonzentration 2×10^6 KbE/ml	-

¹: Alle Lysate wurden unmittelbar vor oder kurz nach Lysatherstellung ohne Titerbestimmung eingesetzt. CaCl₂-Konzentration: 100 mM; Vorkultur aus logarithmischer Wachstumsphase; Zellen durch Ultraschall vereinzelt. Je 0,3 ml Lysat der Phagen P1109 oder a10/J9 mit einem Titer zwischen 2×10^8 PbE/ml und 2×10^9 PbE/ml eingesetzt.

²: Der Quotient Transduktanten/Zelle ist nur für erfolgreiche Übertragungen angegeben.

Selektion mittels Hitzeschock

Das kleine Hitzeschockprotein sHsp, das durch das *S. thermophilus*-Plasmid pSt04 kodiert wird, wurde zur gentechnikfreien Selektion von Transformanten verwendet (Demerdash *et al.*, 2003).

In mehreren Versuchsreihen wurde untersucht, ob sich diese Selektionsmethode auch auf die Stämme der Transduktionsexperimente anwenden lässt. Diese umfassten Wachstumsversuche bei verschiedenen Temperaturen und Wachstumsbedingungen, Transformationen unter Verwendung erhöhter Inkubationstemperaturen, sowie die Resistenz gegenüber niedrigen pH-Werten.

In den Wachstumsversuchen wurden *S. thermophilus* Übernacht-Kulturen 1:100 mit 42°C warmen thLM17-Medium verdünnt. Nach Inkubation bei 42°C bis zu einer OD_{620nm} von 0,05 wurde die Inkubationstemperatur auf die angegebenen Werte angehoben (Abb. 45). Abb. 45 zeigt Wachstumskurven für verschiedene *S. thermophilus* a10-Derivate von. Ab einer Temperatur von 46°C konnte ein Unterschied in der Hitzetoleranz zwischen *S. thermophilus* a10 (pAGS4E) und a10 beobachtet werden. *S. thermophilus* a10 (pAGS4E) konnte bei den Temperaturen

Ergebnisse

46°C und 46,5°C eine höhere OD_{620nm} erreichen als der plasmidfreie Stamm. Allerdings stoppte das Wachstum bereits bei einer OD_{620nm} von 0,35. Bereits bei einer Temperatur von 47°C war das Wachstum beider Stämme gleich. Unter Verwendung einer Präinkubationstemperatur von 37°C konnte die Hitzetoleranz des Stammes a10 gesteigert werden. Zwischen diesem Stamm und a10 (pAGS4E) zeigte sich unter den gegebenen Bedingungen kein Unterschied im Wachstumsverhalten.

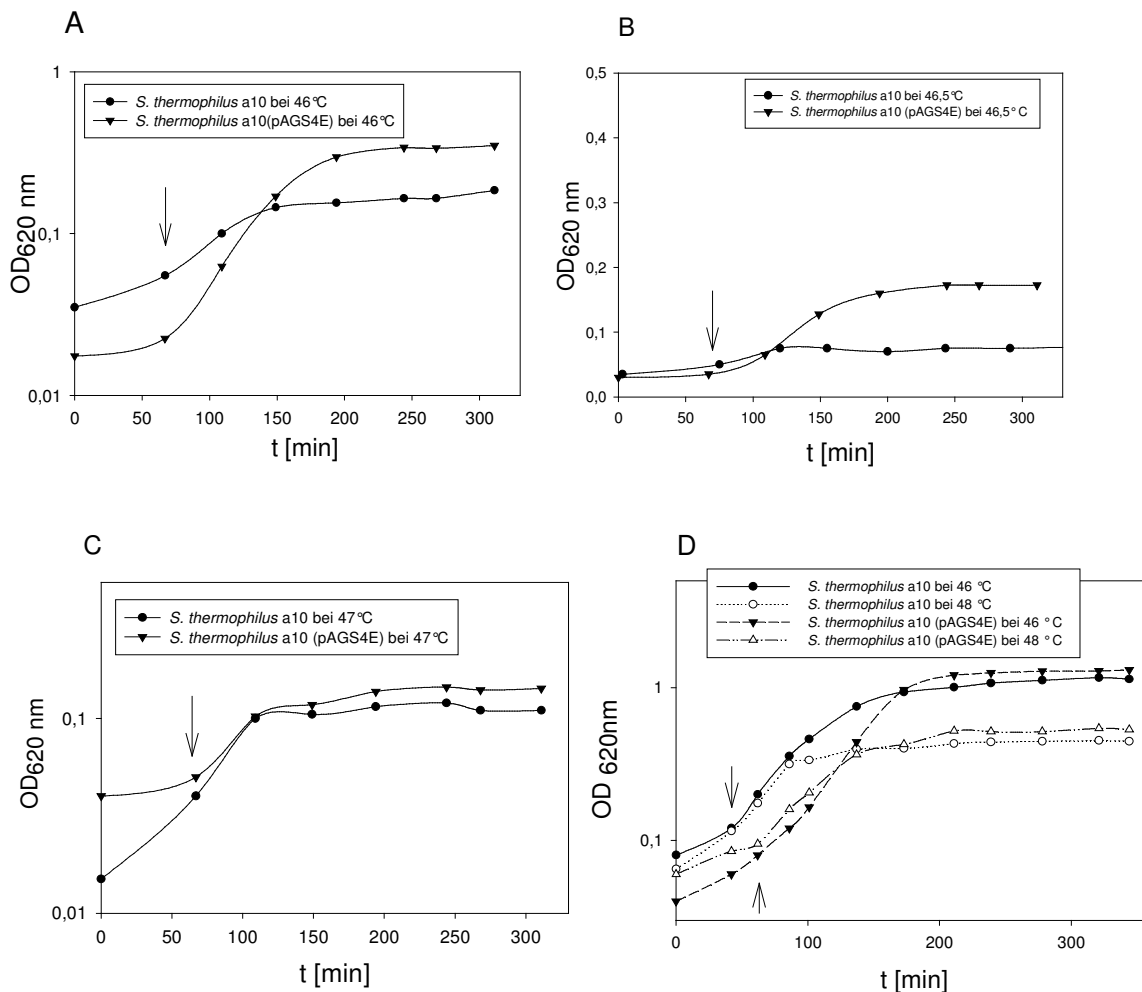


Abb. 45: Wachstum verschiedener *S. thermophilus*-Stämme bei unterschiedlichen Temperaturen. Der Zeitpunkt des Temperaturwechsels von 42°C (A-C) bzw. 37°C (D) auf die höhere Temperatur ist durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 4 Versuchen.

Entsprechende Versuche wurden für die *S. thermophilus*-Stämme St11 und A054 durchgeführt. Auch unter Veränderung verschiedener Versuchsparameter konnte für diese Stämme im Rahmen der angewendeten Versuchsbedingungen keine deutliche Wirkung des sHsp nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der Experimente gibt Tab. 28.

Ergebnisse

Tab. 28: Zusammenfassung der Wachstumsversuche zur Hitzetoleranz für *S. thermophilus* a10 und St11. Es wurden pro Versuch 2 bis 4 Wiederholungen durchgeführt.

<i>S. thermophilus</i> -Stamm	Temperatur der Präinkubation	Inkubationstemperatur [°C]	NaCl-konzentration	Unterschiede in der Hitzetoleranz zwischen plasmidfreien Stamm und Stamm mit Plasmid
a10, und a10 (pAGS4E)	42°C	45; 47	-	keine
		46; 46,5		Stamm a10 (pAGS4E) erreichte eine geringfügig höhere OD _{620nm}
	37°C	37, 46, 48	-	keine
St11, St11 (pAGS4E)	42°C	45, 46, 48, 49, 50	0,75%	keine, NaCl führte bei beiden Stämmen zu einer Steigerung der Hitzetoleranz
		48, 49, 50, 52, 54 langsame Temperaturerhöhung ²	-	keine

Für die Nutzung des *shsp*-Gens als selektiver Marker ist die Hitzetoleranz nicht nur in Bezug auf die Vermehrungsfähigkeit, sondern insbesondere auch hinsichtlich der Überlebensfähigkeit interessant. Die Überlebensraten der *S. thermophilus*-Stämme a10 und a10(pAGS4E) wurden bei 60°C bestimmt. Vor diesen Versuchen erfolgte eine Inkubation der Zellkulturen mit niedrigeren Temperaturen (Präinkubation).

Ein Unterschied in der Überlebensrate zeigte sich nur bei einer Präinkubationstemperatur von 42°C, für die nach 20 min etwa 20% der Ausgangszellkonzentration gemessen wurden, während der entsprechende Wert für *S. thermophilus* a10(pAGS4E) knapp doppelt so hoch war (siehe Abb. 46, A). Für die Präinkubationstemperatur von 45,5°C konnte kein Unterschied beobachtet werden. Unter Berücksichtigung des Umstandes, dass eine *S. thermophilus* a10-Zellkette aus durchschnittlich 7 Zellen besteht, beträgt die Zell-Überlebensrate ungefähr ein Siebtel der errechneten Keimzahl-Überlebensrate.

Die Wirkung der Stressproteine wie das sHsp ist nicht auf Temperaturstress begrenzt, sondern wird auch bei anderen Stressfaktoren aktiv, wie z.B. pH-Stress (Demerdash *et al.*, 2003). In Tab. 29 sind Versuche zusammengefasst, welche die Wirkung des sHsp auf die Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten untersuchten. Hierfür wurden Zellkulturen in der logarithmischen und spät logarithmischen Phase verwendet. Das Plasmid pAGS4E hatte keinen Einfluss auf die Phagenresistenz. Bei beiden Stämmen wiesen Kulturen aus der spätlogarithmischen Phase eine 5×10^1 bis 4×10^4 höhere Toleranz auf als Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase.

Ergebnisse

Aus diesem Grund wurde die Überlebensfähigkeit der *S. thermophilus*-Kulturen in der stationären Phase bei hohen Temperaturen gemessen. Die Versuche wurden für die Stämme *S. thermophilus* a10 und St11 in Gegenwart von 3% NaCl durchgeführt (siehe Abb. 46, B). Durch das Plasmid pAGS4E wurde unter diesen Versuchsbedingungen der Anteil überlebender Zellen um den Faktor 4 bis 8 erhöht.

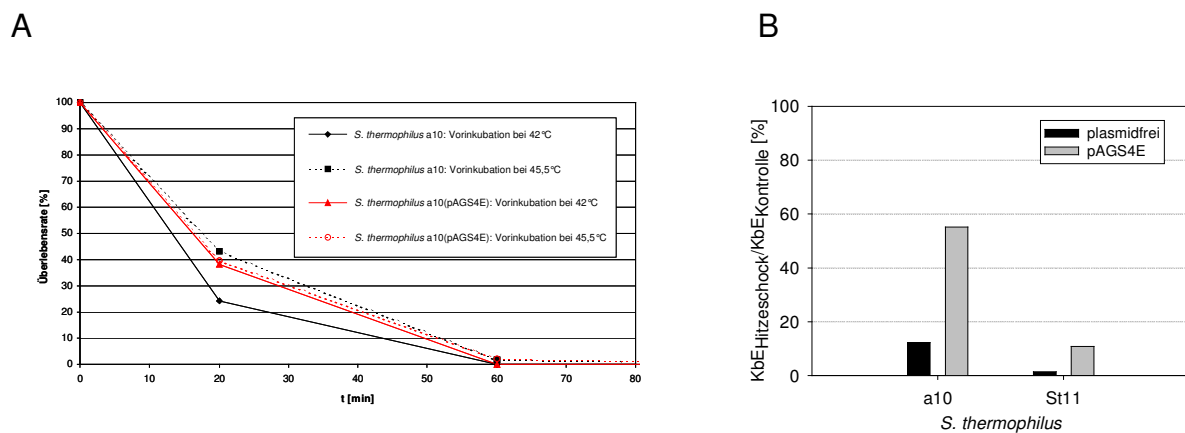


Abb. 46: **A:** Überlebensrate des *S. thermophilus*-Stammes a10 und a10(pAGS4E) bei 60°C. Die Kulturen wurden vor dem Versuch bei 42°C bzw. 45,5°C inkubiert und anschließend mit 1/4-starker Ringerlösung zweimal gewaschen. Die Überlebensrate berechnet sich aus dem Verhältnis zwischen Gesamtkeimzahl zum Zeitpunkt t und der Keimzahl zum Zeitpunkt t=0. **B:** Vergleich der Hitzetoleranz plasmidfreier *S. thermophilus* a10 und St11-Kulturen mit Kulturen der Stämme a10(pAGS4E) und St11(pAGS4E). Es wurden Kulturen aus der stationären Phase verwendet. Die Inkubation bei 60°C erfolgte nach Zugabe von 3% NaCl.

Tab. 29: Einfluss des sHsp auf die Toleranz der *S. thermophilus*-Stämme a10 und St11 gegenüber pH-Stress. Verglichen wurde die Keimzahl der *S. thermophilus*-Kulturen nach einer Inkubation bei pH 3,5 und pH 6,1.

<i>S. thermophilus</i> -Stamm	KbE _{pH 3,5} /KbE _{pH 6,1} [%]	
	logarithmische Zellphase ¹	spätlogarithmische Zellphase ²
a10(pAGS4E1)	2,6x10 ⁻³	3,0
a10(pAGS4E)	1,1x10 ⁻⁴	4,4
St11	0,6	38,6
St11(pAGS4E)	0,2	36,8

¹: Zellkulturen wurden vor dem Versuch bis zu einer OD_{620nm} von 0,45 bis 0,5 inkubiert.

²: Zellkulturen wurden vor dem Versuch bis zu einer OD_{620nm} von 1,7 bis 2,2 (*S. thermophilus* a10) bzw. 2,2 bis 2,9 (*S. thermophilus* St11) inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Diese Unterschiede in der Überlebensfähigkeit waren jedoch in Transduktions- und Transformationsexperimenten unter entsprechenden Versuchsbedingungen nicht ausreichend, um Transformanten bzw. Transduktanten durch Hitzeselektion oder Säureresistenz zu selektieren.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der Phagen und Plasmide

Das Vorkommen der DNA-Banden in Restriktionsprofilen genomischer Phagen-DNA, die sich durch Hitzedenaturierung in zwei kleinere Banden auflösen, weist alle getesteten Phagen als *cos*-Phagen aus. Für drei Phagen (P53, P1109 und PST) wurde dieses durch Klonierung und Sequenzierung der *cos*-Stelle bestätigt. Die große Ähnlichkeit der Phagen P53 und Sfi19 im Restriktionsprofil, die ähnliche Größe des Phagengenoms, sowie die bis auf eine Base identische Sequenz der *cos*-Stelle legen nahe, dass diese beiden Phagen nahe miteinander verwandt sind. Wie bei allen bisher charakterisierten Bakteriophagen Gram-positiver Bakterien besteht das Ende der *cos*-Stelle aus 3'-Überhängen (Lillehaug und Birkeland, 1993; Chandry *et al.*, 1994; van Sinderen *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1998; Mahanivong *et al.*, 2001). Die Länge des 3'-Überhangs unterscheidet sich zwischen P53 und Sfi19 trotz der engen Verwandtschaft der Phagen. Für den Phagen P53 wurde diese ausschließlich über den Sequenzierungsabbruch dissoziierter P53-DNA bestimmt. Zur Absicherung der Daten müsste eine Lagebestimmung der endständigen Sequenz durch den Abbau der überhängenden Enden mittels T4-Polymerase durchgeführt werden (Lubbers *et al.*, 1994). Bei der Sequenzierung des 3'-Überhangs der *cos*-Stelle des Phagen P53 trat endständig ein zusätzliches Adenosin auf, das nicht mit der Sequenz der zirkulären P53-DNA übereinstimmte. Der Grund hierfür ist unbekannt. Dieses Nukleotid wurde in der Festlegung der endständigen Sequenz nicht berücksichtigt.

Beim Vergleich der *cos*-Regionen mehrerer *S. thermophilus*-Phagen erscheinen isolierte Blöcke mit identischer DNA-Sequenz. Es ist wahrscheinlich, dass die konservierten Bereiche eine Bedeutung für die Funktion der *cos*-Region haben. Die *cos*-Region des *E. coli* Phagen Lambda zeichnet sich durch das Vorkommen von Sequenzwiederholungen aus, an welche die Untereinheiten der Terminase binden (Hohn, 1983; Shinder und Gold, 1988; Cue und Feiss, 1998). Beim *L. lactis*-Phagen bIL42 findet sich genau dieser Aufbau der *cos*-Region wieder (Parreira *et al.*, 1996b). *Cos*-Regionen anderer Phagen wie der *L. lactis*-Phage c2 (Lubbers *et al.*, 1994) oder die *S. thermophilus*-Phagen Sfi19 und Sfi21 (Lucchini *et al.*, 1999b) entsprechen hingegen nicht dem Lambda-Schema. In der *cos*-Region des Phagen c2 kommen allerdings wie in den meisten charakterisierten *cos*-Regionen der Bakteriophagen

Sequenzwiederholungen vor. Bei den Phagen der Milchsäurebakterien ist die funktionelle Bedeutung dieser Sequenzwiederholungen noch nicht geklärt. So sind die meisten im *cos*-Bereich des *S. thermophilus*-Phagen Sfi21 identifizierten Sequenzwiederholungen in dem nahe verwandten Phagen Sfi19 nicht konserviert, was gegen eine wichtige funktionelle Bedeutung spricht. Ohne eine genaue funktionelle Analyse der *cos*-Regionen können für den Verpackungsmechanismus wichtige Sequenzen nicht identifiziert werden. Zur Vereinfachung der hierfür benötigten Experimente ist eine Eingrenzung der zu untersuchenden Sequenzen sinnvoll. Da nur wenige *cos*-Regionen der *S. thermophilus*-Phagen sequenziert sind, die sich zudem sehr ähneln, ist eine Betrachtung konservierter Bereiche zur Identifizierung funktionaler DNA-Sequenzen nur wenig hilfreich. Die Zahl verwandter DNA-Sequenzen konnte durch die Analyse *cos*-ähnlicher Sequenzen bekannter *S. thermophilus*-Plasmide vergrößert werden. Zwar können die Plasmid-Sequenzen Unterschiede in wichtigen funktionalen Abschnitten aufweisen, doch da sie ausreichend sind, um Transduktion zu vermitteln (siehe Kapitel 4.2.1, S. 90), müssen entscheidende Sequenzen in wesentlichen Teilen übereinstimmen. Beim Sequenzvergleich aller verfügbaren *cos*-Sequenzen der *S. thermophilus*-Plasmide und Phagen sind Bereiche hoher Homologie scharf von Bereichen mit nur schwacher oder keiner Sequenzübereinstimmung abgegrenzt. Zum großen Teil decken sich die konservierten Bereiche mit bestimmten Sequenzwiederholungen. Zusätzlich treten in regelmäßigen Abständen innerhalb konservierter Bereiche Sequenzen auf, die dem Schema (A)_n bzw. (T)_n mit $n \geq 3$ entsprechen, das in ähnlicher Form in vielen *cos*-Regionen AT-reicher Phagen nachgewiesen wurde (Lubbers *et al.*, 1994). Diese Strukturen sind charakteristisch für gekrümmte DNA (Koo *et al.*, 1986; Mizuno, 1987). Gekrümmte DNA kommt häufig an genetisch wichtigen Stellen vor, wie zum Beispiel dem Startpunkt der Replikation, und kann bei der Protein-Bindung an die DNA eine Rolle spielen. Einige Bereiche (InDR1, *cos*-Stelle, InDR2 und DR3) sind darüber hinaus im Genom von *L. lactis* und *L. gasseri* Phagen konserviert, so dass eine funktionale Bedeutung sehr wahrscheinlich ist. Eine weitere mögliche Ursache für die Ähnlichkeit der Sequenzen aus *S. thermophilus*, *L. lactis* und *L. gasseri* Phagen sind horizontaler Gentransfer und der Austausch funktioneller Module. Auf die Möglichkeit eines solchen Transfers wird in Kapitel 4.2.2 eingegangen.

Abb. 47 zeigt den aus den konservierten Bereichen abgeleiteten hypothetischen Aufbau der *cos*-Region für die *S. thermophilus*-Phagen P53, P1109 und PST. Die

große Ähnlichkeit der getesteten Phage spiegeln die geringe Diversität der *S. thermophilus*-Phagen wieder. Für Transduktion ist dieses durchaus von Vorteil, da aufgrund der Ähnlichkeit der *cos*-Sequenzen Plasmidtransduktion mit vielen *S. thermophilus cos*-Phagen durchgeführt werden kann.

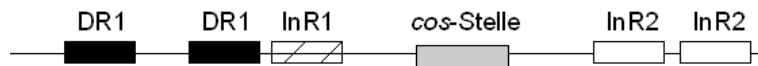


Abb. 47: Hypothetischer Aufbau der *cos*-Region der *S. thermophilus*-Phagen PST, P53 und P1109, abgeleitet aus dem Auftreten konservierter DNA-Abschnitte. DR: „direct repeat“, InR: „inverted repeat“.

Die *cos*-Region des *L. lactis*-Phagen c2 ist ähnlich aufgebaut. In dieser liegen auf der einen Seite der *cos*-Region nahe der *cos*-Stelle „inverted repeats“, auf der anderen Seite ein „inverted repeat“ (InR2) ein eng benachbartes „direct repeat“.

4.2. Charakterisierung der Transduktion mit *cos*-Phagen in *S. thermophilus*

4.2.1. Transduktion verschiedener Plasmide und Bedeutung der *cos*-Region

Die *cos*-Region konnte als für die Transduktion notwendige und hinreichende Sequenz identifiziert werden. Dieses ergibt sich aus den Transduktionen mit Deletionsderivaten und der Transduktion des Plasmids pNcos53, das die klonierte *cos*-Region des Phagen P53 trägt. Die nativen *S. thermophilus*-Plasmide, die in den transduzierbaren rekombinanten Plasmiden vorlagen, wiesen alle *cos*-Regionen auf. Transduktionen mit anderen *S. thermophilus*-Phagen (Mercenier *et al.*, 1988) waren auch mit Plasmiden ohne Homologien zu Phagengenomen erfolgreich. Die hierbei erzielten Transduktionshäufigkeiten lagen allerdings unter der in dieser Arbeit angelegten Nachweisgrenze. Transduktionen mit dem Plasmid pNcos53 zeigten, dass durch *cos*-Regionen, die sich in der Sequenz von der des transduzierenden Phagen unterscheiden, durchaus höhere Transduktionshäufigkeiten ermittelt werden können als durch die *cos*-Region des Phagen selbst. Die Spezifität der Terminase, dem DNA-Verpackungsenzym, ist für die Phagen eigene *cos*-Region also nicht unbedingt optimal. Als mögliche Ursache ist denkbar, dass *cos*-Regionen oder Gene für die Terminase durch homologe Rekombination einzelner Module ausgetauscht

worden sind, was typisch für *S. thermophilus*-Phagen ist (Neve *et al.*, 1998; Brüssow *et al.*, 1998; Lucchini *et al.*, 1999a; Chandry *et al.*, 2002). Bei Klonierungen der *cos*-Region des Phagen P53 konnte diese nur in einer Orientierung kloniert werden (pNcos53). Die Orientierung der *cos*-Stelle hatte in anderen Systemen allerdings keine Auswirkung auf die Höhe der Transduktionshäufigkeit (Chandry *et al.*, 2002).

Bei den Transduktionen war bemerkenswert, dass für das Plasmid pAG106AE mit jedem Phagen sehr hohe und für pSHE1 durchgängig relativ niedrige Transduktionshäufigkeiten erzielt wurden. Das Plasmid pST106E zeichnet sich durch das Vorkommen zweier vollständiger *cos*-Regionen aus. Zudem sind bei pST106E in den konservierten Bereichen der *cos*-Region nur zwei Abweichungen von der Konsensus-Sequenz zu verzeichnen. Die erzielten niedrigen Transduktions- und Verpackungshäufigkeiten für das pSHE1 können damit begründet werden, dass nur eine Kopie der *cos*-Region in der Plasmid-Sequenz vorhanden ist. Zudem waren in der Sequenz des hochkonservierten Abschnittes „InDR2“ der *cos*-Region drei Abweichungen gegenüber der Phagen-Sequenzen vorhanden. In dem deutlich besser transduzierbaren Plasmid pSt04, das ebenfalls nur eine Kopie der *cos*-Region trug, war dieser Abschnitt identisch zu dem der Phagen-Sequenzen.

Besonders niedrig waren die Transduktionshäufigkeiten für den Phagen PST. Dieser weist in den konservierten Bereichen die größten Abweichungen zur Konsensussequenz auf.

Es zeigte sich kein klarer Einfluss der Plasmidgröße auf die Transduktionshäufigkeit wie sie z.B. für den Phagen Lambda (Umene *et al.*, 1978) nachgewiesen wurde. Allerdings können *cos*-Phagen, wie z.B. der Phage Lambda, DNA mit einer Größe von 80% bis 105% ihres Genoms verpacken (Murialdo, 1991). Umgerechnet auf die *S. thermophilus*-Phagen a10/J9, P1109 und P53 bedeutet das für deren Genomgrößen eine Toleranz von bis zu 9,3 kb. Innerhalb der Bandbreite der getesteten Plasmid-Größen ist deshalb nicht mit einem deutlichen Einfluss der Plasmidgröße auf die Transduktionshäufigkeit zu rechnen.

Verbreitung von *cos*-Regionen auf nativen *S. thermophilus*-Plasmiden

Das Auftreten *cos*- und *ori*-ähnlicher Regionen auf nativen *S. thermophilus*-Plasmiden ist bekannt (Desiere *et al.*, 1999; Geis *et al.*, 2003). Die Analyse aller bekannten *S. thermophilus*-Plasmid-Sequenzen zeigt, dass dieses keine Seltenheit, sondern ein weit verbreitetes Phänomen ist. Auf mehr als der Hälfte der

sequenzierten *S. thermophilus*-Plasmide konnten solche Sequenzen identifiziert werden. Bei anderen Plasmiden könnte die Homologie sekundär durch Rekombination verloren gegangen sein. So kodiert das Plasmid pER16 für eine spezifische Untereinheit eines R/M-Systems, der Rest des Systems, sowie Homologien zu *cos*- oder *ori*-Regionen fehlen (Solow und Somkuti, 2001). Auf dem verwandten Plasmid pER35, das Gene für das vollständige R/M-System trägt, sind *cos*-Homologien vorhanden.

Homologien zu Phagengenomen in Plasmiden können durch Rekombination entstehen. Für einige *cos*-Phagen ist die Bildung eines Phagen-Plasmid-DNA Hybrids nachgewiesen. Die Bildung eines solchen Hybrids beruht auf kurzen Sequenzhomologien von 20 bis 72 bp (Watt *et al.*, 1985; Raya und Klaenhammer, 1992). Aus den transduzierbaren Hybriden kann sich das Plasmid vollständig regenerieren und dabei mit geringerer Wahrscheinlichkeit Teile des Phagengenoms übernehmen (Orbach und Jackson, 1982).

Ob die auf den nativen *S. thermophilus*-Plasmiden lokalisierten *cos*- und *ori*-Homologien eine biologische Funktion erfüllen, ist noch unklar. Letztendlich befinden sie sich zum Teil auf Plasmiden, die außer einem Replikon über keine bekannten funktionellen Gene verfügen. In Plasmide klonierte *ori*-Sequenzen aus Phagen können Resistenz gegenüber verschiedenen Phagen vermitteln. Dies wird als Per-System („Phage encoded resistance“) bezeichnet (Hill *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1991; Mahanivong *et al.*, 2001; Ostergaard *et al.*, 2001; Lamothe *et al.*, 2005). Das Per-System wirkt über Bindung und über die damit verbundene Austitrierung der Phagen-Replikationsproteine. Der Effekt ist direkt abhängig von der Kopienzahl der Plasmide (O'Sullivan *et al.*, 1993; McGrath *et al.*, 1999; McGrath *et al.*, 2001). Allerdings sind alle bekannten Per-Systeme, die von *ori*-Regionen aus Phagen abhängig sind, durch die Klonierung verschiedener Phagen *ori*-Sequenzen entstanden. Bisher wurden keine ähnlich wirkenden nativen Pendanten gefunden. Die *ori*-Homologie der nativen *S. thermophilus*-Plasmide scheinen für Transduktion jedoch entbehrlich zu sein, da bei allen Plasmiden mit Homologien zu Phagengenomen die *cos*-Region, aber nur bei zweien die *ori*-Region vorhanden ist. Über einen Per-Effekt der *cos*-Sequenzen wurde bisher noch nichts berichtet, jedoch zeigte die durch das Plasmid pSt106AE vermittelte Reduktion der Sensitivität gegenüber P1109, dass die *cos*-Stelle als schwaches Per-System fungieren kann (siehe Kapitel 4.3.1, S. 100).

Die hier beschriebenen hohen Übertragungshäufigkeiten zeigen eine weitere Funktion auf. Plasmide mit *S. thermophilus* *cos*-Regionen sind von Bakteriophagen leicht übertragbare genetische Elemente, die in unterschiedliche *S. thermophilus*-Stämme und sogar in *L. lactis* übertragen werden können (siehe Kapitel 4.2.2, S. 94). Das Plasmid pER35 kodiert für ein Typ I R/M-System (Solow und Somkuti, 2001), das Plasmid pCI65st nur für die Untereinheit *hsdS* eines Typ I R/M-Systems, vermittelt aber dennoch eine Phagenresistenz (O'Sullivan *et al.*, 1999). Durch vertikalen und horizontalen Gentransfer können diese Plasmide ein breites Stammspektrum erreichen. Interessanterweise wären es hier die Phagen selbst, die Phagenresistenzen verbreiten. Wird ein R/M-System durch einen Phagen überwunden, kann durch den Phagen das System auch in Nichtwirtsstämmen übertragen werden. Solch ein Notfall-Export eignet sich hervorragend zur Erhaltung eines Resistenzsystems im lokalen Genpool. Neben R/M-Systemen kodieren einige *S. thermophilus*-Plasmide für kleine Hitzeschockproteine. Durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur können temperente *L. lactis*-Phagen (Feirtag und McKay, 1987; Lunde *et al.*, 2003; Meijer *et al.*, 2006) und *S. thermophilus*-Phagen (Neve *et al.*, 2003) induziert werden. Es ist vorstellbar, dass Hitzeschockproteine eine Hitzeinduktion hemmen, und damit einen Resistenzmechanismus darstellen könnten. Eine genaue Studie der Plasmide anderer Genera muss zeigen, ob das Auftreten der *cos*- und *ori*-Homologien auf *S. thermophilus* beschränkt ist. In einer erst noch oberflächlichen Untersuchung einiger Sequenzen verschiedener *L. lactis*-Plasmide konnten keine Homologien zu *cos*- oder *ori*-Regionen der *L. lactis*-Phagen gefunden werden. *L. lactis*-Stämme besitzen allerdings im Gegensatz zu *S. thermophilus*-Stämmen eine hohe Zahl an Plasmiden, so dass es einer umfassenden Analyse bedarf, um solche Homologien aufzudecken.

Von wichtiger Bedeutung für die Anwendung der Transduktion zur Stammverbesserung ist, dass Plasmide vom Empfängerstamm möglichst unverändert transduziert werden. Plasmidaufschlüsse und der Vergleich der Restriktionsprofile zeigte, dass dieses gewährleistet war. Deletionen oder Insertionen, die nur einen geringen DNA-Bereich umfassen, können durch die verwendeten Analysemethoden jedoch nicht nachgewiesen werden. Solche geringfügigen Veränderungen der Plasmid-Sequenzen können insbesondere dann auftreten, wenn sie die Transduzierbarkeit erhöhen. Sowohl Insertionen von Phagen-DNA (Deichelbohrer *et al.*, 1985; Novick *et al.*, 1986) als auch Deletionen (McKay

und Baldwin, 1973; Davies und Gasson, 1981; Gasson, 1983) können zu einem dieser so genannten Hft-Transfer („High frequency of transduction) führen. Es handelt sich hierbei allerdings um seltene Ereignisse, die hinter den hohen durch *cos*-Regionen bedingten Transduktionshäufigkeiten zurücktreten und somit in den Experimenten nicht zu beobachten gewesen wären.

4.2.2. Verpackungsmechanismus der Plasmide

Der Mechanismus der Plasmid-Übertragung hängt auch von den Eigenschaften der Überträger-Phagen ab. Im lytischen Zyklus der Phagen können sich transduzierende Phagenpartikel auf zwei Wegen bilden. Erstens durch die Entstehung eines DNA-Hybrids, bestehend aus Wirts- und Phagen-DNA oder zweitens durch die Verpackung der Wirtssequenzen, die über eine ausreichende Ähnlichkeit zu den *pac*- bzw. *cos*-Sequenzen der Phagen-DNA verfügen. Über beide Alternativen können sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA transduziert werden. Beim zweiten Weg werden Plasmide häufig aufgrund ihrer geringen Größe als Konkatemere in den Phagenkopf verpackt. Plasmidkonkatemere bilden sich nach Infektion der Wirtszelle mit einem Phagen. Dieser Vorgang ist vom normalen Replikationsweg des Plasmids unabhängig (Viret *et al.*, 1991).

Alle in dieser Studie untersuchten transduzierbaren nativen *S. thermophilus*-Plasmide zeigten Sequenzübereinstimmungen zu *cos*- und *ori*-Regionen verschiedener *S. thermophilus*-Phagen, die einen Bereich von 50 bis über 150 bp umspannten. Da Homologien dieser Größe durchaus ausreichend zur Bildung von Plasmid-Phagengenom-Chimären sind (Watt *et al.*, 1985), bzw. eine Verpackung der Plasmid-DNA über die Erkennung der *cos*-Stelle zu ermöglichen, kommen theoretisch beide Übertragungsmechanismen in Frage. Für zwei Phagen und zwei Plasmide konnte mittels DNA-Hybridisierungen eindeutig das Auftreten von Plasmid-Konkatemeren gezeigt werden, die nicht mit Phagen-DNA assoziiert waren. Die getesteten Plasmide waren somit über ihre *cos*-Sequenzen erkannt und verpackt worden. Dies ist typisch für Transduktionen, in denen *cos*-Stellen oder *pac*-Stellen beteiligt sind (Lofdahl *et al.*, 1981; Schmidt und Schmieger, 1984; Alonso *et al.*, 1986; Novick *et al.*, 1986; Liebeschuetz und Ritchie, 1986; Kreuzer *et al.*, 1988; Raya und Klaenhammer, 1992; Birkeland und Holo, 1993; Chandry *et al.*, 2002). Theoretisch befindet sich an den Enden des linearen Plasmidkonkatemers die *cos*-Stelle, da der Phage beim Verpacken der DNA hier schneidet. Dieses konnte nicht nachgewiesen werden, da in Hybridisierungen hierfür charakteristische Nebenbanden fehlten oder

wie beim Plasmid pSHE1 nicht eindeutig der Plasmidkarte zugeordnet werden konnten. Auch in Hybridisierungen mit anderen Phagen fehlten häufig die charakteristischen Nebenbanden (Novick *et al.*, 1986; Chandry *et al.*, 2002).

Aus der Signalstärke der Hybridisierungen wird deutlich, dass das Plasmid pAGJ34 wesentlich häufiger in den P53-Phagenkopf verpackt wird als pSHE1. Dieser Befund deckt sich mit den für Plasmide erzielten Transduktionshäufigkeiten. Der Anteil an pAGJ34E bzw. pAG106AE tragenden Phagenpartikeln war für den Phagen P53 so groß, dass diese nach Restriktionshydrolysen auf dem Agarosegel als zusätzliche Banden neben der Phagen-DNA sichtbar wurden. Unter der Annahme, dass bei *cos*-Phagen bei der DNA-Verpackung eine Abweichung von +/- 10% der Genomgröße des Phagen toleriert wird, lässt sich anhand der Bandenintensität der Anteil an Plasmid tragenden Phagenpartikeln in der Gesamtmenge abschätzen. Das Plasmid pAGJ34E würde mit seiner Größe von ungefähr 7,2 kb als Konkatermer aus 5 Plasmidkopien in den P53-Phagenkopf hineinpassen. Da die pAGJ34E-DNA im Restriktionsprofil der P53-DNA die gleiche Intensität hat wie ähnlich große Banden der P53-DNA, lässt sich daraus ableiten, dass ein Fünftel der isolierten DNA aus Plasmidkonkatemer besteht. Entsprechende Berechnungen für das Plasmid pAG106AE ergeben, dass nahezu jeder zweite Phagenkopf das Plasmidkonkatemer tragen müsste. Wenn Phagenpartikel mit Plasmidkonkatemer die gleiche Infektionswahrscheinlichkeit wie Phagenpartikel mit Phagen genom aufweisen würden, ergäben sich für die genannten Plasmide theoretisch erreichbare Transduktionshäufigkeiten von 0,2 bis 0,5 KbE/PbE. Diese Transduktionshäufigkeit konnte auch nach Optimierung des Transduktionsprotokolls nicht erreicht werden. Eine reduzierte Infektionswahrscheinlichkeit der transduzierenden Phagenpartikel oder eine Störung der Monomerisierung der Plasmid-Konkatemere könnten hierfür verantwortlich sein. Monomerenbildung erfolgt durch Rekombination (Takahashi und Saito, 1982) oder Plasmid-Replikation (Novick *et al.*, 1986).

4.2.3. Transduktion mit *S. thermophilus*-Phagen in Wirts- und Nichtwirtsstämmen

Die Übertragung genetischer Elemente durch Phagen ist für Wirtsstämmen unproblematisch. Der Phage kann mit hoher Häufigkeit an den Wirt adsorbieren und seine DNA injizieren. Für eine praktische Anwendung ist eine Erweiterung der

Methode auf Nichtwirtsstämme von großem Interesse, da sich die Zahl möglicher Empfängerstämme hierdurch vergrößert.

Bei der Plasmid-Transduktion in *S. thermophilus*-Stämme konnten drei Empfänger-Typen charakterisiert werden: 1. Stämme mit zu Wirtsstämmen vergleichbaren Transduktionshäufigkeiten, 2. Stämme mit Transduktionshäufigkeiten, die um den Faktor 100 geringer waren und 3. diejenigen, bei denen keine Transduktion möglich war. Als Faktoren, die einen wesentlichen Einfluss auf die Transduktion haben, konnten die Phagenadsorption, das Vorkommen von R/M-Systemen und das Vorkommen von Prophagen identifiziert werden.

Adsorption

Die Adsorption der Phagen an die Zellen ist der erste Schritt bei einer Phageninfektion, so dass eine genaue Analyse dieses Vorgangs grundlegend für die Analyse der Transduktion ist. Je nach Phagenspezies kann die Adsorption in einem einzigen Schritt oder in zwei Einzelschritten erfolgen. Durch Verdünnung der Adsorptionsansätze können reversibel adsorbierte Phagen von den Zellen gelöst und die Zahl der irreversibel gebundenen Phagen gemessen werden. Entsprechende Versuche mit den *S. thermophilus*-Phagen P53 zeigten, dass eine Verdünnung in 1/4-starker Ringerlösung nicht ausreichend war, um alle reversibel adsorbierten Phagen abzulösen. Eine vollständige Ablösung konnte durch Zugabe von 1 M NaCl oder einer Lösung Glucose, Rhamnose und Glucosamin erzielt werden. Diese Zucker kommen typischerweise in der Zellwand der meisten Milchsäurebakterien vor und sind in Laktokokken fast immer Bestandteil der Rezeptoren für die reversible Phagenadsorption (Oram und Reiter, 1968; Oram, 1971; Keogh und Pettinghill, 1983; Sijtsma *et al.*, 1988; Valyasevi *et al.*, 1990). Ein Vergleich der Adsorption an Wirte und Nichtwirte zeigte, dass durch das Verdünnungsverfahren irreversible Adsorption gemessen werden kann.

Die Tatsache, dass bei Nichtwirtsstämmen mit niedrigen Transduktionshäufigkeiten die Adsorption unter der Nachweisgrenze lag und bei denjenigen mit hohen Transduktionshäufigkeiten eine nachweisbare Adsorption gemessen wurde, zeigte, dass die Adsorption ein limitierender Faktor im Transduktionsprozess ist.

Die Transduktionshäufigkeiten für Stämme mit messbarer und nicht nachweisbarer Adsorption unterschieden sich in der Regel um den Faktor 100. Dieser Faktor trat auch bei entsprechenden Versuchen mit dem *L. lactis*-Phagen sk1 für

Transduktionen in einen Nichtwirt auf (Chandry *et al.*, 2002). Für den Stamm DC15 wurden etwas höhere Übertragungshäufigkeiten als für Wirtsstämmen gemessen, trotz vergleichsweise geringerer Adsorption. Ähnliches wurde bei der Transduktion in lysogene *Bacillus subtilis*-Stämme beobachtet (Marrero und Lovett, 1980) und beruht darauf, dass bei resistenten Stämmen die Zellen nicht durch den Phagen abgetötet werden können. Bei Wirten können durch Mehrfachinfektion Transduktanten lysiert werden. Hierdurch fällt die gemessene Transduktionshäufigkeit niedriger aus als die tatsächliche.

R/M-Systeme

Einige nicht transduzierbare Stämme zeigten eine hohe Adsorption. Dass selbst drei Wirtsstämmen nicht als Empfänger für Transduktionen geeignet waren, spricht für das Vorkommen von Resistenzmechanismen, die von der Herkunft der Phagen abhängig sind. Dies gilt typischerweise für Restriktions-/Modifikationssysteme. Dieser Mechanismus lag bei der Infektion der *S. thermophilus*-Stämme 55n und DC2 durch die Phagen P53 und P1109 vor. Die ermittelte Abhängigkeit zwischen Donorstamm und EOP war typisch für R/M-Systeme in *S. thermophilus* und *L. lactis* (Moineau *et al.*, 1995; Burrus *et al.*, 2001; Solow und Somkuti, 2001) und zeigte, dass durch Modifikation der Phagen-DNA die Resistenz überwunden wurde. Veränderungen der Restriktionsstellen im Phagengenom können ausgeschlossen werden, da nach Phagenproliferation in Stämmen ohne R/M-System wieder eine Reduzierung der EOP auftrat.

Obwohl die Anzahl an Transduktanten in den Transduktionsversuchen weit über 1000 lagen und die EOP sich durch die Anwesenheit der R/M-Systeme nur um den Faktor 500 reduzierte, eigneten sich Stämme mit R/M-System nicht als Empfängerstämmen. Wahrscheinlich kommen in der Sequenz der Plasmid-Konstrukte mehrere Schnittstellen für die Restriktionsenzyme vor. Für andere *S. thermophilus*-Phagen und Stämme konnten Transduktanten mit geringer Häufigkeit trotz eines R/M-Systems isoliert werden (Mercenier *et al.*, 1988). Die hierbei erzielten Transduktionshäufigkeiten lagen allerdings unter der Nachweisgrenze dieser Arbeit. Da für die Stämme DC2 und 55n untereinander keine Reduktion der EOP zu beobachten war, besitzen sie ein zueinander kompatibles R/M-System.

Bei den übrigen getesteten nicht transduzierbaren Stämmen, die eine messbare Phagenadsorption aufwiesen, war eine Plasmid-Übertragung auch durch

Transformation nicht möglich. Das Vorkommen von R/M-Systemen ist daher in diesen Stämmen ebenfalls wahrscheinlich. R/M-Systeme wären damit in *S. thermophilus* ein weit verbreitetes Hindernis für die Übertragung bzw. Etablierung genetischer Elemente. Transduktion ist nur bedingt der Methode der Transformation überlegen. Zumindest lassen sich aber in *S. thermophilus* durch die Methode der Transduktion mit einigen Stämmen wesentlich höhere Übertragungshäufigkeiten erzielen als durch die Transformation. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein R/M-System durchbrochen und die Übertragung gelingen kann.

Hemmung der Transduktion durch Prophagen

Neben einer unzureichenden Adsorption der Phagenpartikel an die Empfängerzellen und Aktivitäten wie R/M-Systemen ist die Blockierung der DNA-Injektion ein potentiell Hindernis im Transduktionsprozess. So kodiert der Prophage des *L. lactis*-Phagen Tuc2009 für ein Membranprotein, das die Injektion der Phagen-DNA hemmt, (McGrath *et al.*, 2002), jedoch keine Wirkung auf die Adsorption Phagen-Adsorption zeigte. Im Lysogenie-Modul des *S. thermophilus*-Phagen TP-J34 befindet sich ein Gen für ein Lipoprotein, das in *L. lactis* und *S. thermophilus*-Phagen-Resistenz vermittelt (Sun *et al.*, 2006). Die vergleichenden Transduktionsexperimente mit J34 und J34-Derivaten mit defektem bzw. nicht vorhandenen Prophagen belegen, dass ein Prophage die Transduktion mit den Phagen a10/J9 und P1109 geringfügig hemmen kann. Die Stärke der Hemmung entsprach in etwa der Stärke der Phagenresistenz, die durch das Lipoprotein vermittelt wird (Sun *et al.*, 2006). Die Ergebnisse belegen, dass neben R/M-Systemen auch das Vorkommen von Prophagen Transduktionen inhibieren kann.

4.2.4. Transduktion als horizontaler Gentransfer

Neben der Transduktion innerhalb der Bakterienspezies ist eine Spezies übergreifende Plasmid-DNA Übertragung für den *Bacillus subtilis* Phagen SP02 bekannt (Marrero *et al.*, 1984). Die Versuche dieser Arbeit zeigen, dass mit *S. thermophilus*-Phagen sogar Transduktion über die Gattungsgrenze hinaus in *L. lactis* möglich ist. Da *L. lactis* über Gene für natürliche Kompetenz verfügt (Bolotin *et al.*, 2001), mussten Transformationsvorgänge ausgeschlossen werden. Transduktion in *L. lactis* über die Genus-Grenze hinaus macht die breite Anwendbarkeit der Transduktion deutlich. Ein grundlegender Aspekt ist allerdings noch bedeutender.

Zwischen *S. thermophilus*- und *L. lactis*-Phagen existieren markante Sequenzähnlichkeiten in verschiedenen Genen (Bruttin *et al.*, 1997a; Brüssow *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999; Desiere *et al.*, 2001). Dieses Phänomen lässt sich durch zwei Ursachen erklären: 1. die Existenz eines gemeinsamen Phagen-Vorfahren oder 2. der Austausch durch genetische Rekombination. Für den Austausch von DNA-Abschnitten spricht, dass Phagen untereinander über Rekombination einzelne Module oder „hot spots“ austauschen können (Neve *et al.*, 1998; Lucchini *et al.*, 1999a; Lucchini *et al.*, 1999b). Hierfür müssen die am Austausch beteiligten Phagengenome gleichzeitig innerhalb einer Zelle auftreten. Bisher wurden keine Phagen identifiziert, deren Wirtsspektren sowohl Stämme aus *S. thermophilus* als auch aus *L. lactis* umfassen. Daher muss an diesem Austausch mindestens ein Phage beteiligt sein, der seine DNA in einen Nichtwirtsstamm über die Gattungsgrenze hinweg injizieren kann. Die Transduktionen mit *S. thermophilus*-Phagen in *L. lactis* Bu2-60 zeigen, dass dieses Ereignis mit geringer Häufigkeit auftreten kann. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit einer Injektion der DNA aus zwei unterschiedlichen lytischen Phagen relativ gering. Eine Beteiligung der in *L. lactis* weit verbreiteten Prophagen erscheint wahrscheinlicher.

Die Ähnlichkeiten zwischen *S. thermophilus* und *L. lactis* beschränken sich nicht nur auf die Genome der Phagen. Die Gene der Typ I R/M-Systeme auf dem *S. thermophilus*- Plasmid pSt0 (Geis *et al.*, 2003) und pER35 (Solow und Somkuti, 2001) weisen Homologien von mehr als 90% zu entsprechenden Sequenzen aus *L. lactis*, weshalb horizontaler Gentransfer bereits vermutet wurde. Die Funktionalität der R/M-Systemen aus *L. lactis* in *S. thermophilus* ist nachgewiesen (Moineau *et al.*, 1995). Ein genetischer Austausch durch Konjugation zwischen *S. thermophilus* und *L. lactis* mit konjugativen Plasmiden ist möglich (Kleinschmidt *et al.*, 1993), allerdings konnten bisher in *S. thermophilus* keine nativen konjugativen Plasmide identifiziert werden. Die Annahme, dass bei dem Plasmid pER35 ein genetischer Austausch zwischen *S. thermophilus* und *L. lactis* über den Mechanismus der Transduktion erfolgt ist, wird durch das Vorkommen der Homologien zu *S. thermophilus* *cos*-Regionen gestützt. In der Sequenz des Plasmids pSt0 konnten jedoch keine *cos*-Regionen identifiziert werden. Diese könnten sekundär durch Deletion verloren gegangen sein. Ausserdem muss die Übertragung durch Transduktion nicht zwangsläufig mit *cos*-Homologien verknüpft sein. Andere Mechanismen, wie die Erkennung der *pac*-Stellen oder die Integration der Wirts-DNA in das Phagengenom,

kommen bei Transduktionen häufig vor und können somit eine Ursache für horizontalen Gentransfer sein. Transduktion ist das bisher erste System, das auf Funktionen nativer Plasmide beruht und einen nachweisbaren Gentransfer zwischen *S. thermophilus* und *L. lactis* vermitteln kann.

4.3. Praktische Anwendungen

4.3.1. Plasmidkurierung mittels Transduktion

Für die genetische Analyse ist die Präsenz eines Plasmids in einem Bakterienstamm häufig unerwünscht. Um plasmidfreie Derivate herzustellen, gibt es eine Reihe von Methoden, wie z.B. die Protoplasten-Herstellung, Anwendung von Gyrase-Inhibitoren und Wachstum bei hohen Temperaturen (Trevors, 1986; Sinha, 1989). Desweiteren kann durch Transformation eines inkompatiblen Plasmids mit einem Gen für einen selektiven Marker das bereits vorhandene Plasmid verdrängt werden (Muriana und Klaenhammer, 1987; Novick, 1987; van der *et al.*, 1988; Bringel *et al.*, 1989). Bei Wachstum ohne selektiven Druck kann das Plasmid mit Markergen dann ebenfalls verloren gehen. Zurück bleibt ein plasmidfreier Stamm. Bei dieser Methode ist es unerheblich, auf welchem Wege das Plasmid mit Markergen in die Zelle gelangt ist. Deshalb bietet sich als Alternative zur Transformation die Transduktion an. Die Plasmidkurierung durch Transduktion war in *S. thermophilus* J34 erfolgreich. Das transduzierte Plasmid konnte durch nicht-selektive Wachstumsbedingungen entfernt werden. Hierbei war die Ausbeute an plasmidfreien Zellen sehr gering. Dieses beruht auf der Tatsache, dass die nativen Plasmide, auf denen die Plasmid-Konstrukte basieren, sehr stabil replizieren (Geis *et al.*, 2003). Der Vorteil der Transduktion gegenüber der Transformation ist die wesentlich höhere Übertragungshäufigkeit. Da Plasmid-Inkompatibilitäten die Übertragungshäufigkeit durch Transformation senken können (van der *et al.*, 1988), bietet sich ein Übertragungssystem an, das möglichst hohe Transferhäufigkeiten liefert.

4.3.2. Die Bedeutung der *cos*-Region als Per-System

Es sind zahlreiche Systeme bekannt, mit denen sich Bakterien gegen die Infektion durch Phagen schützen können. Resistenz-Systeme, in denen Phagen-Sequenzen beteiligt sind, werden als Per-Systeme („Phage encoded resistance“) bezeichnet. Dieser Resistenz-Phänotyp wurde erstmals für die in Plasmide klonierte *ori*-Region

des Laktokokken Phagen $\Phi 50$ beschrieben (Hill *et al.*, 1990). Diese klonierten DNA-Abschnitte konkurrieren bei der Replikation der Phagen-DNA mit dessen eigenem Replikationsursprung, so dass eine Austitrierung der Replikationsproteine stattfindet (McGrath *et al.*, 1999). Charakteristisch für Per-Phänotyp ist, dass die Stärke der Resistenz von der Kopienzahl der plasmidkodierten *ori*-Region abhängig ist (O'Sullivan *et al.*, 1993; McGrath *et al.*, 2001). Bei den *ori*-abhängigen Systemen handelt es sich um Resistenzen, die durch Klonierung eines Teils des Phagen-genoms entstanden sind. Das Vorkommen der Phagen-Sequenzen auf nativen *S. thermophilus*-Plasmiden legt eine Prüfung auf deren mögliche Resistenz steigernde Eigenschaften nahe.

Wachstumsversuche und Spot-Tests beweisen, dass die Plasmide pAG106AE, pSt04 und pAGS4E2 die Sensitivität des Stammes St11 gegenüber den Phagen P1109 senken. In entsprechenden Versuchen mit dem Stamm a10 war nur für das Plasmid pAGJ34E eine gesteigerte Resistenz erkennbar. Die Analyse der Phagen-DNA aus transduzierenden Lysaten zeigte einen hohen Anteil an Plasmid-DNA (siehe Kapitel 4.2.2, S. 94). Da jedes zweite Phagenpartikel Plasmid-DNA tragen kann, bedeutet dies eine Reduzierung der infektiösen Phagenpartikel um die Hälfte. Die Ermittlung der Burst-Size des Phagen auf Derivaten bestätigte die Tendenz, dass der „Burst“ an infektiösen Phagen durch die Plasmide pST04 und pAG106AE um ca. die Hälfte gesenkt wurde. Hierfür war die *cos*-Region verantwortlich, wie der vergleichsweise hohe erzielte „Burst“ mit dem Stamm St11 (pAG106AE1) zeigte, dessen Plasmid keine *cos*-Region zeigte.

Die auf den Phagen P1109 beschränkte Wirkung der Plasmide ist auf die für *S. thermophilus*-Phagen geringe Burst-Size zurückzuführen. Die Phagenproliferation kann bei kleinen „Bursts“ eher durch eine Verringerung der „Burst-Size“ gestört werden, als bei Phagen, die über einen deutlich höheren „Burst“ verfügen.

Warum in Spot-Tests Resistenz für Stämme mit dem Plasmid-Derivat pAGS4E2 und dem nativen Plasmid pST04 beobachtet wurden, aber nicht für solche mit dem Plasmid pAGS4E, konnte nicht geklärt werden. Die Transduktionshäufigkeiten waren für pAGS4E2 nur geringfügig höher als für pAGS4E. Es unterscheidet sich vom letzterem nur in der Größe, in dem Fehlen der *ori*-Region und dem Fehlen des Gens für das kleine Hitzeschockprotein.

Fermentationstechnisch können schwache Per-Systeme von Bedeutung sein, da eine leichte Lyse der Stämme einer Starterkultur positive Effekte auf den Fermentationsprozess haben kann (Moscoso und Suarez, 2000).

4.3.3. Transduktion ohne Selektion

Die Notwendigkeit der Verwendung selektiver Marker für die Übertragung genetischer Elemente beruht darauf, dass der Transfer in der Regel mit geringen Häufigkeiten geschieht. Weil deshalb in der Gesamtmenge der Empfängerzellen nur ein sehr kleiner Anteil das zu übertragende Element aufnimmt, sind reine „screening“ Methoden wie Plasmidpräparation oder Hybridisierung zur Detektion von Klonen praktisch nicht geeignet. Hingegen ermöglicht es die Anwendung selektiver Marker aus einer großen Zahl an Zellen, die geringe Menge an Transformanten oder Transduktanten zu detektieren. In der Forschung häufig verwendete Marker sind Antibiotikaresistenzen. Diese Marker eignen sich jedoch nicht in Lebensmittel relevanten Anwendungen und werden deshalb durch so genannte „food-grade“ Marker ersetzt, die gesundheitlich unbedenklich sind. Ein Beispiel für einen solchen Marker ist das Gen für die α -Galaktosidase (Labrie *et al.*, 2005). Die Verwendung selektiver Marker wäre unnötig, wenn der Übertragungsmechanismus so effektiv wäre, dass ein bedeutender Teil der Zellpopulation das genetische Element aufnehmen würde.

In *S. thermophilus* ist die DNA-Übertragung durch Transformation trotz umfangreicher Optimierungen (Somkuti und Steinberg, 1988; O'Sullivan und Fitzgerald, 1999) nicht effizient genug, um auf Selektion verzichten zu können. Gleiches gilt für die Genübertragung mittels Konjugation in *S. thermophilus* (Kleinschmidt *et al.*, 1993).

Bei *S. thermophilus* erlaubten einige Stamm/Phagen-Kombinationen eine effiziente Transduktion. Mit Transduktionshäufigkeiten von bis zu 10^{-2} KbE/PbE ergibt sich theoretisch für eine M.O.I von 1 ein Quotient Transduktanten/Zelle von ungefähr 10^{-2} . Dies erlaubt ein Screening nach Transduktanten durch Plasmidaufschlüsse oder Hybridisierung. Mittels der Optimierung des Transduktionsprotokolls konnte die Effizienz verbessert werden. Im Folgenden werden die einzelnen Optimierungen besprochen.

Phagenkonzentration

Für Transduktionen ohne nachfolgende Selektion ist die Höhe der angewendeten Phagenkonzentration ein grundlegender zu optimierender Parameter. Je höher die eingesetzte Phagenkonzentration war, desto höher war der Quotient Transduktanten/Zelle. Der Vorteil der Verwendung hoher Phagenkonzentrationen ergibt sich aus dem theoretischen statistischen Modell (siehe Kapitel 3.4.3, S. 67). Ein identisches Verhalten in praktischen Versuchen ist nicht zu erwarten, da es sich bei dem statistischen Modell um eine Vereinfachung handelt. Ein Nachteil sehr hoher Phagenkonzentrationen ist, dass durch Re-Infektion keine Transduktanten isoliert werden können. Eine Inaktivierung der Lysate mit UV-Licht kann diesen Effekt abmildern. Da die Reduzierung der Zahl an infektiösen Phagenpartikel größer ist als die der Transduktanten, bleibt der Vorteil der hohen Phagenkonzentrationen weitgehend erhalten. In anderen Arbeiten wurde das Problem der Re-Infektion dadurch reduziert, dass die Zellen der Transduktionsansätze zentrifugiert und gewaschen wurden (Ravin *et al.*, 2006). Bei *S. thermophilus* wurden die Transduktionshäufigkeit dadurch allerdings gesenkt.

Die Lyse der Transduktanten durch Phagen muss bei der Interpretation der Optimierungsversuche berücksichtigt werden. Wird durch eine angewandte Methode das Zellwachstum vermindert, kann dies auch die Phagenproliferation verlangsamen und somit zu einer leichten Erhöhung der Transduktionshäufigkeit führen. Das gilt für den Einsatz von DNase in der Transduktion, sowie die Vereinzelnung der Zellen durch Ultraschall und die UV-Bestrahlung der Empfängerzellen. Geringe Steigerungen der Transduktionshäufigkeiten oder des Transduktanten/Zelle-Quotienten waren deshalb nicht ausschlaggebend.

Die geringe Phagenkonzentration in Lysaten aus *S. thermophilus* a10 und St11 schränken die einsetzbare Phagenmenge ein. Aufgrund der Bildung von Phagenaggregaten führen herkömmliche Methoden der Lysat-Aufkonzentrierung, wie z.B. Zentrifugation, zu Problemen bei der Bestimmung der Phagenkonzentration und bei der Reproduzierbarkeit. Da die Stärke dieses Effekts stammabhängig ist, könnte das Problem durch die Wahl geeigneter Stämme, mit denen hohe Phagenkonzentrationen erzeugt werden können, vermieden werden. In den beschriebenen Versuchen war dies nicht möglich, da plasmidtragende Derivate dieser Stämme weder durch Transformation noch durch Transduktion hergestellt werden konnten.

Behandlung der Lysate und Zellen mit UV-Licht

Bestrahlung der Phagenlysate mit UV-Licht ist eine verbreitete Methode, um Transduktionshäufigkeiten zu steigern. Insbesondere wurde sie verwendet, um zwischen Plasmid-Transduktion und Transduktion chromosomaler Marker zu unterscheiden (Arber, 1960; Benzinger und Hartman, 1962), aber vereinzelt kann auch die Plasmid-Transduktion durch UV-Licht gesteigert werden (Rubin und Rosenblum, 1971). Die Versuche mit dem Phagen P53 zeigten, dass die Zahl der infektiösen Phagenpartikel durch die UV-Bestrahlung stärker reduziert wurden als die Zahl transduzierter Zellen. UV-Licht wirkt über die Beschädigung der DNA. Tritt dieser Schaden im Phagen genom auf, so führt dieses mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem defekten Phagen. In einem transduzierenden Phagenpartikel sind mehrere Kopien eines Plasmids vorhanden (siehe Kapitel 4.2.2, S. 94), so dass eine Beschädigung der DNA mit geringerer Wahrscheinlichkeit in nicht replizierbare Plasmide resultiert. Die Erhöhung der absoluten Zahl an Transduktanten bei dem Plasmid pSHE1 ist wahrscheinlich auf eine Reduzierung der Transduktanten-Lyse zurückzuführen, wie auch z.B. bei Transduktionen in *Caulobacter* (Ely und Johnson, 1977). Für Transduktion ohne Selektion ist es wichtig, dass Zellen, die nicht durch Transduktion Plasmid-DNA aufnehmen, durch Infektion mit einem intakten Phagen lysiert werden. Ohne diesen Prozess verschiebt sich das Transduktanten/Zelle-Verhältnis aufgrund des erhöhten Anteils an überlebenden Zellen zu Ungunsten der Übertragung. Die Lysat-Bestrahlung mit UV-Licht eignet sich allerdings, um die durch hohe Phagenkonzentration bedingten Schwankungen der Transduktionshäufigkeit zu lösen (s.o.). Bei Transduktion ohne Selektion ist zu beachten, dass die Konzentration an infektiösen Phagen allerdings mindestens so hoch sein muss, dass ein wesentlicher Anteil der nicht transduzierten Zellen lysiert wird.

Eine Bestrahlung der Rezipienten-Zellen mit UV-Licht hatte keine Erhöhung der Transduktionshäufigkeit zur Folge. Eine Steigerung hätte für eine Beteiligung eines Rekombinationsprozesses bei der Bildung eines replizierende Monomers aus dem Plasmidkonkatemer gesprochen. Die starke Abnahme der Transduktionshäufigkeit für Versuche mit Zentrifugation konnte auch in vergleichbaren Versuchen ohne UV-Behandlung beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.1, S. 100). Eine Erhöhung der Zell/Phagendichte führte hierbei wahrscheinlich zu einer Erhöhung der Zahl an Mehrfachinfektionen.

Behandlung der Lysate mit DNase

DNase wurde getestet, da in-vitro Experimente gezeigt haben, dass eine Erhöhung der Zahl transduzierender Phagenpartikel durch die Zugabe von DNase erreicht werden kann (Masters, 1996). Die DNase baut in diesem Fall DNA ab, die nicht vollständig in den Phagenkopf verpackt wurde und somit die Fertigstellung des Phagen blockiert. Nach Beseitigung dieses Hindernisses durch DNase kann die Fertigstellung des Phagenpartikels abgeschlossen werden. Ein derartiger Zusammenhang konnte in Lysaten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zellkonzentration

Die Zellkonzentration der Empfängerkultur ist ein wichtiger Faktor. Die statistischen Modelle für die Berechnung der Phagen-Adsorption gelten für hohe Phagen- und Zellkonzentrationen. Minimale Zellkonzentrationen sind notwendig für die Adsorption und Phagen-Proliferation (Wiggins und Alexander, 1985).

Die Optimierung der Zellkonzentration der Empfängerzellen führte zu einer Erhöhung des Quotienten Transduktanten/Zelle. Die Verwendung niedriger Zellkonzentration reduziert zudem die Phagenproliferation und die damit verbundene Lyse der Transduktanten.

Adsorptionszeit

Für die Optimierung des Transduktionsprotokolls war insbesondere die Dauer der Adsorptionszeit entscheidend. Sie muss für jede Stamm/Phagen-Kombination angepasst werden. Da der Phage P1109 nur relativ schwach an St11 adsorbiert, ist zur Steigerung der Transduktionshäufigkeit eine Verlängerung der Adsorptionszeit sehr effektiv. Experimente mit variabler Expressionszeit zeigen, dass die Abnahme der Transduktionshäufigkeiten für Inkubationszeiten länger als 30 min auf Re-Infektion der Transduktanten beruht. Das starke Absinken der Transduktionshäufigkeit zeigt eine Fehlerquelle für Transduktionen auf. Eine genaue Einhaltung der Adsorptionszeiten ist notwendig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, da selbst kleine Schwankungen die Transduktionshäufigkeit deutlich verändern können.

Ca²⁺ Konzentration

Ca²⁺ ist für die DNA-Injektion der Phagen in die Zelle von Bedeutung (Watanabe und Takesue, 1973; Watanabe *et al.*, 1979; Nagaraja *et al.*, 1980; Bonhivers und Letellier, 1995). Außerdem wird ein stabilisierender Effekt auf die DNA im Phagenkopf vermutet (Sechaud *et al.*, 1988). Die Transduktionsversuche in *S. thermophilus* bestätigen, dass Ca²⁺ die Transduktionshäufigkeit effizient steigern kann. Bei Zugabe von Ca²⁺ in Konzentrationen über 80 mM bildet sich in den Versuchsansätzen ein Niederschlag, der vermutlich aus Ca₂PO₄ besteht. Hierdurch wird dem Medium ein Teil des zugeführten Ca²⁺ wieder entzogen, wodurch die Messung der Auswirkung von Ca²⁺ etwas verfälscht sein kann.

Transduktion ohne Selektion

Abb. 48 zeigt die aus den Versuchen abgeleiteten Parameter für eine selektionsfreie Transduktion, ihre Grenzen und mögliche Problemlösungen.

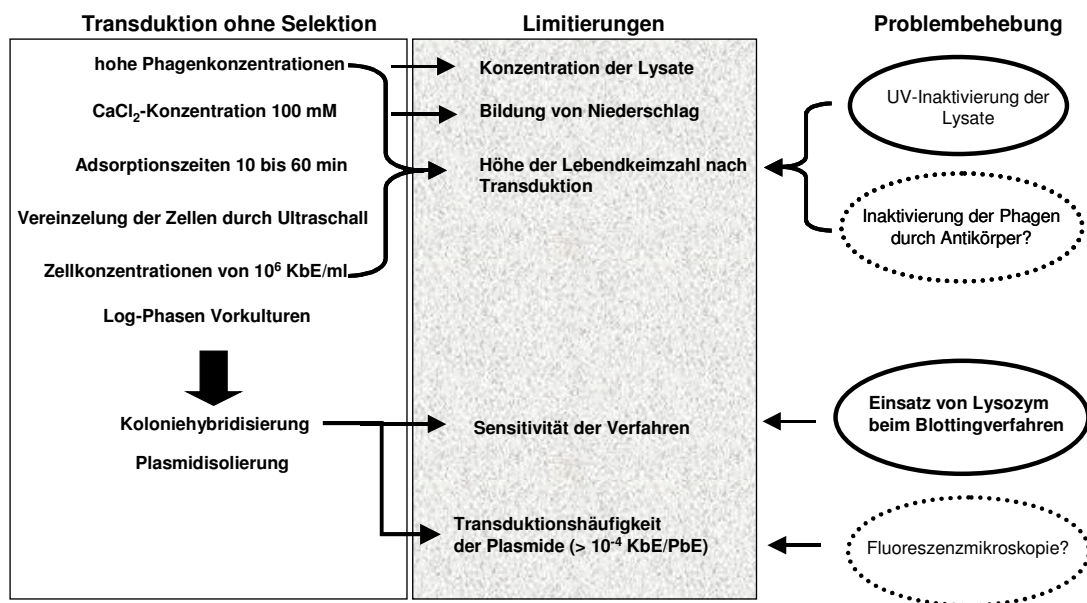


Abb. 48: Transduktionsbedingungen zur Übertragung der Plasmide ohne Selektion. Grau hinterlegt sind Limitierungen des Verfahrens, rechts sind mögliche Verbesserungen des Verfahrens angegeben.

Die Isolierung der Transduktanten ohne Selektion beweist, dass sich ein optimiertes Transduktionsprotokoll für eine gentechnikfreie Plasmid-Übertragung eignet. Auf der anderen Seite wurden auch einige Einschränkungen für dieses Verfahren deutlich. Die Identifizierung der Transduktanten durch Plasmidaufschlüsse oder Koloniehybridisierung können nur für Plasmide mit sehr hohen Transduktionshäufigkeiten durchgeführt werden. Das Plasmid pAG106AE wurde bei

einer gemessenen Transduktionshäufigkeit von 10^{-2} KbE/PbE mit einer maximalen Effizienz von 0,15 Transduktanten/Lebendkeimzahl übertragen. Geht man davon aus, dass man für eine Detektion durch Koloniehybridisierung ungefähr einen Transduktanten pro 500 Zellen benötigt, kann man ableiten, dass nur Plasmide mit einer Transduktionshäufigkeit von mindestens 1×10^{-4} KbE/PbE ohne Selektion detektiert werden können. Dies ist ein theoretischer Wert, da die Übertragungseffizienz dieses Plasmids in *S. thermophilus* a10 wesentlich schlechter als in *S. thermophilus* St11 war, obwohl für beide Stämme ähnliche Transduktionshäufigkeiten erzielt wurden. Zahl und Verteilung der Phagenrezeptoren ist hier von entscheidender Bedeutung. Für *S. thermophilus* a10 kann man aus den Versuchen als untere Grenze eine Transduktionshäufigkeit von ungefähr 10^{-3} KbE/PbE festlegen. Für die Transduktion des nativen Plasmids pSt04 ist eine weitere Verbesserung des Transduktions-Verfahrens und Detektions-Verfahrens notwendig. Für die Koloniehybridisierung müssen DNA-Sonden konstruiert werden, die ein deutliches Signal geben, ohne einen hohen Anteil falsch-positiver Signale zu erzeugen. Zum Anderen war nur die selektionsfreie Übertragung in Wirtsstämmen erfolgreich. Das hängt damit zusammen, dass Zellen der Nichtwirtsstämmen durch intakte Phagen nicht lysiert werden können. Bei der selektionsfreien Übertragung durch Transduktion ist dies jedoch wichtig, um hohe Werte für den Transduktanten/Zelle-Quotienten zu erhalten.

Selektion mittels des kleinen Hitzeschockproteins

Ein weiteres Verfahren ist die Ausnutzung der spezifischen Eigenschaften der Plasmide. Das Plasmid pSt04 kodiert für ein kleines Hitzeschockprotein, mithilfe dessen für einige *S. thermophilus* und *L. lactis*-Stämme durch die Anwendung hoher Inkubationstemperaturen Transformanten selektiert werden konnten (Demerdash *et al.*, 2003). Die Anwendung dieses Verfahrens auf die Stämme der Transduktionsexperimente schlugen fehl, ebenso wie bei dem Stamm *S. thermophilus* St11, der schon erfolgreich für das Verfahren angewendet wurde. Die minimale Erhöhung der Toleranz gegenüber Hitze und pH-Wert ist nicht ausreichend, um Selektion zu betreiben. Stressantworten sind komplexe Vorgänge, in denen minimale Unterschiede in den Wachstumsbedingungen die Funktionalität dieser Systeme entscheidend beeinflussen können. Wichtige Faktoren sind z.B. Salzkonzentration, Zellstatus und Art und Weise der Temperaturerhöhung.

Intensivere Studien zur Identifikation dieser Faktoren und deren Wirkung sind notwendig, um das System auf andere Stämme zu übertragen.

4.4. Bilanz und Ausblick

Transduktion in *S. thermophilus* war bisher nur wenig in der Literatur beschrieben. *S. thermophilus* eignet sich nur eingeschränkt für die Methoden der Transformation und Konjugation, so dass Alternativen hierzu benötigt werden. Diese Arbeit zeigt, dass Transduktion mit *cos*-Phagen in *S. thermophilus* ein effizientes Werkzeug darstellt, um Plasmide zu übertragen. Um die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens weiter zu steigern, sind insbesondere zwei Punkte zu optimieren. Erstens ist die Phagenkonzentration der Lysate ein limitierender Faktor, und zweitens muss die Lyse der Transduktanten durch Phagenproliferation während der Transduktion minimiert werden. Ein Ansatz hierfür wäre die Verwendung inaktivierender Antikörper. Diese müssen gegebenenfalls speziell für die einzelnen Phagen hergestellt werden. Die Verdünnungsexperimente zeigten, dass ein erheblicher Teil der Lyse der Transduktanten auf den Platten stattfindet, so dass sehr hohe Konzentrationen an Antikörper benötigt werden, um diese Lyse zu inhibieren.

Weitere Verbesserungen der Methode sind denkbar. Bei dem bisherigen Verfahren werden Zellen, an die weder infektiöse noch transduzierende Phagenpartikel adsorbiert haben, mit den anderen Zellen ausplattiert. Hierdurch wird die Höhe des Transduktanten/Zelle-Quotienten limitiert. Methoden, die Zellen mit adsorbierten Phagenpartikeln von den übrigen Zellen trennen können, würden diese Einschränkung aufheben. Die Trennung über Immunoselektion und Fluoreszenzmikroskopie wurde bereits zur Isolierung spontaner Resistenzmutanten erfolgreich verwendet (Viscardi *et al.*, 2003). Zellen, an die Phagen adsorbiert haben, werden in diesem Verfahren durch Antikörper markiert und über Fluoreszenzmikroskopie von den anderen Zellen getrennt. Nach der Trennung überleben nur diejenigen Zellen, die nur Plasmid-DNA aber keine Phagen-DNA aufgenommen haben, wodurch sich ein sehr hoher Transduktanten/Zelle Quotient ergeben würde. Die Effizienz dieses Verfahren ist limitiert durch die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Phage irreversibel an eine Zelle adsorbiert, sie aber nicht lysiert. Die Höhe dieser Wahrscheinlichkeit bestimmt, wie groß der Anteil an plasmidfreien Zellen ist. Die Kombination dieser Methode mit den Optimierungen des

Transduktionsprotokolls und der Methode der Bestimmung irreversibler Phagenadsorption könnte es möglich machen, die Transduktion ohne Selektion auf ein weites Spektrum an Plasmiden anzuwenden.

Die Transduktion ist nicht nur methodisch von Bedeutung. Transduktion spielt für die Vermittlung des horizontalen Gentransfers eine wichtige Rolle. Die Übertragung kann dabei über die Artgrenze hinaus erfolgen. Der Nachweis, dass zwischen *S. thermophilus* und *L. lactis* ein horizontaler Gentransfer mittels Transduktion auch über die Genus-Grenze hinaus erfolgen kann, stellt den bisher ersten Nachweis eines horizontalen Gentransfers zwischen *L. lactis* und *S. thermophilus* dar. Dieser wird aufgrund des Auftretens hochgradiger Homologien zwischen Plasmid- und Phagen-Sequenzen schon länger postuliert. Eine Ausdehnung der Versuche auf ein breiteres Spektrum an Empfängerstämmen (z. B. andere Streptokokken und Laktobacillen) ist sinnvoll, um die Reichweite des horizontalen Gentransfers zu bestimmen. Besonders pathogene und saprophytäre Streptokokken wären hierbei von Interesse. Der horizontale Gentransfer über Bakteriophagen hat auch im Zusammenhang mit der so genannten Phagentherapie eine Bedeutung. Durch das weltweite Auftreten Antibiotika resistenter bakterieller Erreger wird sie verstärkt als Alternative zur Antibiotikatherapie erforscht (Merril *et al.*, 1996; Levin und Bull, 1996; Stone, 2002a; Stone, 2002b; Gorski *et al.*, 2003). Bakteriophagen haben allerdings nachweislich die Eigenschaft, Antibiotikaresistenz-Gene mittels Transduktion in andere Stämme zu übertragen (Brabban *et al.*, 2005). Durch horizontalen Gentransfer könnte innerhalb des Körpers die Resistenz in andere Erreger übertragen werden. Deshalb ist insbesondere die Kombination einer Phagentherapie mit einer herkömmlichen Antibiotikatherapie nicht angezeigt. Hierbei würden durch die Anwendung des Antibiotikums pathogene Erreger, welche die Antibiotikaresistenz aufgenommen haben, angereichert werden.

Obwohl seit langem bekannt, zeigen die hier berichteten Experimente, dass Transduktion immer noch sowohl auf der Grundlagen- als auch auf Anwendungsebene von aktueller Bedeutung ist. Ihre methodische Relevanz und die bedeutende Rolle im horizontalen Gentransfer werden auch in Zukunft die Phagenbiologie beschäftigen und prägen.

5. Zusammenfassung

Phagenresistente Starterkulturen sind wegen der durch Bakteriophagen verursachten wirtschaftlichen Verluste in der Milchwirtschaft von großem Interesse. Eine Möglichkeit zur Stammoptimierung besteht in der gezielten Übertragung relevanter Gene. Transduktion, ein durch Bakteriophagen vermittelter Gentransfer, ist eine Alternative zu den Standardmethoden der Transformation und Konjugation, deren Effizienz in *Streptococcus thermophilus* nur gering ist. In dieser Arbeit wird Transduktion in *S. thermophilus* charakterisiert und ihr Nutzen als natürliche, nicht unter die Beschränkung des Gentechnikrechts fallende DNA-Übertragungsmethode beschrieben. Verschiedene Plasmid-Derivate auf der Basis nativer *S. thermophilus*-Plasmide konnten mit den *cos*-Phagen P1109, P53, a10/J9 und PST übertragen werden. Plasmide wurden in konkatemerer Form in den Phagenkopf verpackt, ohne dabei mit Phagen-DNA assoziiert zu sein. Auf den Sequenzen der transduzierbaren Plasmide konnten DNA-Homologien zu *cos*-Regionen und *ori*-Regionen verschiedener *S. thermophilus*-Phagen identifiziert werden. DNA-Vergleiche zwischen den verschiedenen *cos*-Regionen zeigten konservierte DNA-Bereiche auf, in denen für *cos*-Regionen typische „direct“ und „indirect repeats“ liegen. Diese Abschnitte wiesen z.T. Homologien zur *cos*-Regionen des *Lactococcus lactis*-Phagen BK5-T und des *Lactobacillus gasseri*-Phagen adh auf. Die Klonierung der *cos*-Region des Phagen P53 und Transduktionsexperimente mit Plasmid-Deletionsderivaten zeigten, dass die *cos*-Region für hohe Transduktionshäufigkeiten notwendig und hinreichend war. *S. thermophilus* St11-Derivate, welche die Plasmide pAG106AE, pSt04 und pAGS4E2 trugen, wiesen eine verringerte Sensitivität gegenüber dem Phagen P1109 auf. Dies beruhte auf einer Verringerung des „Bursts“ an infektiösen Phagenpartikeln. Für den Stamm a10 ergab sich einer Verringerung der Sensitivität gegenüber P1109 nur für das Plasmid pAG106AE. Transduktionen konnten mit verschiedenen Empfängerstämmen durchgeführt werden. Einige Wirts- und Nichtwirtsstämmen zeigten trotz hoher Adsorption keine nachweisbare Transduktion. Mit den Phagen P53 und P1109 konnten in den Stämmen 55n und DC2 Restriktions-/Modifikationssysteme nachgewiesen werden. Das Vorhandensein des Prophagen TP-J34 im *S. thermophilus*-Stamm J34 reduzierte die Höhe der Transduktion um den Faktor 50. Neben *S. thermophilus*-Stämmen eignete sich auch der *L. lactis*-Stamm Bu2-60 als Empfänger für Transduktionen mit *S. thermophilus*-Phagen, was die Bedeutung der Transduktion für horizontalen Gentransfer aufzeigt. Durch Optimierung des Transduktionsprotokolls konnten Transduktanten für die Plasmide pAG106AE und pAGJ34E ohne Selektion in *S. thermophilus* St11 und a10 detektiert werden. Entscheidende Parameter dazu waren hohe Phagenkonzentrationen, eine Zellvereinzellung durch Ultraschall, angepasste Adsorptionszeiten, eine Verwendung logarithmischer Vorkulturen, niedrige Zellkonzentrationen von 10^6 KbE/ml und eine CaCl_2 -Konzentration von 100 mM.

6. Summary

Because of commercial losses due to phage infection, development of phage resistant starter strains is important for dairy industry. For this purpose directed genetic exchange is one option. Transduction, a phage mediated gene transfer, is an alternative to standard methods as transformation and conjugation, which are not very efficient in *Streptococcus thermophilus*. This work characterizes transduction in *S. thermophilus* and its use as a gene transfer system avoiding genetic engineering. Several derivatives of native *S. thermophilus* plasmids were successfully transduced with *S. thermophilus* *cos*-type phages P1109, P53, a10/J9 and PST. Plasmid DNA was packaged as concatemers into the phage head. Amount of plasmid containing phage particles was up to 50% in comparison to infective particles. All transducible plasmids and several native plasmids of *S. thermophilus* share homologies to *cos*-regions and *ori*-regions of *S. thermophilus* phages. On the basis of DNA alignments with *cos*-regions from *S. thermophilus* phages and plasmids, highly conserved sequences were characterized, containing direct and indirect repeats typical for *cos*-regions. Conserved sequences showed homologies to the *cos*-regions of the *Lactococcus lactis* phage BK5-T and the *Lactobacillus gasseri* phage adh. Cloning of the *cos*-region of P53 and transduction experiments with deletion derivatives of pAGJ34E and pAG106AE showed that in contrast to *ori*-regions homologies to *cos*-regions were responsible and sufficient for high transduction frequencies. Derivatives of *S. thermophilus* St11 harbouring plasmids pAG106AE, pSt04 or pAGS4E2 were less sensitive against infection by phage P1109. This was due to a reduced burst of infective phage particles. For strain a10, reduction of phage sensitivity was only observed for plasmid pAG106AE. Transduction were successfully done with several host and non-host strains of *S. thermophilus*. Several host and non-host strains failed as recipients even in spite of high adsorption. Restriction-/modification systems were detected in strains 55n and DC5. The occurrence of prophage TP-J34 reduces the transduction frequency 50fold compared to a prophage-cured derivative of *S. thermophilus* J34. *L. lactis* was also suitable as an recipient in transduction with *S. thermophilus* phages, showing the impact of transduction on horizontal gene transfer. For plasmids pAGJ34E and pAG106AE, an optimised transduction protocol was applied to detect transductants of *S. thermophilus* St11 and a10 without use of selective marker. Important parameters were the use of high phage concentrations, adapted adsorption times, use of logarithmic pre-cultures, low cell concentrations of 10^6 cfu/ml and a CaCl_2 concentration of 100 mM.

7. Anhang

7.1. Sequenzvergleiche

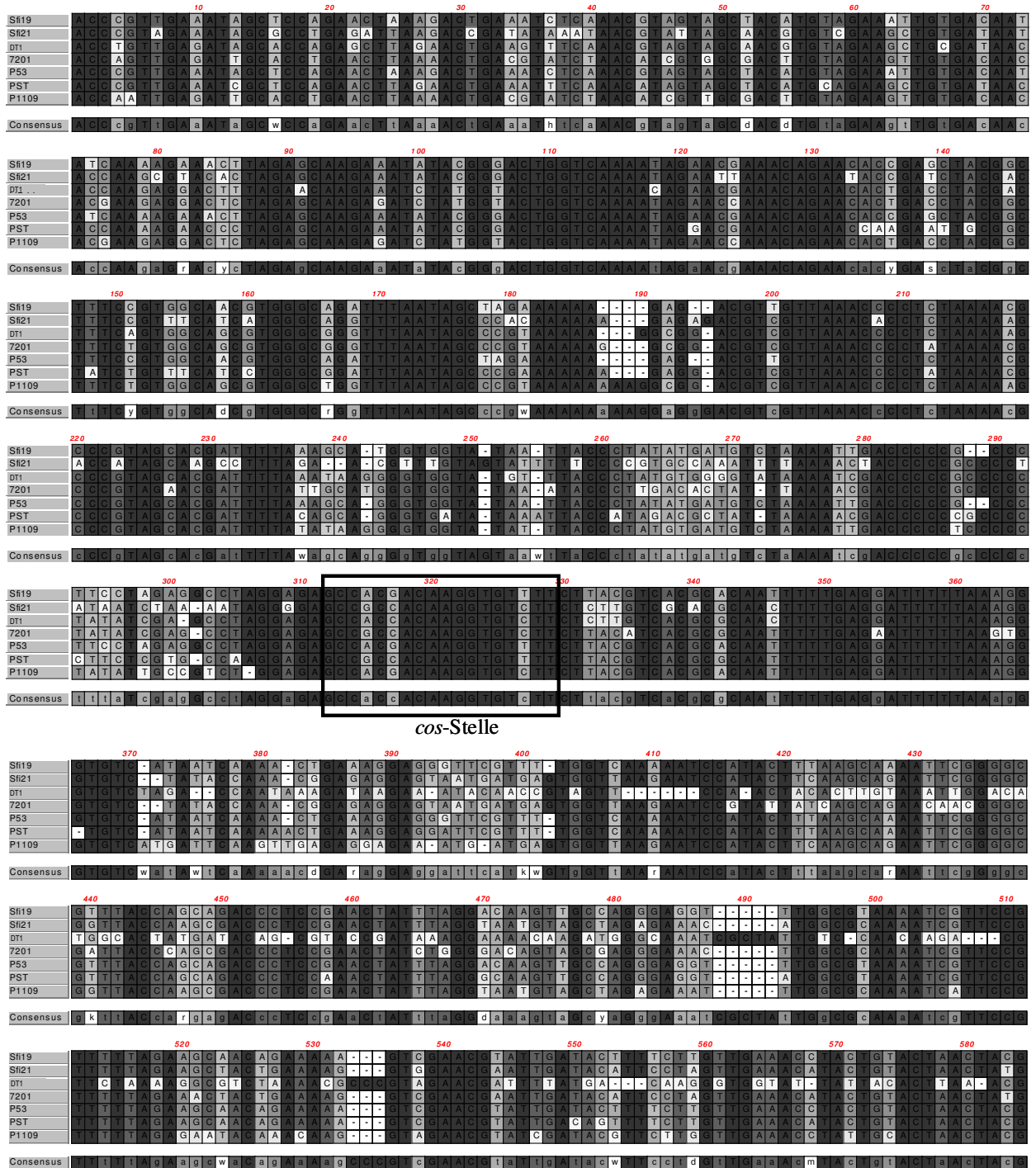


Abb. 49: Sequenzvergleich der P1109, P53 und PST *cos*-Regionen mit den Sequenzen der *S. thermophilus* *cos*-Phagen. Die Sequenzen der Phagen Sfi19, Sfi21, 7201, DT1 stammen aus der NCBI Datenbank. Die Durchführung des Sequenzvergleiches erfolgte mit DS Gene (Accelrys). Die *cos*-Stelle des Phagen P53 ist durch eine Box markiert.

7.2. Restriktionsprofile der Phagengenome

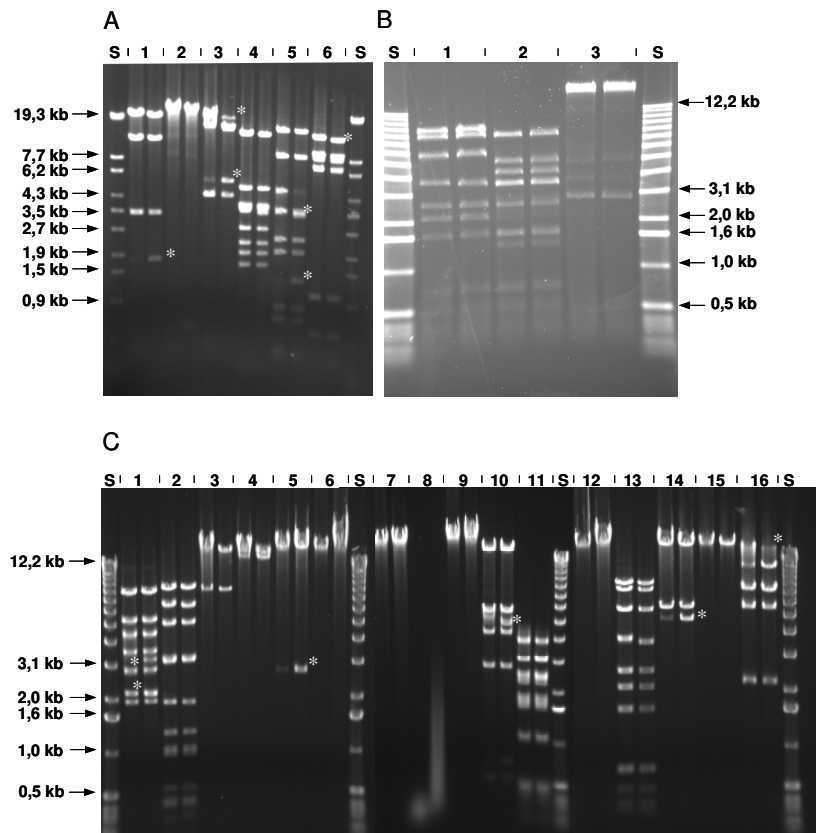


Abb. 50: Restriktionshydrolyse der P1109-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen; 0,8%iges Agarosegel; S: Lambda/Styl, 0,25 µg (Bild A) bzw. Molecular Marker X (Roche, Bild B bis E); je 0,2 bis 0,5 µg hydrolysierte P1109-DNA pro Bande, jeweils rechte Spur mit hitzedenaturierter DNA beladen; verwendete Restriktionsenzyme **A:** 1. Aval; 2. Stul; 3. Sall; 4. EcoRI, 5. Avall, 6. Xbal; **B:** 1. Clal/EagI, 2. Clal/BstXI, 3. EagI/BstXI; **C:** 1. HindIII, 2. EcoRI, 3. SacI, 4. XhoI, 5. EagI, 6. PstI; 7. Accl, 8. Apal, 9. NotI, 10. BstXI, 11. HincII; 12. KpnI, 13: Clal, 14: BamHI, 15: Smal, 16: SpeI. Sternchen markieren DNA-Banden, die nur nach Hitzebehandlung aufgetreten sind.

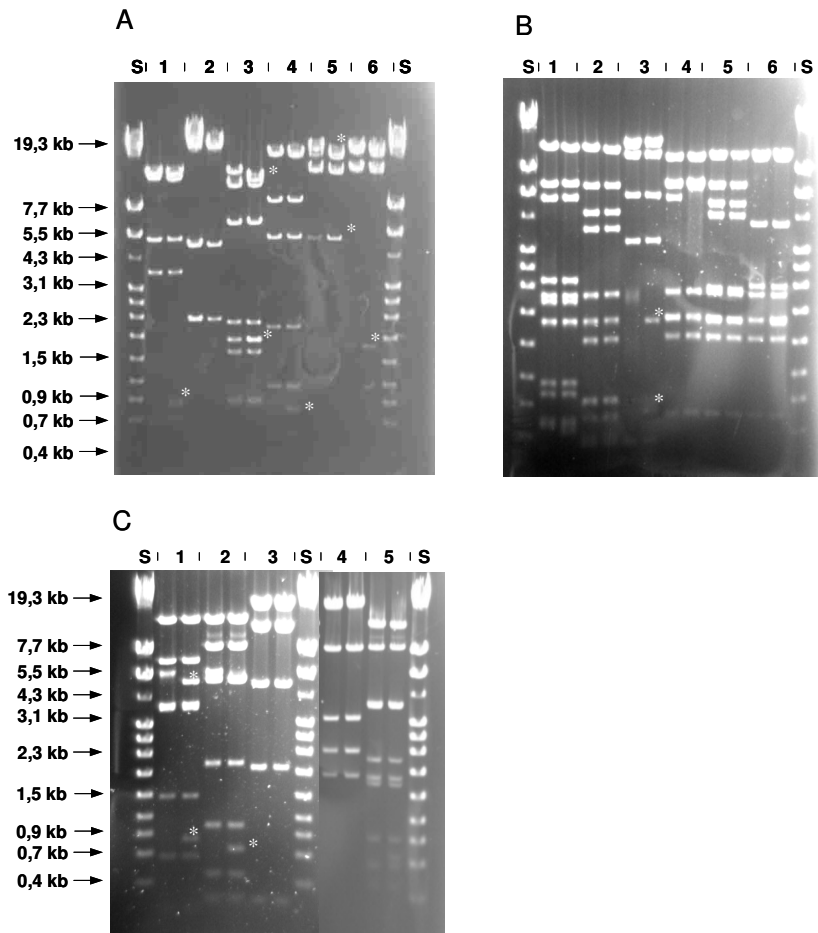


Abb. 51: Restriktionshydrolyse der P53-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen; 0,8%iges Agarosegel; S: Molecular Marker IV (Roche), 0,25 µg; je 0,2 bis 0,5 µg hydrolysierte P53-DNA pro Bande, jeweils rechte Spur mit hitzedenaturierter DNA beladen; verwendete Restriktionsenzyme **A**: 1. Avall, 2. Stul, 3. EcoRI, 4. Xbal, 5. Sall, 6. Aval; **B**: 1. EcoRI/Xbal, 2. EcoRI/Avall, 3. Aval/Avall, 4. EcoRI/Sall, 5. EcoRI/Stul, 6. EcoRI/ Aval; **C**: 1. Avall/Sall, 2: Sall/Xbal, 3: Stul/Sall; Aval, 4. Stul/Aval, 5. Xbal/Aval. Sternchen markieren DNA-Banden, die nur nach Hitzebehandlung aufgetreten sind.

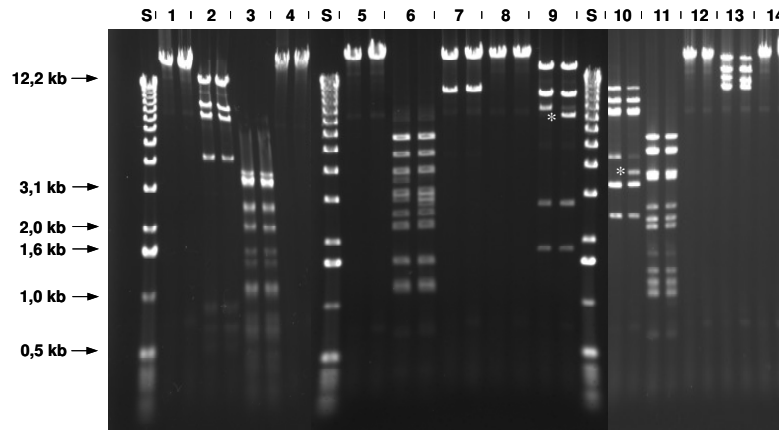


Abb. 52: Restriktionshydrolyse der a10/J9-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen; 0,8%iges Agarosegel; S: Molecular Marker X (Roche), 0,25 µg; je 0,2 bis 0,5 µg hydrolysierte a10/J9-DNA pro Bande, jeweils rechte Spur mit hitzedenaturierter DNA beladen; verwendete Restriktionsenzyme 1. HindIII, 2. EcoRI, 3. SacI, 4. XhoI, 5. AclI, 6. ApaI, 7. NotI, 8. BstXI, 9. HincII, 10. KpnI, 11. ClaI, 12. BamHI, 13. SmaI, 14. SpeI. Sternchen markieren DNA-Banden, die nur nach Hitzebehandlung aufgetreten sind.

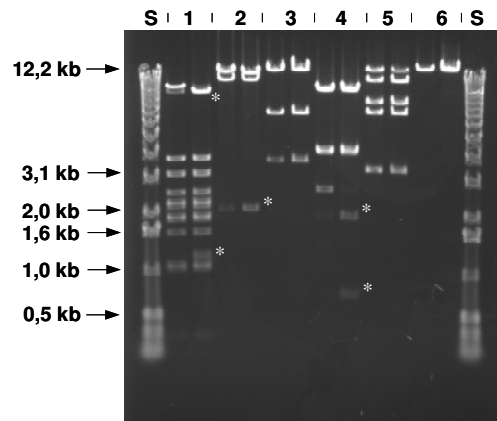


Abb. 53: Restriktionshydrolyse von PST-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen; 0,8%iges Agarosegel; S: Molecular Marker X (Roche), 0,25 µg; je 0,2 bis 0,5 µg hydrolysierte PST-DNA pro Bande, jeweils rechte Spur mit hitzedenaturierter DNA beladen; verwendete Restriktionsenzyme 1. Avall, 2. StuI, 3. EcoRI, 4. XbaI, 5. Sall, 6. Aval. Sternchen markieren DNA-Banden die nur nach Hitzebehandlung aufgetreten sind.

7.3. Beispiele für Plasmidisolierungen aus Transduktanten

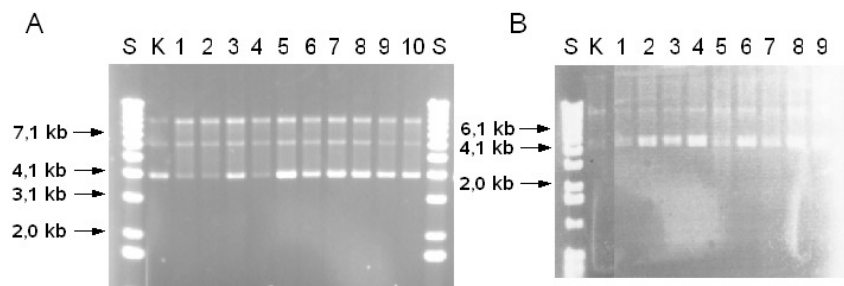


Abb. 54: Plasmide aus *S. thermophilus*-Transduktanten. P53 diente als Überträger; 0,8%ige Agarosegele; S: Molecular Marker X, 0,75 µg; **A:** K: pSHE1 aus *S. thermophilus* a10; 1-10: pSHE1 aus *S. thermophilus* a10-Transduktanten; **B:** K: pAGJ34E aus *S. thermophilus* a10; 1-9: pAGJ34E aus *S. thermophilus* A054 Transduktanten.

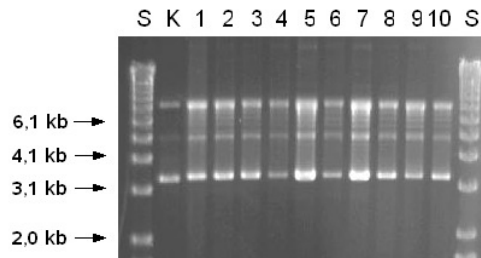


Abb. 55: Plasmide aus *S. thermophilus*-Transduktanten. P53 diente als Überträger; 0,8%ige Agarosegele; S: Molecular Marker X, 0,75 µg; **A:** K: pNcos53 aus *E. coli* EC1000; 1-10: pNcos53 aus *S. thermophilus* a10-Transduktanten.

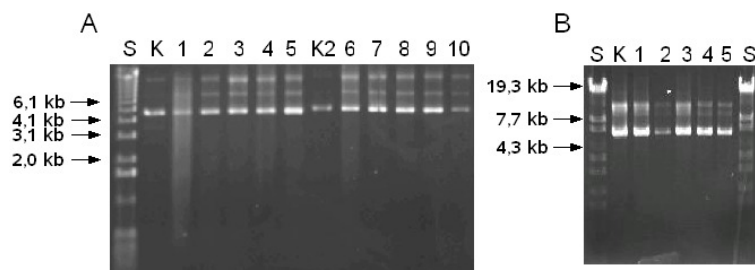


Abb. 56: Plasmide aus *S. thermophilus*-Transduktanten. P1109 diente als Überträger; 0,8%ige Agarosegele; **A:** S: Molecular Marker X, 0,75 µg; K: pAGS4E aus *S. thermophilus* a10; 2-5: pAGS4E aus *S. thermophilus* St11 Transduktanten; K2: pAGJ34E aus *S. thermophilus* a10; 6-10: pAGJ34E aus *S. thermophilus* St11 Transduktanten. **B:** S: Lambda/Styl, 0,25 µg; K: pAG106AE aus *S. thermophilus* a10; 1-5: pAG106AE aus *S. thermophilus* a10-Transduktanten.

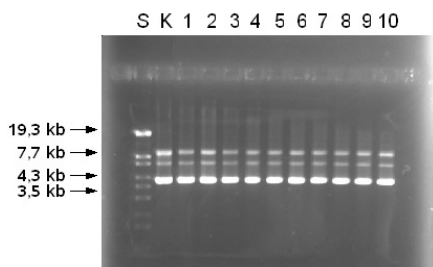


Abb. 57: Plasmide aus *S. thermophilus*-Transduktanten. a10/J9 diente als Überträger; 0,8%ige Agarosegele; S: Lambda/Styl, 0,25 µg; **A:** K: pAGS4E2 aus *E. coli* EC1000; 1-10: pAGS4E2 aus *S. thermophilus* A054 Transduktanten.

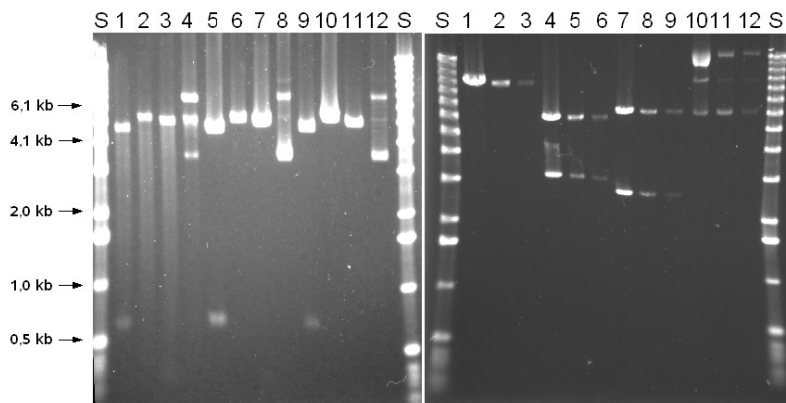


Abb. 58: Restriktionshydrolyse mit Plasmiden aus *S. thermophilus* Transduktanten. 0,8%ige Agarosegele; S: Molecular Marker X, 0,25 µg; **Links:** 1-4: pNcos53 aus *E. coli* Easypore; 5-12: Plasmide aus Transduktanten von *S. thermophilus* a10. Plasmide sind hydrolysiert mit EcoRI (1, 5, 9), HindIII (2, 6, 10), EcoRV (3, 7, 11) und nicht hydrolysiert (4, 8, 12); **Rechts:** pAG106AE aus *E. coli* Easypore (1, 4, 7, 10) und pAG106AE aus 2 *S. thermophilus* a10-Transduktanten (2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12); die Plasmide sind hydrolysiert mit NcoI (1-3), Eco47III (4-6), NruI (7-9) und nicht hydrolysiert (10-12).

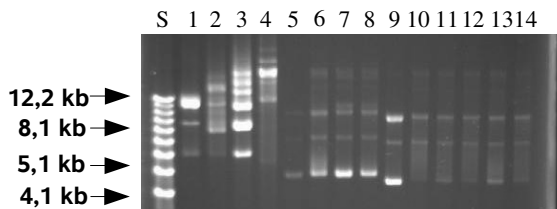


Abb. 59: DNA-Präparationen aus *L. lactis* Bu2-60. 0,8%iges Agarosegel. S. Molecular Marker X, 0,5 µg; 1: pAG106AE aus *E. coli* Easypore; 2-4: pAG106AE DNA aus Bu2-60 Transformanten; 5: pAGJ34E aus *S. thermophilus* a10; 6-8: pAGJ34E aus Bu2-60 Transduktanten; 9: pAGS4E aus *S. thermophilus* a10; 10-14: pAGS4E aus Bu2-60 Transformanten.

Anhang

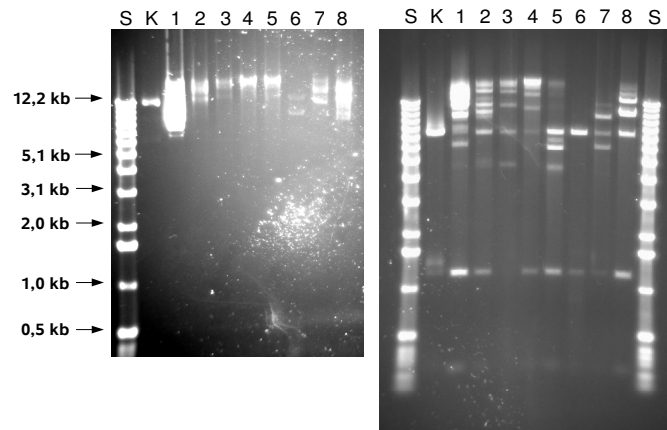


Abb. 60: DNA Präparationen von pAG106AE aus Transduktanten von Bu2-60. 0,8%iges Agarosegel. S: Molecular Marker X; **Links:** K: pAG106AE aus *E. coli* Easycore; 1-8: Plasmid-DNA aus Bu2-60 Transduktanten; **Rechts:** wie oben, DNA mit BglII hydrolysiert.

8. Literatur

- Alatossava, T., Jutte, H. und Seiler, H. 1987. Transmembrane cation movements during infection of *Lactobacillus lactis* by bacteriophage LL-H. *J.Gen.Virol.* 68 (Pt 6): 1525-1532.
- Allen, L.K., Sandine, W.E. und Elliker, P.R. 2006. Transduction in *Streptococcus lactis*. *J.Dairy Res.* 30: 351-357.
- Alonso, J.C., Luder, G. und Trautner, T.A. 1986. Requirements for the formation of plasmid-transducing particles of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *EMBO Journal* 5: 3723-3728.
- Altermann, E., Klein, J.R. und Henrich, B. 1999. Primary structure and features of the genome of the *Lactobacillus gasserii* temperate bacteriophage adh. *Gene* 236: 333-346.
- Anastasiou, R., Papadelli, M., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G. und Tsakalidou, E. 2002. Cloning and sequencing of the gene encoding X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus thermophilus* strain ACA-DC 4. *J.Appl.Microbiol.* 93: 52-59.
- Arber, W. 1960. Transduction of chromosomal genes and episomes in *Escherichia coli*. *Virology* 11: 273-288.
- Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. and von Wright, A.: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc: 1-72, 1998.
- Baldwin, K.A. und McKay, L.L. 1987. Spontaneous release of temperate phage by relysogenized lactose-positive transductants of *Streptococcus lactis* C2. *J.Dairy Sci.* 70: 2005-2012.
- Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W. und Jenni, B. 1996. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl.Environ.Microbiol.* 62: 3673-3678.
- Benbadis, L., Faelen, M., Slos, P., Fazel, A. und Mercenier, A. 1990. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt. *Biochimie* 72: 855-862.
- Benbadis, L., Garel, J.R. und Hartley, D.L. 1991. Purification, properties, and sequence specificity of SsII, a new type II restriction endonuclease from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Appl.Environ.Microbiol.* 57: 3677-3678.
- Benzinger, R. und Hartman, P.E. 1962. Effects of ultraviolet light on transducing phage P22. *Virology* 18: 614-626.
- Beresford, T.P., Ward, L.J. und Jarvis, A.W. 1993. Temporally regulated transcriptional expression of the genomes of lactococcal bacteriophages c2 and sk1. *Appl.Environ.Microbiol.* 59: 3708-3712.
- Birkeland, N.K. und Holo, H. 1993. Transduction of a plasmid carrying the cohesive end region from *Lactococcus lactis* bacteriophage Φ LC3. *Appl.Environ.Microbiol.* 59: 1966-1968.
- Bjornsti, M.A., Reilly, B.E. und Anderson, D.L. 1983. Morphogenesis of bacteriophage Φ 29 of *Bacillus subtilis*: oriented and quantized in vitro packaging of DNA protein gp3. *J.Virol.* 45: 383-396.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. und Sorokin, A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* GR-1697R.
- Bonhivers, M. und Letellier, L. 1995. Calcium controls phage T5 infection at the level of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *FEBS Lett.* 374: 169-173.
- Brabban, A.D., Hite, E. und Callaway, T.R. 2005. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne.Pathog.Dis.* 2: 287-303.
- Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol.Rev.* 31: 230-314.
- Bringel, F., Frey, L. und Hubert, J.C. 1989. Characterization, cloning, curing, and distribution in lactic acid bacteria of pLP1, a plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904 and its use in shuttle vector construction. *Plasmid* 22: 193-202.
- Brown, J.C., Ward, L.J. und Davey, G.P. 1994. Rapid isolation and purification of lactococcal bacteriophage DNA without the use of caesium chloride gradients. *Lett.Appl.Microbiol.* 18: 292-293.
- Brüssow, H. und Bruttin, A. 1995. Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. *Virology* 212: 632-640.
- Brüssow, H., Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S. und Foley, S. 1998. Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages--a review. *Virus Genes* 16: 95-109.
- Brüssow, H. und Desiere, F. 2001. Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol.Microbiol.* 39: 213-222.

- Brüssow, H., Fremont, M., Bruttin, A., Sidoti, J., Constable, A. und Fryder, V. 1994. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Appl.Environ.Microbiol.* 60: 4537-4543.
- Bruttin, A., Desiere, F., d'Amico, N., Guerin, J.P., Sidoti, J., Huni, B., Lucchini, S. und Brüssow, H. 1997a. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Appl.Environ.Microbiol.* 63: 3144-3150.
- Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S., Foley, S. und Brüssow, H. 1997b. Characterization of the lysogeny DNA module from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Φ Sfi21. *Virology* 233: 136-148.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379.
- Burrus, V., Bontemps, C., Decaris, B. und Guedon, G. 2001. Characterization of a novel type II restriction-modification system, Sth368I, encoded by the integrative element ICESt1 of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Appl.Environ.Microbiol* 67: 1522-1528.
- Catalano, C.E. 2000. The terminase enzyme from bacteriophage lambda: a DNA-packaging machine. *Cell Mol.Life Sci.* 57: 128-148.
- Chandry, P.S., Moore, S.C., Davidson, B.E. und Hillier, A.J. 1994. Analysis of the *cos* region of the *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *Gene* 138: 123-126.
- Chandry, P.S., Moore, S.C., Davidson, B.E. und Hillier, A.J. 2002. Transduction of concatemeric plasmids containing the *cos* site of *Lactococcus lactis* bacteriophage sk1. *FEMS Microbiol.Lett.* 216: 85-90.
- Charon, N.W., Campbell, A.M. und Stamm, S.C. 1980. Isolation of lambda transducing phage with the *bio* genes inserted between lambda genes P and Q. *Genetics* 95: 1-13.
- Chopin, M.C., Chopin, A. und Bidnenko, E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr.Opin.Microbiol.* 8: 473-479.
- Christiansen, B., Johnsen, M.G., Stenby, E., Vogensen, F.K. und Hammer, K. 1994. Characterization of the lactococcal temperate phage TP901-1 and its site-specific integration. *J.Bacteriol.* 176: 1069-1076.
- Clewell, D.B., Yagi, Y., Dunny, G.M. und Schultz, S.K. 1974. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J.Bacteriol.* 117: 283-289.
- Cue, D. und Feiss, M. 1993. A site required for termination of packaging of the phage lambda chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 9290-9294.
- Cue, D. und Feiss, M. 1998. Termination of packaging of the bacteriophage lambda chromosome: *cosQ* is required for nicking the bottom strand of *cosN*. *J.Mol.Biol.* 280: 11-29.
- d'Herelle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C.R.Acad.Sci.Ser.* 165: 373-
- Davies, F.L. und Gasson, M.J. 1981. Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *J.Dairy Res.* 48: 363-376.
- Deichelbohrer, I., Alonso, J.C., Luder, G. und Trautner, T.A. 1985. Plasmid transduction by *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1: effects of DNA homology between plasmid and bacteriophage. *J.Bacteriol.* 162: 1238-1243.
- Demerdash H.A., Oxmann, J., Heller, K.J. und Geis, A. 2006. Yoghurt fermentation at elevated temperatures by strains of *Streptococcus thermophilus* expressing a small heat-shock protein: application of a two-plasmid system for constructing food-grade strains of *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Journal* 1: 398-404.
- Demerdash, H.A.M., Heller, K.J. und Geis, A. 2003. Application of *shsp* gene, encoding a small heat shock protein, as a food-grade selection marker for lactic acid bacteria. *Appl.Environ.Microbiol* 69: 4408-4412.
- Desiere, F., Lucchini, S. und Brüssow, H. 1999. Comparative sequence analysis of the DNA packaging, head, and tail morphogenesis modules in the temperate *cos*-site *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Sfi21. *Virology* 260: 244-253.
- Desiere, F., McShan, W.M., van Sinderen, D., Ferretti, J.J. und Brüssow, H. 2001. Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic Streptococci: evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology* 288: 325-341.
- Dinsmore, P.K. und Klaenhammer, T.R. 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Mol.Biotechnol.* 4: 297-314.
- Dubnau, D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.Rev.* 55: 395-424.

- Dupont, K., Janzen, T., Vogensen, F.K., Josephsen, J. und Stuer-Lauridsen, B. 2004. Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5825-5832.
- Ebel-Tsipis, J., Botstein, D. und Fox, M.S. 1972a. Generalized transduction by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. I. Molecular origin of transducing DNA. *J. Mol. Biol.* 71: 433-448.
- Ebel-Tsipis, J., Fox, M.S. und Botstein, D. 1972b. Generalized transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella typhimurium*. II. Mechanism of integration of transducing DNA. *J. Mol. Biol.* 71: 449-469.
- Ely, B. und Johnson, R.C. 1977. Generalized transduction in *Caulobacter crescentus*. *Genetics* 87: 391-399.
- Emond, E., Holler, B.J., Boucher, I., Vandenberg, P.A., Vedamuthu, E.R., Kondo, J.K. und Moineau, S. 1997. Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism AbiK from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1274-1283.
- Emond, E., Lavallee, R., Drolet, G., Moineau, S. und LaPointe, G. 2001. Molecular characterization of a theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1700-1709.
- Engesser, D.M. und Hammes, W.P. 1994. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 79: 763-776.
- Fayard, B., Haeflinger, M. und Accolas, J.P. 1993. Interactions of temperate bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* with the lysogenic indicators affect phage DNA restriction patterns and host ranges. *J. Dairy Sci.* 60: 385-399.
- Feirtag, J.M. und McKay, L.L. 1987. Thermoinducible lysis of temperature-sensitive *Streptococcus cremoris* strains. *J. Dairy Sci.* 70: 1779-1784.
- Feiss, M., Adyha, S. und Court DL 1972. Isolation of plaque-forming, galactose-transducing strains of phage lambda. *Genetics* 71: 189-206.
- Feiss, M., Widner, W., Miller, G., Johnson, G. und Christiansen, S. 1983. Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site: location of the sites of terminase binding (*cosB*) and nicking (*cosN*). *Gene* 24: 207-218.
- Fuhrman, J.A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-548.
- Garvey, P., Hill, C. und Fitzgerald, G.F. 1996. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 676-679.
- Gasson, M.J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Gasson, M.J. und Davies, F.L. 1980. Conjugal transfer of the drug resistance plasmid pAMB1 in the lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 7: 51-53.
- Geis, A., El Demerdash, H.A.M. und Heller, K.J. 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid* 50: 53-69.
- Geller, B.L., Ivey, R.G., Trempey, J.E. und Hettinger-Smith, B. 1993. Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.* 175: 5510-5519.
- Geller, B.L., Ngo, H.T., Mooney, D.T., Su, P. und Dunn, N. 2005. Lactococcal 936-Species phage attachment to surface of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* 88: 900-907.
- Gorski, A., Nowaczyk, M., Weber-Dabrowska, B., Kniotek, M., Boratynski, J., Ahmed, A., Dabrowska, K., Wierzbicki, P., Switala-Jelen, K. und Opolski, A. 2003. New insights into the possible role of bacteriophages in transplantation. *Transplantation Proceedings* 35: 2372-2373.
- Grossi, G.F., Macchiato, M.F. und Gialanella, G. 1983. Circular permutation analysis of phage T4 DNA by electron microscopy. *Z. Naturforsch. [C.]* 38: 294-296.
- Guimont, C., Henry, P. und Linden, G. 1993. Restriction/modification in *Streptococcus thermophilus*: isolation and characterization of a type II restriction endonuclease Sth455I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 216-220.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204: 63-113.
- Heller, K.J. 1992. Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Arch. Microbiol.* 158: 235-248.
- Helmark, S., Hansen, M.E., Jelle, B., Sorensen, K.I. und Jensen, P.R. 2004. Transformation of *Leuconostoc carnosum* 4010 and evidence for natural competence of the organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3695-3699.
- Hershey, A.D., Goldberg, E., Burgi, E. und Ingraham, L. 1963. Local denaturation of DNA by shearing forces and by heat. *J. Mol. Biol.* 6: 230-243.

- Hill, C., Massey, I.J. und Klaenhammer, T.R. 1991. Rapid method to characterize lactococcal bacteriophage genomes. *Appl.Environ.Microbiol.* 57: 283-288.
- Hill, C., Miller, L.A. und Klaenhammer, T.R. 1990. Cloning, expression, and sequence determination of a bacteriophage fragment encoding bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *J.Bacteriol.* 172: 6419-6426.
- Hohn, B. 1983. DNA sequences necessary for packaging of bacteriophage lambda DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80: 7456-7460.
- Holo, H. und Nes, I.F. 1995. Transformation of *Lactococcus* by electroporation. *Methods Mol.Biol.* 47: 195-199.
- Hoppe, I. und Roth, J. 1974. Specialized transducing phages derived from salmonella phage P22. *Genetics* 76: 633-654.
- Huggins, A.R. und Sandine, W.E. 1977. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. *Appl.Environ.Microbiol.* 33: 184-191.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Cesselin, B., van Sinderen, D., Benbadis, L. und Chapot-Chartier, M.P. 2000. The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Appl.Environ.Microbiol.* 66: 558-565.
- Janzen, T. 1993. Plasmidreplikation bei *Streptococcus thermophilus*. Dissertation, CAU-Kiel.
- Janzen, T., Kleinschmidt, J., Neve, H. und Geis, A. 1992. Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol.Lett.* 74: 175-180.
- Jarvis, A.W. 1977. The serological differentiation of lactic streptococcal bacteriophage. *N.Z.J.Dairy Sci.Technol.* 12: 181-
- Jarvis, A.W. 1984. Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Appl.Environ.Microbiol.* 47: 343-349.
- Jarvis, A.W. 1989. Bacteriophages of lactic acid bacteria. *J.Dairy Sci.* 72: 3406-3428.
- Jarvis, A.W. und Bianchin, M.B. 1992. Isolation and characterization of two temperate phages from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* C3. *Can.J.Microbiol.* 38: 398-404.
- Jarvis, A.W., Fitzgerald, G.F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I.B., Ronda, C., Saxelin, M. und Teuber, M. 1991. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology* 32: 2-9.
- Kakita, Y., Nakashima, Y., Ono, N., Miake, F. und Watanabe, K. 1996. Effects of some calcium-related agents on the protoplast transfection of *Lactobacillus casei* with phage PL-1 DNA. *Curr.Microbiol.* 33: 359-363.
- Kalinski, A. und Black, L.W. 1986. End structure and mechanism of packaging of bacteriophage T4 DNA. *J.Virol.* 58: 951-954.
- Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T. und Kamio, Y. 1998. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* 215: 57-67.
- Kenny, J.G., McGrath, S., Fitzgerald, G.F. und van Sinderen, D. 2004. Bacteriophage Tuc2009 Encodes a Tail-Associated Cell Wall-Degrading Activity. *J. Bacteriol.* 186: 3480-3491.
- Keogh, B.P. 1973. Adsorption, latent period and burst size of phages of some strains of lactic streptococci. *J.Dairy Sci* 40: 303-309.
- Keogh, B.P. und Pettinghill, G. 1983. Adsorption of Bacteriophage eb7 on *Streptococcus cremoris* EB7. *Appl.Environ.Microbiol.* 45: 1946-1948.
- Kivi, S., Peltomäki, T., Luomala, K. und Sarimo, S.S. 1987. Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Folia Microbiol.* 32: 106-
- Klaenhammer, T.R. und Fitzgerald, G.F. Bacteriophage and bacteriophage resistance. In Gasson, M. J. and Devos, W. M.: *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Glasgow, Scotland: Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall: 106-168, 1994.
- Kleinschmidt, J., Soeding, B., Teuber, M. und Neve, H. 1993. Evaluation of horizontal and vertical gene-transfer and stability of heterologous DNA in *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt and yogurt starter cultures. *Syst.Appl.Microbiol.* 16: 287-295.
- Koo, H.S., Wu, H.M. und Crothers, D.M. 1986. DNA bending at adenine thymine tracts. *Nature* 320: 501-506.
- Kreuzer, K.N., Yap, W.Y., Menkens, A.E. und Engman, H.W. 1988. Recombination-dependent replication of plasmids during bacteriophage T4 infection. *J.Biol.Chem.* 263: 11366-11373.
- Krusch, U., Neve, H., Luschei, B. und Teuber, M. 1987. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. *Kiel Milchwirtsch.Forschungsber.* 39: 155-167.
- Labrie, S., Bart, C., Vadeboncoeur, C. und Moineau, S. 2005. Use of an alpha-galactosidase gene as a food-grade selection marker for *Streptococcus thermophilus*. *J.Dairy Sci.* 88: 2341-2347.
- Lamothe, G.V., Levesque, C., Bissonnette, F., Cochu, A., Vadeboncoeur, C., Frenette, M., Duplessis, M., Tremblay, D. und Moineau, S. 2005. Characterization of the *cro-ori* region of the

- Streptococcus thermophilus* virulent bacteriophage DT1. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1237-1246.
- Larbi, D., Colmin, C., Rouselle, L., Decaris, B. und Simonet, J.M. 1990. Genetic and biological characterization of nine *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* bacteriophages. Lait 70: 107-116.
- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., Dabrowska, M., Venema, G. und Kok, J. 1996. A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. Mol. Gen. Genet. 253: 217-224.
- Lefringhausen, A. 1996. Transduktion bei *Streptococcus thermophilus*. Dissertation, CAU-Kiel.
- Lembke, J. und Teuber, M. 1981. Serotyping of morphologically identical bacteriophages of lactic streptococci by immunoelectronmicroscopy. Milchwissenschaft 36: 10-12.
- Levin, B.R. und Bull, J.J. 1996. Phage therapy revisited: The population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. American Naturalist 147: 881-898.
- Liebeschuetz, J. und Ritchie, D.A. 1986. Phage T1-mediated transduction of a plasmid containing the T1 *pac* site. J. Mol. Biol. 192: 681-692.
- Lillehaug, D. und Lindqvist, B.H. 1991. Characterization of Φ LC3, a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* temperate bacteriophage with cohesive single-stranded DNA ends. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3206-3211.
- Lillehaug, D. 1997. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. J. Appl. Microbiol. 83: 85-90.
- Lillehaug, D. und Birkeland, N.K. 1993. Characterization of genetic elements required for site-specific integration of the temperate lactococcal bacteriophage Φ LC3 and construction of integration-negative phi Φ LC3 mutants. J. Bacteriol. 175: 1745-1755.
- Lofdahl, S., Sjostrom, J.E. und Philipson, L. 1981. Cloning of restriction fragments of DNA from staphylococcal bacteriophage Φ 11. J. Virol. 37: 795-801.
- Lu, Z., Breidt, F., Jr., Fleming, H.P., Altermann, E. und Klaenhammer, T.R. 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Φ JL-1, from a cucumber fermentation. Int. J. Food Microbiol. 84: 225-235.
- Lubbers, M.W., Ward, L.J.H., Beresford, T.P.J., Jarvis, B.D.W. und Jarvis, A.W. 1994. Sequencing and analysis of the *cos* region of the lactococcal bacteriophage c2. Mol. Gen. Genet. 245: 160-166.
- Lucchini, S., Desiere, F. und Brüssow, H. 1999a. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. J. Virol. 73: 8647-8656.
- Lucchini, S., Desiere, F. und Brüssow, H. 1999b. The genetic relationship between virulent and temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages: whole genome comparison of *cos*-site phages Sfi19 and Sfi21. Virology 260: 232-243.
- Lucey, M., Daly, C. und Fitzgerald, G.F. 1992. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid containing inhibition of bacteriophage adsorption. J. Gen. Microbiol. 138: 2137-2143.
- Lunde, M., Blatny, J.M., Lillehaug, D., Aastveit, A.H. und Nes, I.F. 2003. Use of real-time quantitative PCR for the analysis of Φ LC3 prophage stability in lactococci. Appl. Environ. Microbiol. 69: 41-48.
- Madsen, P.L. und Hammer, K. 1998. Temporal transcription of the lactococcal temperate phage TP901-1 and DNA sequence of the early promoter region. Microbiology 144: 2203-2215.
- Mahanivong, C., Boyce, J.D., Davidson, B.E. und Hillier, A.J. 2001. Sequence analysis and molecular characterization of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3564-3576.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. Molecular Cloning. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2000.
- Mann, B.A. und Slauch, J.M. 1997. Transduction of low-copy number plasmids by bacteriophage P22. Genetics 146: 447-456.
- Marciset, O. und Mollet, B. 1993. Multifactorial experimental designs for optimizing transformation: electroporation of *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Bioeng. 43: 490-496.
- Marrero, R. und Lovett, P.S. 1980. Transductional selection of cloned bacteriophage Φ 105 and SP02 deoxyribonucleic acids in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 143: 879-886.
- Marrero, R., Young, F.E. und Yasbin, R.E. 1984. Characterization of interspecific plasmid transfer mediated by *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP02. J. Bacteriol. 160: 458-461.
- Masters, M. Generalized transduction. In Neidhardt, F. C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, E.: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press: 1996.

- McGrath, S., Fitzgerald, G.F. und van Sinderen, D. 2001. Improvement and optimization of two engineered phage resistance mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 608-616.
- McGrath, S., Fitzgerald, G.F. und van Sinderen, D. 2002. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 43: 509-520.
- McGrath, S., Seegers, J.F., Fitzgerald, G.F. und van Sinderen, D. 1999. Molecular characterization of a phage-encoded resistance system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1891-1899.
- McKay, L.L. und Baldwin, K.A. 1973. Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C2 by ultraviolet irradiation. *Appl. Microbiol.* 25: 682-684.
- McKay, L.L., Baldwin, K.A. und Efstathiou, J.D. 1976. Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 45-52.
- McKay, L.L., Cords, B.R. und Baldwin, K.A. 1973. Transduction of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *J. Bacteriol.* 115: 810-815.
- McLaughlin, R.E. und Ferretti, J.J. 1995. Electrotransformation of Streptococci. *Methods Mol. Biol.* 47: 185-193.
- Meijer, W., C. Dobbelaar und Hugenholtz 2006. Thermoinducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: Implications for cheese ripening. *Int. Dairy J.* 8: 275-280.
- Meisel, J., Wolf, G. und Hammes, W.P. 1994. Heme-dependent cytochrome formation in *Lactobacillus maltaromicus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 20-23.
- Mercenier, A. 1990. Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 7: 61-77.
- Mercenier, A., Slos, P., Faelen, M. und Lecocq, J.P. 1988. Plasmid transduction in *Streptococcus thermophilus*. *Mol. Gen. Genet.* 212: 386-389.
- Merrill, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S. und Adhya, S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 3188-3192.
- Metchnikoff, E. Prolongation of life. New York: Putnam: 1908.
- Mizuno, T. 1987. Random cloning of bent DNA segments from *Escherichia coli* chromosome and primary characterization of their structures. *Nucleic Acids Res.* 15: 6827-6841.
- Moineau, S. 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 377-382.
- Moineau, S., Durmaz, E., Pandian, S. und Klaenhammer, T.R. 1993. Differentiation of two abortive mechanisms by using monoclonal antibodies directed toward lactococcal bacteriophage capsid proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 208-212.
- Moineau, S., Fortier, J., Ackermann, H.W. und Pandian, S. 1992. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Can. J. Microbiol.* 38: 875-882.
- Moineau, S., Walker, S.A., Holler, B.J., Vedamuthu, E.R. und Vandenberg, P.A. 1995. Expression of a *Lactococcus lactis* phage resistance mechanism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2461-2466.
- Monteville, M.R., Ardestani, B. und Geller, B.L. 1994. Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3204-3211.
- Moscoso, M. und Suarez, J.E. 2000. Characterization of the DNA replication module of bacteriophage A2 and use of its origin of replication as a defense against infection during milk fermentation by *Lactobacillus casei*. *Virology* 273: 101-111.
- Murialdo, H. 1991. Bacteriophage lambda DNA maturation and packaging. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 125-153.
- Muriana, P.M. und Klaenhammer, T.R. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 553-560.
- Nagaraja, V., Karnik, S. und Gopinathan, K.P. 1980. Nature of Ca²⁺ involvement in phage DNA injection. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 17: S65-S65.
- Neve, H., Freudenberg, W., Diestel-Feddersen, F., Ehlert, R. und Heller, K.J. 2003. Biology of the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage TP-J34 and physical characterization of the phage genome. *Virology* 315: 184-194.
- Neve, H., Geis, A. und Teuber, M. 1984. Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.* 157: 833-838.
- Neve, H., Krusch, U. und Teuber, M. 1989. Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yogurt and Swiss-type cheese. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 624-629.
- Neve, H., Zenz, K.I., Desiere, F., Koch, A., Heller, K.J. und Brüssow, H. 1998. Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages TP-J34 and Sfi21: implications for the modular theory of phage evolution. *Virology* 241: 61-72.

- Novick, R.P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol.Rev.* 51: 381-395.
- Novick, R.P., Edelman, I. und Lofdahl, S. 1986. Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J.Mol.Biol.* 192: 209-220.
- O'Connor, L., Tangney, M. und Fitzgerald, G.F. 1999. Expression, regulation, and mode of action of the AbiG abortive infection system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Appl.Environ.Microbiol.* 65: 330-335.
- O'Sullivan, D.J., Hill, C. und Klaenhammer, T.R. 1993. Effect of increasing the copy number of bacteriophage origins of replication, in trans, on incoming-phage proliferation. *Appl.Environ.Microbiol.* 59: 2449-2456.
- O'Sullivan, T., van Sinderen, D. und Fitzgerald, G. 1999. Structural and functional analysis of pCI65st, a 6.5 kb plasmid from *Streptococcus thermophilus* NDI-6. *Microbiology* 145 (Pt 1): 127-134.
- O'Sullivan, T.F. und Fitzgerald, G.F. 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. *J.Appl.Microbiol.* 86: 275-283.
- Oram, J.D. 1971. Isolation and properties of a phage receptor substance from the plasma membrane of *Streptococcus lactis* ML 3. *J.Gen.Virol.* 13: 59-71.
- Oram, J.D. und Reiter, B. 1968. The adsorption of phage to group N streptococci. The specificity of adsorption and the location of phage receptor substances in cell-wall and plasma-membrane fractions. *J.Gen.Virol.* 3: 103-119.
- Orbach, M.J. und Jackson, E.N. 1982. Transfer of chimeric plasmids among *Salmonella typhimurium* strains by P22 transduction. *J.Bacteriol.* 149: 985-994.
- Orla-Jensen, S. The lactic acid bacteria. Copenhagen: Anhr Fred Host and Son, 1919.
- Ostergaard, S., Brondsted, L. und Vogensen, F.K. 2001. Identification of a replication protein and repeats essential for DNA replication of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Appl.Environ.Microbiol.* 67: 774-781.
- Ottogalli, G. und Galli, A. 2006. Taxonomic relationships between *Streptococcus thermophilus* and some other streptococci. *J.Dairy Res.* 46: 127-131.
- Overcast, W.W., Nelson, F.E. und Parmelee, C.E. 1951. Influence of pH on proliferation of lactic Streptococcus bacteriophage. *J.Bacteriol.* 61: 87-95.
- Parreira, R., Ehrlich, S.D. und Chopin, M.C. 1996a. Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB. *Mol.Microbiol.* 19: 221-230.
- Parreira, R., Valyasevi, R., Lerayer, A.L., Ehrlich, S.D. und Chopin, M.C. 1996b. Gene organization and transcription of a late-expressed region of a *Lactococcus lactis* phage. *J.Bacteriol.* 178: 6158-6165.
- Petersen, A., Josephsen, J. und Johnsen, M.G. 1999. TPW22, a lactococcal temperate phage with a site-specific integrase closely related to *Streptococcus thermophilus* phage integrases. *J.Bacteriol.* 181: 7034-7042.
- Petrova, P., Miteva, V., Ruiz-Maso, J.A. und del Solar, G. 2003. Structural and functional analysis of pt38, a 2.9kb plasmid of *Streptococcus thermophilus* yogurt strain. *Plasmid* 50: 176-189.
- Platteeuw, C., Simons, G. und de Vos, W.M. 1994. Use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (gusA) gene as a reporter gene for analysing promoters in lactic acid bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* 60: 587-593.
- Prevots, F., Mata, M. und Ritzenthaler, P. 1990. Taxonomic differentiation of 101 lactococcal bacteriophages and characterization of bacteriophages with unusually large genomes. *Appl.Environ.Microbiol.* 56: 2180-2185.
- Proux, C., van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G.F., Desiere, F. und Brüssow, H. 2002. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria. *J.Bacteriol.* 184: 6026-6036.
- Pruss, G.J. und Calendar, R. 1978. Maturation of bacteriophage P2 DNA. *Virology* 86: 454-467.
- Quiberoni, A., Stiefel, J.I. und Reinheimer, J.A. 2000. Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. *J.Appl.Microbiol.* 89: 1059-1065.
- Ramsay, N. und Ritchie, D.A. 1984. Phage head assembly in bacteriophage T1. *Virology* 132: 239-249.
- Ravin, V., Sasaki, T., Räisänen, L., Riipinen, K.-A. und Alatossava, T. 2006. Effective plasmid pX3 transduction in *Lactobacillus delbrueckii* by bacteriophage LL-H. *Plasmid* 1-10.
- Raya, R.R. und Klaenhammer, T.R. 1992. High-frequency plasmid transduction by *Lactobacillus gasserii* bacteriophage adh. *Appl.Environ.Microbiol.* 58: 187-193.
- Reyrolle, J., Chopin, M.C., Letellier, F. und Novel, G. 1982. Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Appl.Environ.Microbiol.* 43: 349-356.

- Rubin, S.J. und Rosenblum, E.D. 1971. Effects of the recipient strain and ultraviolet irradiation on transduction kinetics of the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. J.Bacteriol. 108: 1192-1199.
- Sanders, M.E. Bacteriophages of industrial importance. In Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G.: Phage Ecology. NY: Wiley Interscience: 211-244, 1987.
- Sanders, M.E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. Biochimie 70: 411-422.
- Sandine, W.E., Elliker, P.R., Allen, L.K. und Brown, W.C. 1962. Genetic exchange and variability in lactic acid streptococcus starter organisms. J. Dairy Sci. 45: 1266-1271.
- Sasaki, Y., Ito, Y. und Sasaki, T. 2004. ThyA as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*. Appl.Environ.Microbiol. 70: 1858-1864.
- Schäfer, A., Geis, A., Neve, H. und Teuber, M. 1991. Bacteriophage receptors of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* F7/2 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2-1. FEMS Microbiol.Lett. 62: 69-73.
- Schmidt, C. und Schmieger, H. 1984. Selective transduction of recombinant plasmids with cloned *pac* sites by *Salmonella* phage P22. Mol.Gen.Genet. 196: 123-128.
- Schouler, C., Bouet, C., Ritzenthaler, P., Drouet, X. und Mata, M. 1992. Characterization of *Lactococcus lactis* phage antigens. Appl.Environ.Microbiol. 58: 2479-2484.
- Sechaud, L., Cluzel, P.J., Rousseau, M., Baumgartner, A. und Accolas, J.P. 1988. Bacteriophages of lactobacilli. Biochimie 70: 401-410.
- Sherman, J.M. 1937. THE STREPTOCOCCI. Bacteriol.Rev. 1: 3-97.
- Shinder, G. und Gold, M. 1988. The Nul subunit of bacteriophage lambda terminase binds to specific sites in *cos* DNA. J.Virol. 62: 387-392.
- Sijtsma, L., Sterkenburg, A. und Wouters, J.T.M. 1988. Properties of the cell walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and their relation to bacteriophage resistance. Appl.Environ.Microbiol 54: 2808-2811.
- Sijtsma, L., Wouters, J.T. und Hellingwerf, K.J. 1990. Isolation and characterization of lipoteichoic acid, a cell envelope component involved in preventing phage adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110. J.Bacteriol. 172: 7126-7130.
- Sinha, R.P. 1989. A new simple method of curing plasmids in lactic streptococci (*Streptococcus cremoris*; *Streptococcus lactis*, plasmids). FEMS Microbiol.Lett. 48: 349-352.
- Solaiman, D.K. und Somkuti, G.A. 1990. Isolation and characterization of a type II restriction endonuclease from *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiol.Lett. 55: 261-265.
- Solaiman, D.K.Y. und Somkuti, G.A. 1991. A type II restriction endonuclease of *Streptococcus thermophilus* ST117. FEMS Microbiol.Lett. 80: 75-80.
- Solow, B.T. und Somkuti, G.A. 2000. Comparison of low-molecular-weight heat stress proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. Curr.Microbiol. 41: 177-181.
- Solow, B.T. und Somkuti, G.A. 2001. Molecular properties of *Streptococcus thermophilus* plasmid pER35 encoding a restriction modification system. Current Microbiology 42: 122-128.
- Somkuti, G.A. und Steinberg, D.H. 1988. Genetic transformation of *Streptococcus thermophilus* by electroporation. Biochimie 70: 579-585.
- Stanley, E., Fitzgerald, G.F., Le Marrec, C., Fayard, B. und van Sinderen, D. 1997. Sequence analysis and characterization of Φ O1205, a temperate bacteriophage infecting *Streptococcus thermophilus* CNRZ1205. Microbiology 143 (Pt 11): 3417-3429.
- Steensma, H.Y. und Blok, J. 1979. Effect of calcium ions on the infection of *Bacillus subtilis* by bacteriophage SF 6. J.Gen.Virol. 42: 305-314.
- Sternberg, N. 1986. The production of generalized transducing phage by bacteriophage lambda. Gene 50: 69-85.
- Sternberg, N. und Coulby, J. 1987. Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (*pac*). I. Differential processing of the cleaved ends in vivo. J.Mol.Biol. 194: 453-468.
- Stiles, M.E. und Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int.J.Food Microbiol. 36: 1-29.
- Stone, R. 2002a. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. Science 298: 728-731.
- Stone, R. 2002b. Bacteriophage therapy: Food and agriculture: Testing grounds for phage therapy. Science 298: 730-730.
- Streisinger, G., Emrich, J. und Stahl, M.M. 1967. Chromosome structure in phage T4.III. Terminal redundancy and length determination. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 57: 292-295.
- Su, P., Im, H., Hsieh, H.L., Kang'a, S. und Dunn, N.W. 1999. LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. Appl.Environ.Microbiol. 65: 686-693.

- Su, P., Jury, K., Allison, G.E., Wong, W.Y., Kim, W.S., Liu, C.Q., Vancov, T. und Dunn, N.W. 2002. Cloning vectors for *Streptococcus thermophilus* derived from a native plasmid. FEMS Microbiol.Lett. 216: 43-47.
- Sun, X. 2002. Molecular and functional characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 gene (*ltp*) encoding a membrane-bound lipoprotein. Dissertation, CAU-Kiel.
- Sun, X., Göhler, A., Heller, K.J. und Neve, H. 2006. The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. Virology (in press).
- Takahashi, H. und Saito, H. 1982. Mechanism of pBR322 transduction mediated by cytosine-substituting T4 bacteriophage. Mol.Gen.Genet. 186: 497-500.
- Terzaghi, B.E. und Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl.Microbiol. 807-813.
- Tremblay, D.M. und Moineau, S. 1999. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. Virology 255: 63-76.
- Tremblay, D.M., Tegoni, M., Spinelli, S., Campanacci, V., Blangy, S., Huyghe, C., Desmyter, A., Labrie, S., Moineau, S. und Cambillau, C. 2006. Receptor-binding protein of *Lactococcus lactis* phages: identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. J.Bacteriol. 188: 2400-2410.
- Trevors, J.T. 1986. Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol.Rev. 32: 149-157.
- Twort, F.W. 1915. An investigation on the nature of the ultra-microscopic viruses. Lancet ii: 1241-1243.
- Tye, B.K., Huberman, J.A. und Botstein, D. 1974. Non-random circular permutation of phage P22 DNA. J.Mol.Biol. 85: 501-528.
- Umene, K., Shimada, K. und Takagi, Y. 1978. Packaging of ColE1 DNA having a lambda phage cohesive end site. Mol.Gen.Genet. 159: 39-45.
- Valyasevi, R., Sandine, W.E. und Geller, B.L. 1990. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. Appl.Environ.Microbiol 56: 1882-1889.
- van de, G.M., van der Vossen, J.M., Kok, J. und Venema, G. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl.Environ.Microbiol. 55: 224-228.
- van der, L.D., van der Vossen, J.M. und Venema, G. 1988. Effect of plasmid incompatibility on DNA transfer to *Streptococcus cremoris*. Appl.Environ.Microbiol. 54: 865-871.
- van Sinderen, D., Karsens, H., Kok, J., Terpstra, P., Ruiters, M.H., Venema, G. und Nauta, A. 1996. Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. Mol.Microbiol. 19: 1343-1355.
- Viret, J.F., Bravo, A. und Alonso, J.C. 1991. Recombination-dependent concatemeric plasmid replication. Microbiol.Rev. 55: 675-683.
- Viscardi, M., Capparelli, R. und Iannelli, D. 2003. Rapid selection of phage-resistant mutants in *Streptococcus thermophilus* by immunoselection and cell sorting. International Journal of Food Microbiology 89: 223-231.
- Watanabe, K. und Takesue, S. 1972. The requirement for calcium in infection with Lactobacillus phage. J.Gen.Virol. 17: 19-30.
- Watanabe, K. und Takesue, S. 1973. Energy requirement for the formation of blender-resistant complexes in *Lactobacillus* phage infection. J.Gen.Virol. 20: 319-326.
- Watanabe, K. und Takesue, S. 1975. Use of L-rhamnose to study irreversible adsorption of bacteriophage PL-1 to a strain of *Lactobacillus casei*. J.Gen.Virol. 28: 29-35.
- Watanabe, K., Takesue, S. und Ishibashi, K. 1979. Adenosine triphosphate content in *Lactobacillus casei* and the blender-resistant phage-cell complex-forming ability of cells on infection with PL-1 phage. J.Gen.Virol. 42: 27-36.
- Watt, V.M., Ingles, C.J., Urdea, M.S. und Rutter, W.J. 1985. Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 82: 4768-4772.
- Whittenbury, R. 1964. Hydrogen peroxid formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J.Gen.Microbiol. 35: 13-26.
- Wiggins, B.A. und Alexander, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. Appl.Environ.Microbiol. 49: 19-23.
- Wolf, G., Strahl, A., Meisel, J. und Hammes, W.P. 1991. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. Int.J.Food Microbiol. 12: 133-140.
- Wong, W.Y., Su, P., Allison, G.E., Liu, C.Q. und Dunn, N.W. 2003. A potential food-grade cloning vector for *Streptococcus thermophilus* that uses cadmium resistance as the selectable marker. Appl.Environ.Microbiol. 69: 5767-5771.

Literatur

Yokokura, T. 1977. Phage receptor material in *Lactobacillus casei*. J.Gen.Microbiol. 100: 139-145.