

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

**Charakterisierung der Genome verschiedener *Lactococcus* und
Leuconostoc Phagen und Entwicklung eines hochsensitiven und
molekularen Nachweisverfahrens für besonders hitzeresistente
Phagen der Gruppe 936**

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

vorgelegt von
Erik Brinks
Kiel, 2019

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

**Charakterisierung der Genome verschiedener *Lactococcus* und
Leuconostoc Phagen und Entwicklung eines hochsensitiven und
molekularen Nachweisverfahrens für besonders hitzeresistente
Phagen der Gruppe 936**

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

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Erik Brinks
Kiel, 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Knut J. Heller
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tal Dagan
Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2020

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Nuklein- und Aminosäuren erfolgen gemäß der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Weiterhin gelten die Abkürzungen der SI-Einheiten (*Le Système International d'Unités*), die nachfolgend nicht gesondert aufgeführt sind.

aa	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bp	Basenpaar(e)
CaCl ₂	Calciumchlorid
CsCl	Cäsiumchlorid
cos	kohäsive Enden (<i>cohesive site</i>)
ddH ₂ O	Reinstwasser
DEPC	Diethylidicarbonat
DMK	Deutsches Milchkontor GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double-stranded</i>)
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
HPSF	<i>high purity salt free</i>
kb	Kilobase(n)
LAMP	<i>Loop mediated isothermal amplification</i>
LB	lysogeny broth
MMC	Mitomycin C
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	messenger RNA

NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte (<i>optical density</i>)
<i>orf/ORF</i>	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>pac</i>	<i>packaging site</i>
PbE	Plaquebildende Einheiten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sp.	Spezies
spp.	Plural von sp.
ss	einzelsträngig (<i>single-stranded</i>)
<i>ssp.</i>	Subspezies/ Unterart
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T _M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
UTR	untranslatierte Region
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Nukleinbasen und Aminosäure:

Die Abkürzungen der Nuklein- und Aminosäuren erfolgen gemäß der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)

Danksagung

Mein Dank geht an erster Stelle an meinen Doktorvater Prof. Dr. Knut J. Heller für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Max-Rubner Institut in Kiel durchführen zu können. Vielen Dank für die Geduld, den stets hilfreichen Input und die ausgezeichnete Betreuung auch nach Ihrer aktiven Zeit.

Meinem Betreuer Dr. Horst Neve danke ich für sein Engagement und die gute Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Herrn PD Dr. Charles M. A. P. Franz möchte ich für die Zeit danken die er stets für seine Mitarbeiter findest. Besonders für deinen Einsatz für alle Doktoranden am MBT.

Besonders danken möchte ich Natalia Wagner, Gregor Fiedler und Sabrina Sprotte, die während unserer Doktorarbeiten zu mehr als nur Arbeitskollegen/innen geworden sind. Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen am MBT für ein sehr schönes, nahezu familiäres Arbeitsklima bedanken. Dank euch gab und gibt es selten Tage an denen ich nicht gerne zur Arbeit gegangen bin und gehe. Vielen Dank insbesondere an Angela Back, Inka Lammertz, Gesa Gehrke und Adrian Prager für die hervorragende Unterstützung im Labor.

Mein größter Dank geht an meine Familie und meine Freunde, auf die ich mich immer verlassen kann. Besonders danke ich meiner Frau Anne. Deine Geduld, insbesondere wenn ich mal etwas gestresst bin hat sehr geholfen. Schließlich danke ich von Herzen Tom, Lotta und Mathilda. Ohne euch wäre ich oft ausgeschlafener und doch gebt ihr allem einen Sinn!

Ich widme diese Arbeit meinem Papa.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft verfasst. Sie wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, den

Erik Brinks

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht.

Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C.M.A.P., Neve, H. & Heller, K. J. 2017. Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *Int J Food Microbiol*, 241, 308-317.

Brinks, E., Wagner, N., Neve, H., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Franz, C. M. A. P. & Heller, K. J. 2018. Detection of Lactococcus lactis phage P680, a heat resistant member of the 936 group of phages, by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *International Dairy Journal*, 82, 1-3.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bakteriophagen	1
1.2	Vermehrung der Bakteriophagen	2
1.3	Bakteriophagen der Milchsäurebakterien	4
1.4	Hitzeresistenz von Bakteriophagen	10
1.5	Genomsequenzierung	12
1.6	Genomstruktur von Bakteriophagen	14
1.7	Nachweis von Bakteriophagen	15
1.8	Isothermale Amplifikation: <i>Loop-mediated Isothermal Amplification</i>	17
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden.....	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Geräte und Materialien	24
3.1.2	Nährmedien	24
3.1.3	Software.....	24
3.1.4	Phagen und Bakterien	26
3.2	Mikrobiologische Methoden:.....	28
3.2.1	Kultivierung von Bakterien	28
3.2.2	Spottest.....	28
3.2.3	Plaquetest.....	29
3.2.3	Lytische Anzucht von Phagen.....	29
3.2.4	Anreicherung und Reinigung der Phagen über CsCl Gradienten	30
3.2.5	Erhitzungsversuche	31
3.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Phagen	32
3.3	Molekularbiologische Methoden:	33
3.3.1	DNA-Extraktion	33
3.3.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	33
3.3.1.2	<i>Boiling</i> -Methode	34
3.3.1.3	Chelex-100 Extraktion	34
3.3.2	DNA-Auftrennung via Agarose-Gelelektrophorese	35
3.3.3	DNA-Restriktionsverdau	35

3.3.4	Genomgrößenbestimmung durch die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	36
3.3.5	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	37
3.3.6	Southern Blot Analysen (DNA-DNA Hybridisierung)	39
3.3.7	Genomsequenzierung	39
3.4	Bioinformatische Auswertung der Sequenzen	39
3.4.1	<i>De novo</i> Assembly der Genomsequenzen	40
3.4.2	Annotation der Genomsequenzen	41
3.4.3	Alignments der Genome besonders hitzeresistenter Phagen	41
3.4.4	Erstellung von Stammbäumen	42
3.5	Entwicklung eines LAMP-Assays für Bakteriophagen der Milchsäurebakterien	44
3.5.1	Entwicklung von LAMP-Primersets	44
3.5.2	LAMP-Assay	45
3.5.3	Nachweis von positiven LAMP-Reaktionen	45
4.	Ergebnisse	47
4.1	Charakterisierung der ausgewählten Phagen:	47
4.1.1	Morphologische Analysen	47
4.1.2	Restriktionsverdau der genomischen DNA	48
4.1.3	Größenbestimmung der Phagengenome	50
4.1.4	Sequenzierung der Phagengenome	51
4.1.5	Identifizierte offene Leseraster und Genkarten:	51
4.2	<i>in-silico</i> Analysen der Mitglieder der seltenen Phagengruppen	54
4.2.1	Analyse der Genomsequenz des Phagen P596 aus der Phagengruppe P087	54
4.2.2	Analyse der Genomsequenz des Phagen P1048 aus der Phagengruppe 949	56
4.2.3	Phagen P1045 und P1046	61
4.3	<i>in silico</i> Analysen zur Hitzeresistenz der 936 Phagen	67
4.3.1	Vergleichende Sequenzanalysen	67
4.3.2	<i>in silico</i> Vergleich der Strukturproteine	74
4.3.2.1	Major capsid Protein	76
4.3.2.2	Tape measure protein	78
4.3.2.3	Rezeptorbindeprotein	80

4.3.2.4 Portal Protein	83
4.3.3 Analyse des Portal Protein clusters der hitzeresistenten Phagen	86
4.3.4 Erhitzungsversuche	89
4.3.4.1 Morphologische Untersuchungen nach Hitzeinaktivierung	89
4.3.4.2 Vergleich der Mutanten des hitzesensitiven Phagen P008.....	93
4.4 Molekularer Phagennachweises basierend auf der LAMP-Methode	94
4.4.1 Etablierung der LAMP-Methode anhand des Phagen P680	95
4.4.2 Visuelle Auswertung positiver LAMP-Reaktion für den Phagen P680	96
4.4.3 Untersuchungen zur Nachweisgrenze der LAMP-Methode	98
4.4.4 Validierung der LAMP-Methode für den Phagen P680 in Sauermolke	100
4.4.5 Ergebnisse des LAMP-Primersets für die hitzeresistenten Phagen	101
4.5 PCR Nachweis für <i>Leuconostoc</i> spp. Phagen.....	106
5. Diskussion	108
5.1 Phagenmorphologie und Vorbereitung für die Sequenzierung	108
5.2 Sequenzanalysen.....	109
5.2.1 Genetische Charakterisierung seltener <i>Lactococcus lactis</i> Phagen.....	110
5.2.1.1 Die seltenen <i>L. lactis</i> Phagengruppen P087 und 949.....	110
5.2.1.2 Zwei Phagen freigesetzt aus einem Wirt (P1045 und P1046)	112
5.2.2 Hitzeresistenz der 936 Phagengruppe.....	115
5.3 LAMP-Nachweis	123
5.4 Optimierung des PCR Nachweises für <i>Leuonostoc</i> spp. Phagen.....	128
6. Zusammenfassung.....	130
7. Summary	132
8. Anhang	134
Literaturverzeichnis	152

1 Einleitung

1.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen (Phagen) stellen eine Gruppe von Viren dar, die spezifisch Bakterien und Archaeen infizieren können, sich in ihnen vervielfältigen und sie anschließend – in den meisten Fällen – zerstören. Entdeckt wurden Phagen unabhängig voneinander 1915 von dem Engländer William Twort (Twort, 1915) und 1917 von dem Kanadier Felix Hubert d'Herelle (d'Herelle, 2007). Beide beobachteten, nach Zugabe eines bestimmten Agens, klare Plaques (runde klare Zonen) auf einem Bakterienrasen (Staphylokokken bei Twort und Shigellen bei d'Herelle), und dies sogar nachdem das Agens bakteriensicher filtriert worden war. d'Herelle prägte den Begriff der „Bakteriophagen“ („phagos“ = „Fresser“, also Bakterienfresser), er postulierte zudem, dass es sich bei Phagen um Viren handelt, welche sich innerhalb einer Bakterienzelle vermehren. Dies wurde zum damaligen Zeitpunkt von vielen Wissenschaftlern angezweifelt, für die es sich bei Phagen um Enzyme oder „transmissible autolysis agents“ handelte.

Heute ist bekannt, dass Phagen ubiquitär in der Umwelt vorkommen und mit bis zu 10^{31} Phagenpartikeln die weltweit häufigste „biologische Einheit“ darstellen (Heller *et al.*, 2011). Auch ist mittlerweile d'Herelle's These, bei Bakteriophagen handele es sich um Viren, lange bestätigt. Es benötigte zur endgültigen Klärung allerdings die Entwicklung des Elektronenmikroskops. Die ersten Aufnahmen von infizierenden Phagen, bzw. von Phagen, die durch Lyse des Wirtes freigesetzt wurden, beendeten die Debatte um die Natur der Phagen (Ackermann, 2012).

Phagen sind demnach obligat intrazelluläre Parasiten, die über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen und die für ihre Vermehrung vom Stoffwechselapparat ihres Wirtes abhängig sind. Im Wesentlichen bestehen Phagen aus einem Nukleinsäuremolekül und einer, aus sogenannten Kapsomeren, bestehenden Proteinhülle, dem Kapsid. Die Art der Nukleinsäure der Phagen variiert, es gibt Phagen mit DNA oder mit RNA. Diese kann sowohl als einzelsträngiges (ss) als auch als doppelsträngiges (ds) Nukleinsäuremolekül vorliegen. Das Kapsid umschließt die Nukleinsäure, und bei vielen Phagen schließt sich an das Kapsid ein Proteinschwanz an. Anhand ihrer Morphologie werden Phagen seit 1967 eingeteilt (Bradley, 1967), zudem wird bei der Einteilung die Art der Nukleinsäure

berücksichtigt. Die Einteilung in geschwänzte Phagen mit doppelsträngiger (ds) DNA (Abb. 1 Typ A-C), polyedrische Phagen mit einzelsträngiger (ss) DNA (Abb. 1, Typ D) bzw. mit einzelsträngiger RNA (Abb. 1, Typ E) und filamentöse Phagen mit einzelsträngiger DNA (Abb. 1, Typ F) durch Bradley wurden 1974 von Ackermann um den pleomorphen Phagentyp erweitert (Abb. 1, Typ G). Darüber hinaus wurden die geschwänzten Phagen anhand ihrer Kopfform in isodiametrisch (Abb. 1, Typ A1 - C1), prolat (Typ A2 – C2) und lang-prolat (Typ A3 - C3) aufgeteilt (Ackermann und Eisenstark, 1974). 96 % der bekannten Phagen besitzen am Kapsid einen Kragen, an dem sich ein Proteinschwanz anschließt, diese geschwänzten Phagen bilden die Ordnung *Caudovirales* (Ackermann,

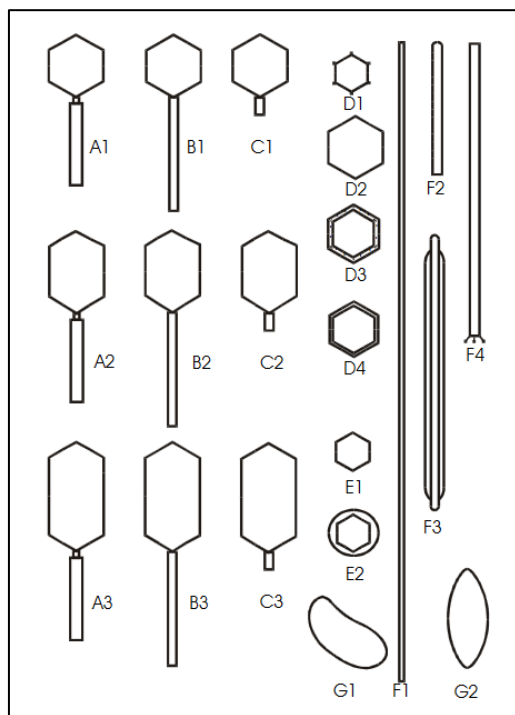


Abbildung 1 Einteilung der Phagen in die Morphotypen A –G nach Ackermann (2001).

2001). Innerhalb dieser Ordnung bilden die *Siphoviridae*, mit 61 %, die größte Familie (Mahony *et al.*, 2012a). Diese Phagen haben einen langen, flexiblen, nicht kontraktilen Schwanz. Ebenfalls zur Ordnung der *Caudovirales* gehören Vertreter der *Myoviridae* mit einem langen, kontraktilen Schwanz und Vertreter der *Podoviridae* mit einem kurzen nicht-kontraktilen Schwanz. Alle bekannten Vertreter der *Caudovirales* verfügen über ds DNA als Nukleinsäure.

1.2 Vermehrung der Bakteriophagen

Als obligat intrazelluläre Parasiten sind Phagen auf den Replikationsapparat ihrer Wirte angewiesen, um sich selbst zu vermehren. Grundsätzlich lassen sich Phagen in zwei unterschiedliche Typen unterteilen: virulente Phagen, deren Vermehrung ausschließlich über den lytischen Zyklus geschieht und temperente Phagen, die neben dem lytischen Zyklus in der Lage sind, sich über den lysogenen Zyklus zu vermehren. Neben diesen hauptsächlich auftretenden Vermehrungswegen sind noch die Pseudolysogenie (Łoś und

Węgrzyn, 2012) und die Vermehrung filamentöser Phagen zu nennen (Martinez *et al.*, 2016).

Bei allen Phagen muss zunächst das genetische Material in die Wirtszelle übertragen werden. Dafür muss der Phage in einem ersten Schritt zu einer passenden Wirtszelle gelangen. Da die Phagen selbst unbeweglich sind und nur passiv mit dem sie umgebenden Medium und innerhalb diesem durch Diffusion in ihrer Umgebung verteilt werden (Brownsche Molekularbewegung), treffen sie auch nur zufällig auf ihre Wirtszellen. Um zu verhindern, dass ein Phage an einer falschen Zelle adsorbiert, verfügt jeder Phage über Rezeptorbindeproteine (RBP), die an einen spezifischen Rezeptor auf der Wirtszelle nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip binden können. So wird eine hohe Wirtsspezifität gewährleistet, die für den Phagen essentiell ist. Eine Infektion eines fremden Bakterienstamms würde - durch die Unmöglichkeit des Phagen, sich in diesem Bakterium zu vermehren - zur Inaktivierung des Phagen führen (Heller *et al.*, 2011).

Erkennt ein Phage den Rezeptor (häufig sind dies Zuckerreste der bakteriellen Zellwand (Fox, 2004)) einer Bakterienzelle, kommt es in einem ersten Schritt zu einer meist reversiblen Bindung an dem Rezeptor. Bei den Milchsäurebakterien findet die Bindung am Rezeptor hauptsächlich durch die Interaktion des RBP am Ende des Phagenschwanzes mit den entsprechenden Rezeptoren auf der bakteriellen Zellwand statt. In einem zweiten Schritt kommt es dann zu der irreversiblen Bindung an einen zweiten Rezeptor (Adsorption), dies scheint durch die Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen positiv beeinflusst zu werden (Geller *et al.*, 2005). Darüber hinaus spielen Bestandteile der Basisplatte bei Phagen der Milchsäurebakterien eine wichtige Rolle. Diese irreversible Bindung führt zu Konformationsänderungen bestimmter Schwanzproteine, die an der Penetration der Wirtszelle beteiligt sind (Heller *et al.*, 2011, Mahony *et al.*, 2013a). Zudem können Enzyme bei der Penetration der Zellwand eine Rolle spielen (Kenny *et al.*, 2004, Farley *et al.*, 2017).

Ist die Phagen-DNA in die Bakterienzelle gelangt, kann nun entweder der lytische oder der lysogene Zyklus beginnen. Der lytische Zyklus beginnt unmittelbar mit dem Einschleusen der DNA in die Wirtszelle.

Für einige Phagen der *Caudovirales* ist dies gut beschrieben, z.B. für die *Escherichia coli* T-Phagen als lytische Phagen und den temperenten Phagen Lambda.

Der *Escherichia coli* T5 Phage ist ein gut untersuchtes Beispiel für einen *Siphoviridae* Phagen, denen auch die, für Milchsäurebakterien besonders bedeutsame *Lactococcus lactis* Phagengruppe 936 angehört (Abb. 2, Kap. 1.3).

Beim *E. coli* T5 Phagen gelangen nach Durchdringen der Wirtszellwand vorerst nur etwa 8 % der DNA des Phagen in die Wirtszelle (Heller *et al.*, 2011). Von dieser „*first step transfer*“ DNA werden vor allem die sehr frühen („*pre-early*“) Gene abgelesen, die unter anderem ein Zurückgleiten der DNA verhindern. Im „*second step transfer*“ gelangt schließlich das gesamte Genom des Phagen in die Wirtszelle, wo zunächst die frühen Gene durch die wirtseigene Polymerase transkribiert werden. Diese codieren vor allem Enzyme, die für die Replikation des Phagen notwendig sind, darunter auch eine vom Phagen codierte Polymerase. Die phageneigene Polymerase transkribiert dann die späten Gene, die die Strukturproteine der neuen Phagenpartikel codieren. Kapsid und Phagenschwanz werden getrennt voneinander assembliert. Die neue Phagen-DNA wird dann in die Kapside gepackt und anschließend werden der Phagenschwanz und das Kapsid zusammengefügt (Madigan *et al.*, 2006, Heller *et al.*, 2011).

An der Freisetzung der neuen Phagenpartikel sind insbesondere zwei Proteine beteiligt - ein Holin und ein Endolysin. Die Holin Proteine bilden Poren in der Membran, durch die die Endolysine zur Peptidoglykanschicht gelangen und diese abbauen. Dies führt wiederum zur Lyse der Zelle und der Freisetzung der neuen Phagenpartikel (Wang *et al.*, 2000, Heller *et al.*, 2011).

1.3 Bakteriophagen der Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien werden heute in der Industrie gezielt zur Fermentation von Milchprodukten wie Joghurt und Käse eingesetzt. Die Fermentation von Milch hat jedoch eine lange Tradition: Bereits seit Tausenden von Jahren werden Käse und Joghurt hergestellt, allerdings ohne dass die mikrobiellen Grundlagen für die Umwandlung der Milch in diese Produkte bekannt waren. Erst im Jahr 1857 konnte durch Pasteur gezeigt werden, dass die Milchsäuregärung durch Bakterien stattfindet. Nachdem es 1857 erstmals gelang, eine Reinkultur für *Lactococcus lactis* Stammes zu isolieren, wurden 1890 die ersten Kulturen für die gezielte Milchfermentation produziert (Heller, 2006). Die Milchsäurebakterien sind durch die Produktion von Laktat (Milchsäure) aus Laktose für

die Gerinnung von Casein (Milchprotein) und damit für die Dicklegung der Milch verantwortlich. Dies geht mit einer Absenkung des pH-Werts einher, was zudem zum Schutz vor Verderbniserregern beiträgt und vor der Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen schützt.

Die heutige Bedeutung von Milch und Milchprodukten wird ersichtlich, wenn man den pro Kopf Konsum alleine für Deutschland betrachtet: Dieser lag 2018 bei ca. 128 kg Milch und Milchprodukten (BLE, Bericht zur Markt und Versorgungslage mit Milch und Milcherzeugnissen, 2018).

In der Industrie werden verschiedene Kombinationen von Milchsäurebakterien als Starterkulturen zur gezielten Fermentation von Milch eingesetzt. Je nach Zusammensetzung beeinflussen diese Starterkulturen die Struktur, den Geschmack und das Aroma des jeweiligen Produkts (Daly *et al.*, 1996).

Milchsäurebakterien sind nicht-sporulierende Stäbchen und Kokken und gehören zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem mol% GC-Gehalt (Grote und Antranikian, 2006, Madigan *et al.*, 2006). Alle Milchsäurebakterien wachsen anaerob, sind jedoch aerotolerant (Madigan *et al.*, 2006). Zudem sind sie Katalase-negativ und säuretolerant und bilden die morphologische und taxonomisch heterogene Ordnung *Lactobacillales*.

Neben den als Starterkulturen eingesetzten, und damit für den Mensch als positiv anzusehenden Milchsäurebakterien, gibt es unter ihnen humanpathogene der Gattung *Streptococcus* (*Streptococcus pneumoniae* oder *Streptococcus pyogenes*) und zudem auch Verderbniserreger von Fleischprodukten, Wein und Bier (Björkroth und Holzapfel, 2006, Hammes und Hertel, 2006, Tuomanen, 2006, Pothakos *et al.*, 2015).

Am bedeutsamsten sind im Bereich der Käseherstellung *Lactococcus* (*L.*) *lactis* Stämme mit den beiden Subspezies *L. lactis* ssp. *lactis* und *L. lactis* ssp. *cremoris*, welche in vielen mesophilen Starterkulturen zu finden sind. Sie sind für die Säuerung von Milch und die damit verbundene Dicklegung verantwortlich, aber auch für die Geschmacks- und Aromabildung. Zudem hemmt die Absenkung des pH-Wertes während der Säuerung das Wachstum unerwünschter Bakterien, was zu einer längeren Haltbarkeit der fermentierten Produkte führt.

Ebenfalls weit verbreitet ist der Einsatz von *Leuconostoc* (*Ln.*) spp. Stämmen als Bestandteil von Starterkulturen, diese machen mengenmäßig aber nur einen kleinen Anteil (< 10 %) aus (Cogan und Jordan, 1994). Während *L. lactis* Stämme

hauptverantwortlich für die Ansäuerung der Milch sind, sind die *Leuconostoc* Bakterien wichtige Aromabildner. Sie verstoffwechseln zusammen mit *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* Citrat, wobei unter anderem Diacetyl gebildet wird, welches eine wichtige Aromakomponente darstellt.

Neben *Ln.* spp. und *L. lactis* Stämmen werden weitere Bakterien in der industriellen Fermentation eingesetzt. Wichtige Starterkulturen für die Industrie sind *Streptococcus* (*S.*) *thermophilus* und *Lactobacillus* spp. Kulturen.

Bakteriophagen, die in der Lage sind, die oben beschriebenen Starterkulturen zu infizieren, stellen ein ernstes Problem für milchverarbeitende Betriebe dar. Sie gehören daher auch zu den am intensivsten untersuchten Bakteriophagen (Mahony und van Sinderen, 2014). Am besten untersucht sind die Phagen der *L. lactis* Kulturen. Sie stellen eine morphologisch und genetisch heterogene Gruppe dar. Es sind sowohl Phagen der *Siphoviridae* als auch der *Podoviridae* vertreten (Deveau *et al.*, 2006). Insgesamt werden die *L. lactis* Phagen zurzeit in 10 Phagengruppen eingeteilt (Abb. 2). Die Mehrzahl der *L. lactis* Phagen ist strikt virulent, die einzige Ausnahme bilden die Phagen der P335 Phagengruppe, diese beinhaltet sowohl virulente als auch temperente Phagen. Die in der milchverarbeitenden Industrie am häufigsten vorkommenden Phagen gehören der Gruppe 936 (Abb. 1, Typ B1, Abb. 2) an. Ebenfalls regelmäßig werden Vertreter der Gruppen c2 (Typ B2) und P335 (Typ B1) isoliert (Madera *et al.*, 2004, Atamer *et al.*, 2009a).

In Abb. 3 ist der Verwandtschaftsgrad der *L. lactis* Phagen dargestellt. Das gesamte Proteom der 10 beschriebenen Phagengruppen ist hier phylogenetisch miteinander verglichen. Die genetische Heterogenität zwischen den Phagengruppen wird anhand dieser phylogenetischen Analyse deutlich (Mahony *et al.*, 2013b).

Die 936 Gruppe stellt nach dieser Analyse eine in sich homogene Gruppe dar (rot markiert in Abb. 3), in der es zwar unterschiedliche Cluster gibt, diese jedoch alle nah miteinander verwandt sind. Zudem stellt diese Gruppe den größten Cluster im Stammbaum dar. Bereits zu Beginn dieser Arbeit (2013) waren über 30 Genome der 936 Phagengruppe publiziert. Da es sich um die am häufigsten gefundene Phagengruppe in den milchverarbeitenden Betrieben handelt, wächst auch die Anzahl der Isolate und der publizierten Genomsequenzen am stärksten. Diese lag bereits im Jahr 2013 bei über 50 sequenzierten Phagengenomen, welche von Mahony *et al.* 2013 in einem großen

Stammbaum verglichen wurden (Abb. 4). Inzwischen ist die Anzahl bereits auf über 100 publizierte Genome der 936 Phagengruppe gestiegen.

Die c2 Gruppe (hellgrün, Abb.3) zeigt bei den beiden in die Untersuchung einbezogenen Phagen ebenfalls ein enges Verwandtschaftsverhältnis, während das Verwandtschaftsverhältnis der P335 Gruppe sehr heterogen ist. Es sind, wie bereits in Abb. 2 anhand der Morphologie zu erkennen, vier voneinander abweichende Gruppen zu erkennen.

Dies bestätigt auch der Stammbaum in Abb. 3. Die vier bekannten Untergruppen (in grün, orange, lila und blau dargestellt) liegen in deutlich voneinander differenzierten Clustern.

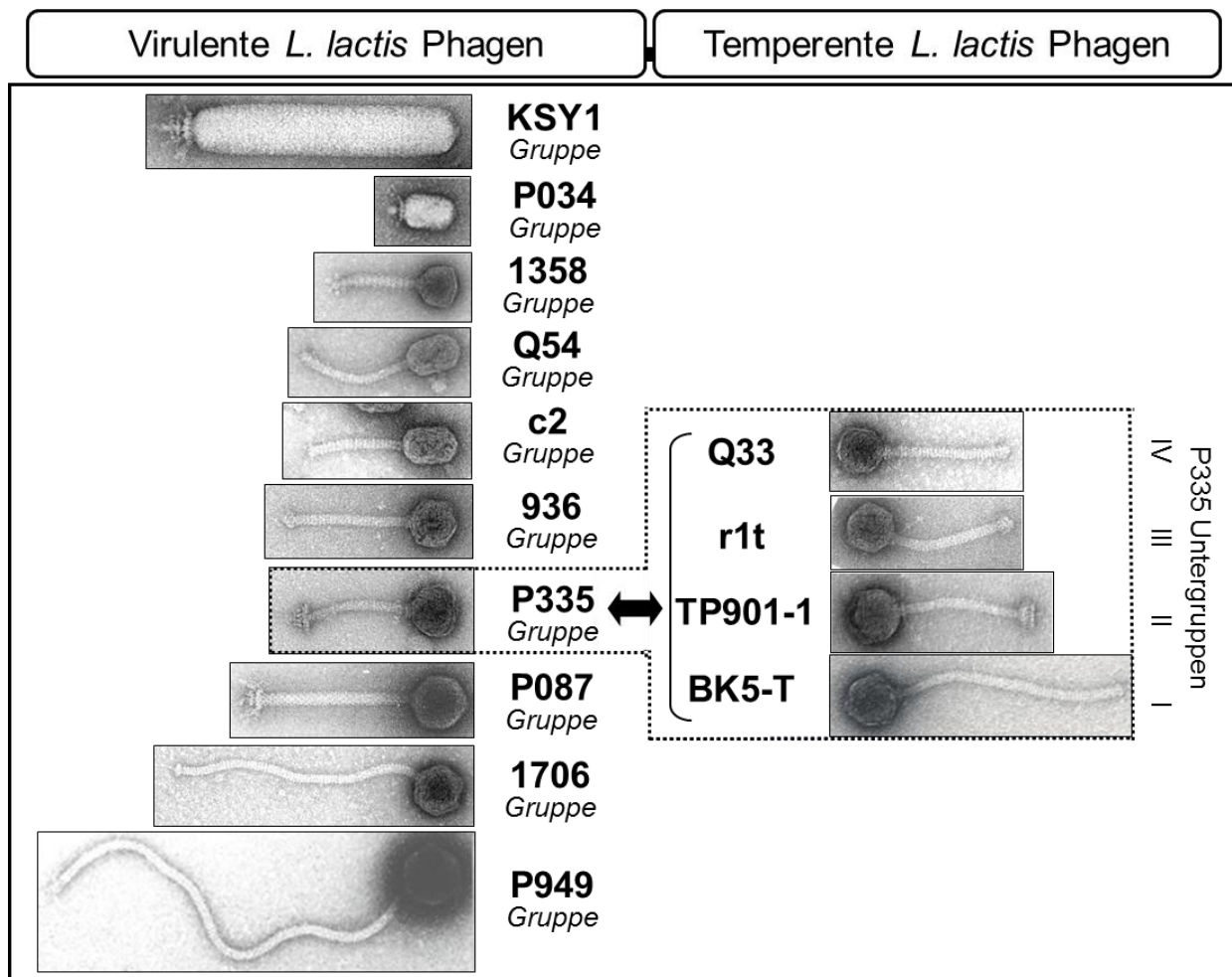


Abbildung 2 Klassifizierung der *L. lactis* Phagen (nach Atamer et al., 2012).

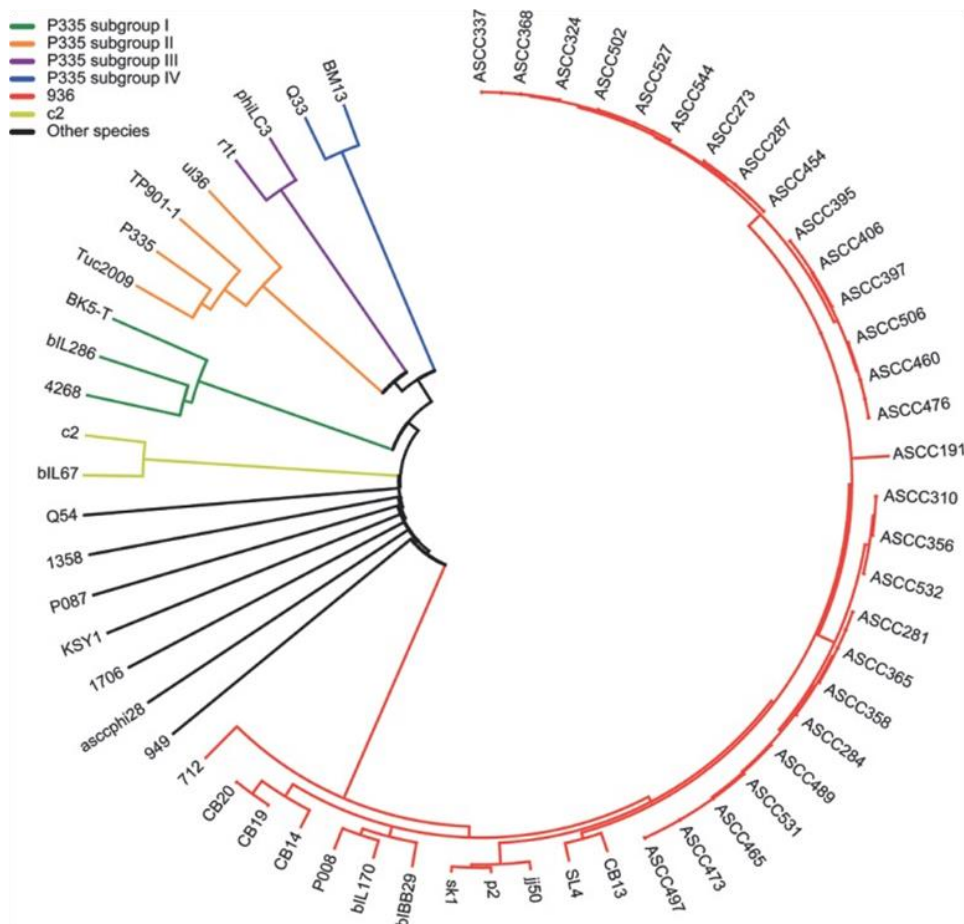


Abbildung 3 Vergleich des gesamten *in silico* Proteoms der *L. lactis* Phagen mit der Neighbour-Joining Methode (Mahony *et al.*, 2013b).

Weiterhin stellen die in Abb. 3 als „Other species“ dargestellten Phagengruppen (schwarz markiert) Vertreter der übrigen Phagengruppen aus Abb. 2 dar (KSY1, P034, 1358, Q54, P087, 1706, P949). Von diesen werden nur selten Phagen isoliert und demnach ist auch ihr Einfluss im Bereich der Störung von Fermentationsprozessen begrenzt. Kürzlich wurden jedoch für seltene Phagengruppen neue Phagen beschrieben und sequenziert. So konnten für die Phagengruppe 949, die die größten bekannten Laktokokken Phagen darstellen, in kurzer Zeit drei neue Vertreter beschrieben und sequenziert werden (Cavanagh *et al.*, 2014, Mahony *et al.*, 2015). Vor diesen Arbeiten war nur das Genom des Typphagen 949 bekannt (Samson und Moineau, 2010).

Phagen anderer Milchsäurebakterien (z.B. *Leuconostoc* Kulturen) wurden in der Vergangenheit weniger untersucht, obwohl *Leuconostoc*-Kulturen in Molkereien weit verbreitet sind und einen erheblichen Einfluss auf die Produktqualität haben (Cogan und Jordan, 1994).

Dies lag bei den *Leuconostoc*-Kulturen auch daran, dass eine Infektion nicht zwingend unmittelbar erkannt wird. Während *Lactococcus*-Kulturen für die Säuerung und damit direkt oder indirekt auch für die Dicklegung verantwortlich sind und eine Phageninfektion direkt zu einer Verzögerung bzw. sogar zum Ausfall der Säuerung bzw. Dicklegung führt, sind die Folgen einer Phageninfektion der Aromabildner oftmals erst später, anhand von sensorischen Fehlern, zu erkennen.

In jüngster Zeit wurden jedoch auch diese Phagen weiter untersucht und 2013 erstmals morphologisch eingeteilt (Ali *et al.*, 2013). Kurz danach erfolgte die genomische Analyse dieser Phagen der *Leuconostoc* Kulturen (Kot *et al.*, 2014a). In Abb. 4 ist zu erkennen, dass durch diese Arbeiten auch die ersten *Leuconostoc* spp. Phagen überhaupt sequenziert wurden. Bei allen bisher untersuchten Phagen handelt es sich demnach um *Siphoviridae* Phagen mit nicht kontraktile Schwänzen von ca. 140 nm Länge. Unterschieden werden konnten sie anhand der Struktur ihrer Basisplatten (Ali *et al.*, 2013, Kot *et al.*, 2014b). Innerhalb dieser recht homogenen Phagen der *Leuconostoc* Kulturen finden sich sowohl virulente als auch wenige temperente Phagen (Kot *et al.*, 2014b).

Host	Phage family	Phage species	No. of fully sequenced members	Taxonomy reference(s)	
<i>L. lactis</i>	<i>Siphoviridae</i>	936	51	Deveau et al., 2006	
		P335	15	Deveau et al., 2006	
		c2	2	Deveau et al., 2006	
		1358	1	Deveau et al., 2006	
		Q54	1	Deveau et al., 2006	
		P087	1	Deveau et al., 2006	
		1706	1	Deveau et al., 2006	
		949	2	Deveau et al., 2006	
		<i>Podoviridae</i>	P034	1	Deveau et al., 2006
			KSY1	1	Deveau et al., 2006
<i>S. thermophilus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>cos</i>	6	Le Marrec et al., 1997	
		<i>pac</i>	6	Le Marrec et al., 1997	
		5093-like	1	Mills et al., 2011	
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Siphoviridae</i>	Group Ia and b	2	Ali et al., 2013	
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	<i>Siphoviridae</i>	Group IIa–d	2	Ali et al., 2013	
<i>Lb. brevis</i>	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Deasy et al., 2011; Jang et al., 2011	
<i>Lb. casei</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	6	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	2	Yoon and Chang, 2011; Zhang et al., 2011	
<i>Lb. gasseri</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Zago et al., 2013	
<i>Lb. paracasei</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	2	Villion and Moineau, 2009	
	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Alemayehu et al., 2009	
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	5	Villion and Moineau, 2009	
	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Ehrmann et al., 2013	

Abbildung 4 Stand der Taxonomie der Milchsäurebakterien im Jahr 2014 (Mahony und van Sinderen, 2014).

1.4 Hitzeresistenz von Bakteriophagen

Als besonders kritisch sind die Phagen anzusehen, die nicht durch standardmäßige Verfahren wie die Kurzzeit-Pasteurisation (72 °C für 15 Sekunden (Bylund, 2003)) inaktiviert werden. Gelangen diese in Fermentationsprozesse, sind sie ohne hohen Aufwand kaum zu beseitigen. So gibt es eine Vielzahl an Studien, die sich mit der thermischen Inaktivierung von Phagen, die in der Lage sind

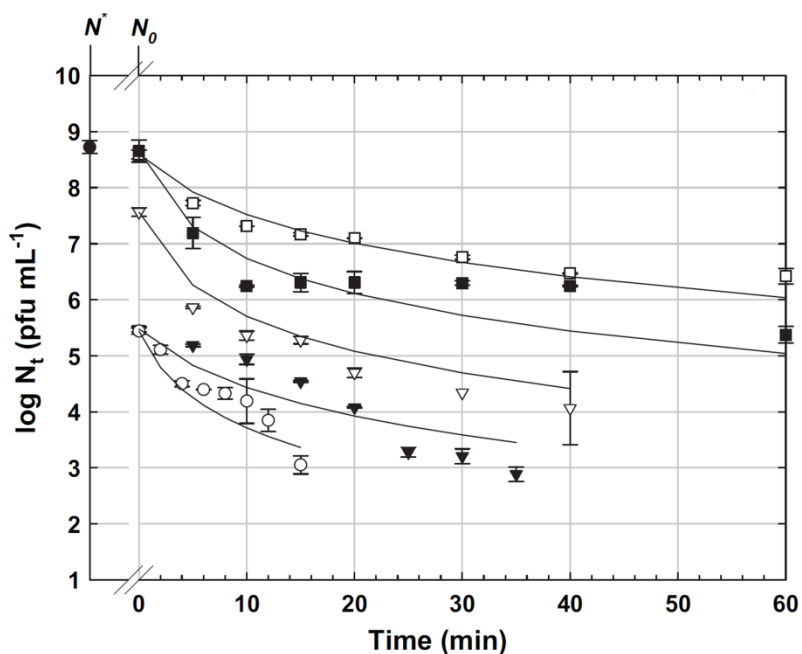


Abbildung 5 Inaktivierung des Phagen P680 in Molke bei 70 °C (□), 75 °C (■), 80 °C (▽), 85 °C (▼) und 90 °C (○) (Atamer und Hinrichs, 2010).

Starterkulturen zu infizieren, beschäftigen (Atamer *et al.*, 2009a, Atamer *et al.*, 2011, Marvig *et al.*, 2011). Für die untersuchten Phagen wurden Inaktivierungskinetiken erstellt (Abb. 5 zeigt dies am Beispiel des Phagen P680), die die Reduktion eines Phagen bei einer bestimmten Temperatur aufgetragen gegenüber der Zeit zeigen. Dazu werden Phagen mit einem definierten Ausgangstiter erhitzt. In Abb. 5 ist dies für den hitzeresistenten Phagen P680 dargestellt. Dieser wird selbst bei einer Erhitzung bei 90 °C für fünf Minuten erst um ca. eine log-Stufe und damit um etwa 90 % inaktiviert.

In Abb. 6 sind Linien gleichen Effekts für den hitzeresistenten Phagen P680 dargestellt. Als Referenz für einen nicht hitzeresistenten Phagen dient der hitzesensitive Phage P008. Zu sehen ist eine Temperatur-Zeit Kurve einer 9 log-Stufen Reduktion bei den dargestellten Phagen. Die Kennlinie zeigt die mögliche Temperatur-Zeit Kombinationen, die eine angestrebte 9 log-Stufen Reduktion ermöglicht. Deutlich wird, dass selbst für den hitzesensitiven Phagen P008 die Kurzzeit-Pasteurisation für eine 9 log-Stufen Reduktion (Abb. 6, HTST) nicht ausreichend ist. Eine 9 log-Stufen Inaktivierung des Phagen P680 würde sogar mit einer nahezu vollständigen Denaturierung des Molkenproteins (MP) einhergehen.

Wie der hier dargestellte Phage P680 sind alle bisher beschriebenen besonders hitzeresistenten Phagen der *L. lactis* Phagengruppe 936 zuzuordnen (vor allem die Phagen P680, P1532, P4565, P656 (Atamer *et al.*, 2009a)).

Die Problematik der hitzeresistenten Phagen wird dadurch verstärkt, dass die Matrix Milch

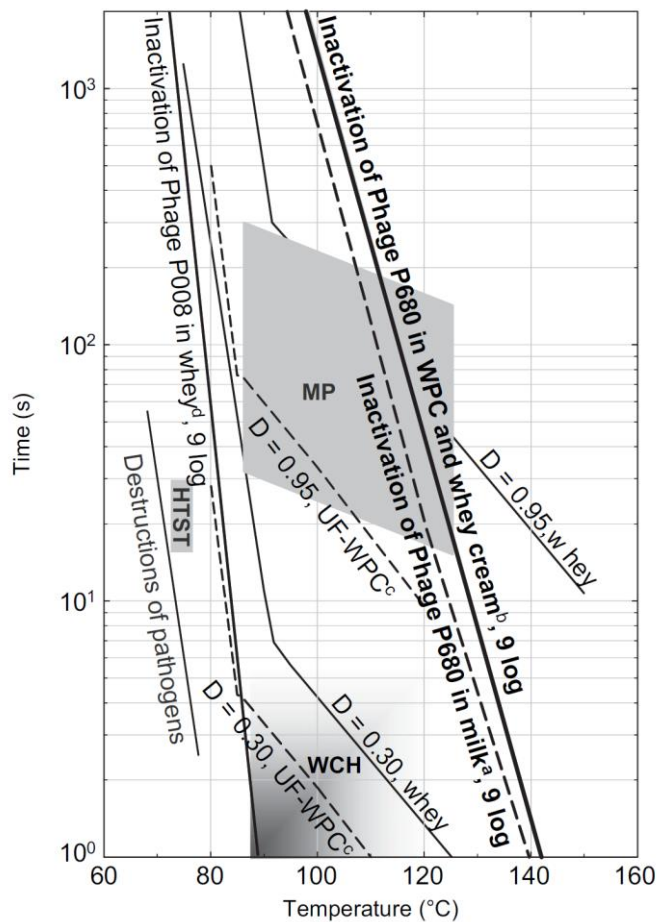


Abbildung 6 Linien gleichen Effekts zu einer 9-log-Reduktion des hitzeresistenten Phagen P680 und des hitzesensitiven P008 (Atamer und Hinrichs, 2010).

einen schützenden Effekt auf die Phagen hat. Für den *L. lactis* Phagen P008 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Erhitzung bei 70 °C für eine Minute in Wasser zu einer 4 log-Stufen Reduktion führte, wogegen in Milch nur eine Reduktion von einer log-Stufe erfolgte (Atamer *et al.*, 2011). Für Molke, Molkenkonzentrat und Molkenrahm konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Atamer *et al.*, 2009b). Schließlich ist auch bekannt, dass Phagen neben der Kurzzeit-Pasteurisierung auch die Sprühtrocknung überstehen können (Wagner *et al.*, 2017). Jüngste Untersuchungen identifizierten das *tape measure protein* (TMP) als möglichen Faktor, der die

Hitzeresistenz von Phagen beeinflusst (Geagea *et al.*, 2018). Das TMP definiert zudem die Länge des Phagenschwanzes. Dabei ist die Anzahl der AS des *tmp*-Gens direkt proportional zur Schwanzlänge des Phagen (Pedersen *et al.*, 2000). Geagea *et al.* (2018) isolierten in ihrer Studie hitzeresistente Einzelphagen eines eigentlich hitzesensitiven Phagen. Dies gelang durch schrittweise Adaption des hitzesensitiven Phagen an höhere Temperaturen. Diese Phagen wiesen eine Deletion innerhalb des TMP Gens von 120 bp auf, was zu der Schlussfolgerung von Geagea *et al.* führte, dem TMP komme bei der Hitzeresistenz der Phagen eine wichtige Rolle zu. Bisher konnte jedoch keine eindeutige Ursache der besonders starken Hitzeresistenz einzelner Phagen nachgewiesen werden.

1.5 Genomsequenzierung

Die Geschichte der Genomsequenzierungen beginnt mit der Sequenzierung eines RNA Bakteriophagen, dem Phagen MS2 (3569 bp) im Jahr 1976. Dieser war damit der erste vollständig sequenzierte Organismus (Fiers *et al.*, 1976). Zwei Jahre später wurde das erste komplett fertiggestellte Genom des Phagen PhiX174 (5386 bp) publiziert (Sanger *et al.*, 1977, Sanger *et al.*, 1978). Dabei wurde die Kettenabbruchmethode verwendet, die heute auch als die nach ihm benannte „Sangersequenzierung“ bekannt ist.

Erst im Jahr 2000 gelang die Sequenzierung des ersten menschlichen Genoms basierend auf der Sangersequenzierung. Die Sequenzierung wurde erfolgreich durch das „*human genome project*“ durchgeführt. Dieses im Jahr 1990 gegründete Projekt bestand aus einem internationalen Forschungsverbund, an dem etwa 1000 Wissenschaftler aus ca. 40 Ländern mitwirkten. 1998 bekam das internationale Projekt Konkurrenz von einem Privatunternehmen (Celera Genomics, diese ist seit 2011 der Firma Quest Diagnostics (<https://www.questdiagnostics.com/>) zugehörig), geführt von Craig Venter, welches das menschliche Genom mithilfe der „*whole-genome shotgun sequencing*“-Methode entschlüsseln wollte. Damit wurde der Grundstein für die „*next generation sequencing*“-Methoden (NGS) gelegt. Innerhalb von 2 Jahren gelang es Celera Genomics, ein sogenanntes „*draft genome*“ eines menschlichen Genoms zu publizieren (Venter *et al.*, 2001). Nahezu zeitgleich, mit einem Tag Vorsprung, konnte auch das „*human genome project*“ ihr „*draft genome*“ veröffentlichen (International Human Genome Sequencing *et al.*, 2001). Venter *et al.* publizierten am 16. Februar 2001 in *Science* - das „*human genome project*“ einen Tag früher am 15. Februar 2001 in *Nature*.

Die von Celera Genomics verwendete „*whole-genome shotgun sequencing*“-Methode (Venter *et al.*, 2001) erlaubte eine deutlich schnellere Sequenzierung als die vom „*human genome project*“ angewandte „BAC to BAC“-Methode (International Human Genome Sequencing *et al.*, 2001). Die DNA wurde dabei nicht wie beim „*human genome project*“ Stück für Stück sequenziert, sondern die gesamte DNA wurde in definierte Größen zerstückelt, und von den entstehenden Fragmenten wurden beide Enden sequenziert. Diese undefinierten DNA Fragmente wurden im Anschluss bioinformatisch analysiert, um so ein Bild des gesamten Genoms zu erstellen. Von großer Bedeutung waren dabei die

bisherigen Ergebnisse des „*human genome project*“, die unter anderen als Matrizen für die Berechnungen dienten.

Mit der Entwicklung neuer Hochdurchsatzsequenzierertechniken wie der von 2005-2013 eingesetzten Pyrosequenzierung (454 Life Sciences, CT, USA; ab 2007 Roche), aber auch der von Solexa (später Illumina) 2006 eingeführten „*bridge amplification*“ in Kombination mit der „*sequencing by synthesis*“-Methode (Illumina, CA, USA) begann das Zeitalter des „*next generation sequencing*“ (NGS). Seitdem sinkt der Preis pro sequenzierter Basen stetig, was zu einem einhergehenden Wachstum der generierten Genomsequenzen geführt

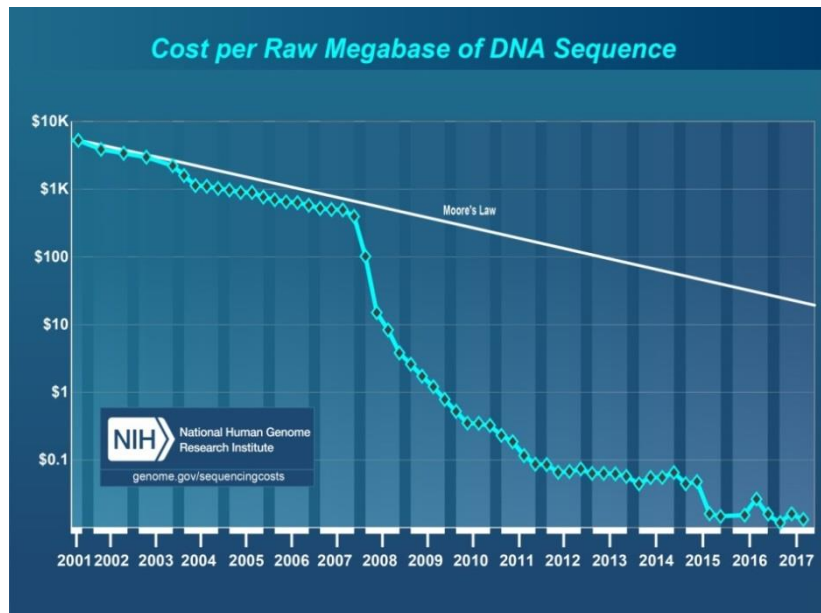


Abbildung 7 Preisentwicklung der durchschnittlichen Sequenzierkosten um 1 Millionen Basen zu sequenzieren (National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/sequencingcosts>).

hat. So betrug der Preis pro einer Millionen Basenpaaren im Jahr 2001, zur Zeit der ersten vollständigen Sequenzierung eines Humangenoms, ca. 10000 \$. Nachdem die Sequenziergeräte der „*next generation*“ flächendeckend etabliert waren, liegt der Preis mittlerweile bei unter 10 Cent (Abb. 7). Die Preisentwicklung reflektiert die Kosten der vorherrschenden Sequenziermethode. Bis zum Jahr 2007 war die Sangersequenzierung die vorherrschende Methode zur Sequenzierung. Der Verlauf folgte in dem Zeitraum sehr genau dem Mooreschen Gesetz. Dieses besagt, dass sich die Rechenleistung von Computern alle 2 Jahre verdoppelt, was equivalent mit niedrigeren Kosten einhergeht. Technische Prozesse, die Moores Gesetz folgen, gelten als äußerst effizient (<https://www.genome.gov/sequencingcosts>). Der dramatische Einschnitt der Kosten verdeutlicht das immense Potential der NGS-Techniken für die Wissenschaft, was schließlich zum schnellen Wachstum der Genomdatenbanken führte.

Die Bakteriophagendatenbank wächst dadurch sehr stark an. Obwohl die ersten sequenzierten Organismen Phagen waren, wurden diese im Vergleich zu Bakterien

weniger häufig komplett sequenziert. Im Jahr 2008 lagen jedoch ca. 500 Phagengenome in der NCBI Phagendatenbank vor. Heute sind es alleine in der Ordnung der *Caudovirales* etwa 5600 Phagengenome (Stand Dezember 2018).

1.6 Genomstruktur von Bakteriophagen

Die Mehrzahl der Phagen verfügt aufgrund ihrer geringen Größe über kleine Genome. Ihre Genomgrößen reichen von nur wenigen Kilobasen (kb) bis hin zu mehreren hundert kb. Ebenso wie die Größe der Phagengenome variiert die Anzahl der auf den Genomen codierten Gene. So sind die Genome der kleinsten Phagen nur 3,4 kb groß und verfügen über 4 CDS (Gen codierende Bereiche). Ein Beispiel sind die Vertreter der *Escherichia* Phagengruppe MS2 (einzelnsträngige RNA Phagen). Die größten Phagen, sogenannte Jumbo Phagen, können dagegen Genome von mehr als 200 kb haben (Yuan und Gao, 2017). Der größte bekannte Jumbo Phage ist der *Bacillus megaterium* „Phage G“ mit einer Genomgröße von knap 500 kb und fast 700 CDS (Hatfull und Hendrix, 2011).

Die Genomgrößen der *Lactococcus lactis* und der *Leuconostoc* spp. Phagen liegen zwischen 19 kb und 28 CDS (*L. lactis* phage ascphi28; Accession Nr. EU438902) und bis zu 132 kb und ca. 194 CDS (*L. lactis* phage AM4; Accession Nr. KY554771). Mitglieder der am häufigsten isolierten *L. lactis* Phagengruppe, der Phagengruppe 936, haben Genomgrößen von ca. 30 kb.

Eine Besonderheit der Genomstruktur von Phagen stellt das teilweise Überlappen von Genen dar. Dies erlaubt eine möglichst effiziente Nutzung des sehr kompakten Phagengenoms.

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, sind die *Siphoviridae* die am häufigsten isolierten Phagen und verfügen über doppelsträngige DNA. Die Genome der *Siphoviridae* zeigen einen ähnlich strukturierten Aufbau. Die Genome werden funktionell in Bereiche der „frühen“ und „späten“ Gene eingeteilt. „Frühe“ Gene verfügen über Promotoren, die denen des Wirts ähneln, und die somit durch die Wirtspolymerase transkribiert werden. Dies sind vor allem Gene zur Replikation des Phagengenoms. Die „späten“ Gene codieren vor allem die Strukturproteine und die zur Lyse der Wirtszelle benötigten Proteine. Größere, komplexe Genome können zwischen den „frühen“ und „späten“ Genen weitere „mittlere“ Gene aufweisen (Heller *et al.*, 2011).

Ein schematischer Aufbau eines typischen Vertreters der weit verbreiteten *L. lactis* Phagengruppe 936 ist in Abb. 8 dargestellt (Mahony *et al.*, 2012b). Neben den frühen und späten Genen finden sich hier auch mittlere Gene, deren Funktion bisher noch nicht beschrieben ist. Im Bereich der frühen Gene finden sich vor allem Gene, die zur Replikation der Phagen DNA benötigt werden. Darunter auch die phagenspezifische Polymerase (Abb. 8, schwarzer Pfeil). Im Bereich der späten Gene liegen die Gene der Strukturproteine des Phagen (Abb. 8, blaue Pfeile und rote Pfeile) und die für den Verpackungsmechanismus der DNA notwendigen Proteine (Abb. 8, grüne Pfeile).

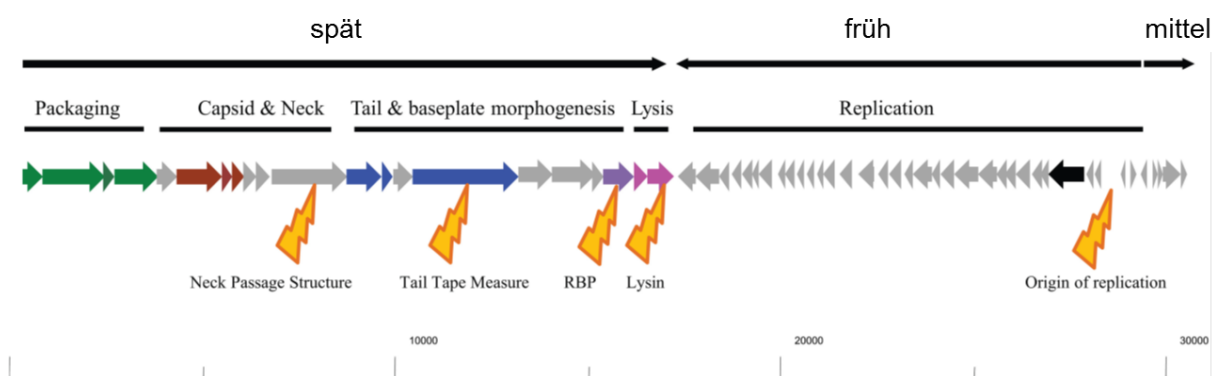


Abbildung 8 Schematischer Genomaufbau für typische Vertreter der 936 Phagengruppe, farblich dargestellt sind Gene mit nachgewiesener Funktion. Die Einteilung in späte, frühe und mittlere Gene ist vom Genom des Phagen sk1 abgeleitet (modifiziert nach Mahony *et al.*, 2012b).

1.7 Nachweis von Bakteriophagen

Der Nachweis von Phagen in Rohstoffen wie zum Beispiel Molke stellt für Molkereien eine wichtige Information dar. Mit dieser ist der Betrieb in der Lage zu entscheiden, wie ein bestimmter Rohstoff eingesetzt wird. So sollte beispielsweise eine stark mit Phagen belastete Molke nicht in den Käseprozess gelangen, da die Phagen dort zu erheblichen Fermentationsstörungen führen könnten. Eine Alternative für solche „phagenbelastete“ Molke könnte dann beispielsweise der Einsatz im Bereich der Fitnessdrinks (Molke Drinks) oder anderer nicht fermentierter Produkte sein.

Um Phagen nachzuweisen, stehen heute verschiedene Methoden sowohl der klassischen Mikrobiologie als auch der molekularen Mikrobiologie zur Verfügung. Zur Auswahl eines Tests muss sowohl die erforderliche Sensitivität als auch die maximale Dauer, die der Test beispielsweise im Betrieb dauern darf, berücksichtigt werden.

Klassische Methoden sind der Säuerungstest (Neve *et al.*, 1994) und der Plaquetest (Adams, 1959). Beim Säuerungstest werden Phagen indirekt nachgewiesen, indem der pH-Wert einer Probe mit dem pH-Wert einer Kontrolle verglichen wird. Zu beiden Ansätzen wird dabei dieselbe Starterkultur gegeben. Unterschiede im pH-Wert von mehr als 0,1 deuten dabei auf eine Säuerungsverzögerung und damit auf das Vorhandensein von Phagen hin. Bei einer weiteren etablierten Methode, dem Plaquetest, werden die Phagen direkt nachgewiesen und können sogar quantifiziert werden. Dabei werden verschiedene Verdünnungen eines Gemisches aus Wirtsstamm und Probe auf einen Nährboden gegeben und 24 Stunden inkubiert. Vorhandene Phagen sind anschließend anhand von Plaques sichtbar. Diese klassischen Methoden bieten einen verlässlichen Nachweis von virulenten Phagen, die die eingesetzten Bakterienstämme lysieren können. Zudem kann mit dem Plaquetest sogar eine einzelne Plaquebildende Einheit pro ml (PbE ml⁻¹) nachgewiesen werden. Beide klassischen Methoden benötigen jedoch viel Zeit bis ein Ergebnis vorliegt. Insbesondere bei der Verarbeitung von frischen Produkten, wie Milch, kann dies zu lange sein.

Schneller ist beispielsweise die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Diese molekularbiologische Methode beruht auf der exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA Abschnitte. Diese Abschnitte können so gewählt werden, dass bestimmte Phagengruppen spezifisch nachgewiesen werden können. Der spezifisch vervielfältigte DNA Abschnitt liegt am Ende der PCR in so großer Menge vor, dass die amplifizierte DNA mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann. Erhält man ein Signal in der erwarteten Produktgröße, bestätigt dies die Anwesenheit der Zielsequenz in der Probe. Bei dieser Methode kann nicht zwischen aktiven und inaktiven Phagen oder freier Phagen-DNA unterschieden werden. Zudem ist die Nachweisgrenze mit 10⁴ PbE ml⁻¹ (Labrie und Moineau, 2000) deutlich höher als im oben genannten Plaquetest. Eine PCR führt dafür je nach Protokoll innerhalb weniger (ca. 3-5) Stunden nach Probengewinnung zu einem Ergebnis. Zudem erlaubt sie durch die Wahl der eingesetzten Primer eine Differenzierung der Phagen. So stellt das von Deveau *et al.* (2000) etablierte PCR Nachweissystem ein multiplex-PCR-System dar. Über dieses können die drei am häufigsten vorkommenden Phagengruppen der *L. lactis* Phagen in einer Reaktion nachgewiesen werden. Da die amplifizierten Zielregionen unterschiedlich groß sind,

können zudem die in der Probe enthaltenen Phagengruppen anhand der Amplifikatgrößen identifiziert werden.

Eine weitere molekularbiologische Methode zum Nachweis einer spezifischen Zielsequenz stellt die „*loop-mediated isothermal amplification*“ (LAMP) dar. Diese Methode wurde während dieser Arbeit als Nachweismethode für Phagen im komplexen Medium Molke adaptiert und etabliert.

1.8 Isothermale Amplifikation: *Loop-mediated Isothermal Amplification*

Die Amplifikationsmethode LAMP wurde erstmals im Jahr 2000 beschrieben (Notomi *et al.*, 2000, Mori *et al.*, 2004). Seit dem werden stetig neue LAMP-Systeme zum Nachweis von insbesondere pathogenen Bakterien und Viren entwickelt (Li *et al.*, 2017). LAMP-Systeme zum Nachweis von häufig vorkommenden Pathogenen, wie Salmonellen, *Listeria monocytogenes* und weiteren sind bereits kommerziell erhältlich, in Deutschland werden diese Kits von der Firma Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld) vertrieben.

Wie auch bei der PCR wird bei der LAMP-Methode ein bestimmter DNA Abschnitt gezielt vervielfältigt. Die Amplifikation der DNA besteht dabei aus zwei Reaktionsritten. Im ersten Schritt wird das sogenannte Ausgangsmaterial gebildet (Abb. 9, Structure A), im zweiten Schritt findet die exponentielle Amplifikation des Ausgangsmaterials statt.

Im Gegensatz zur oben beschriebenen PCR wird ein Set aus mindestens vier Primern benötigt, die 6 Zielregionen enthalten. Es gibt dabei zwei Primerpaare, die „Inner Primer“ („forward inner primer“ (FIP) und „backward inner primer“ (BIP)) und die „Outer Primer“ (F3 und B3). Während die „Outer Primer“ vergleichbar mit den Primern der konventionellen PCR sind und je eine Zielregion auf dem selben DNA Strang haben, verfügen die „Inner Primer“ über je zwei Primersequenzen F1c und F2 bzw. B1c und B2. Die

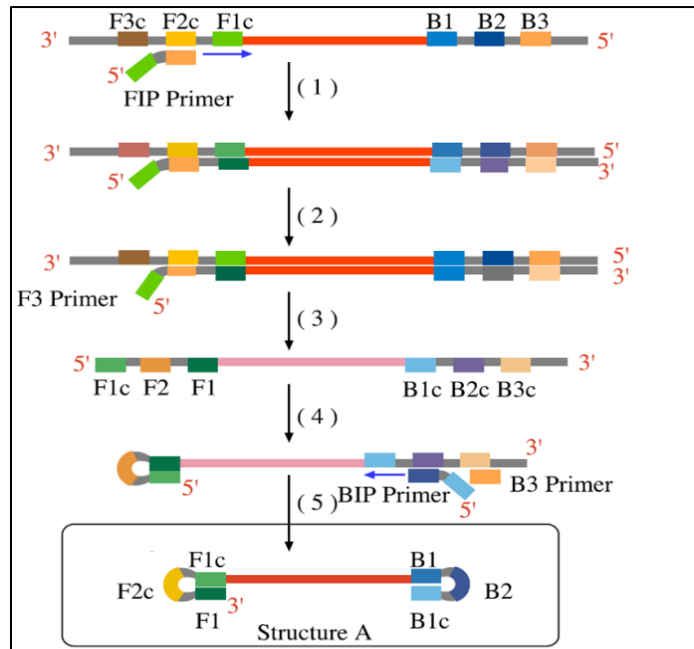


Abbildung 9 LAMP-Methode: Bildung der Ausgangsfragmente für die Amplifikation, modifiziert nach Mori et al. (2004).

Zielregionen der Primer F1c und B1c liegen auf dem komplementären DNA Strang (Abb. 10). Diese spezielle Struktur der Primer führt während der Amplifikation zu den charakteristischen Loop-Strukturen (Abb. 9, Structure A). Die beiden Primersequenzen können durch eine Thymidin Brücke miteinander verbunden sein (Abb. 10).

Für den ersten Schritt werden alle vier Primer benötigt, im zweiten dann nur die „Inner Primer“ FIP und BIP, daher werden diese auch in deutlich höherer Zahl zugegeben als die „Outer primer“.

Zunächst bindet ein „Inner Primer“ mit der Primersequenz F2 / B2 an die entsprechende Zielregion F2c / B2c (Abb. 9). An diesen Primern startet die ‚Bst DNA Polymerase, Large Fragment‘ (New England Biosystems) die Synthese der zum Matrizenstrang komplementären DNA. Während dieser Teil synthetisiert wird, kann der entsprechende Outer Primer F3 beziehungsweise B3 an den

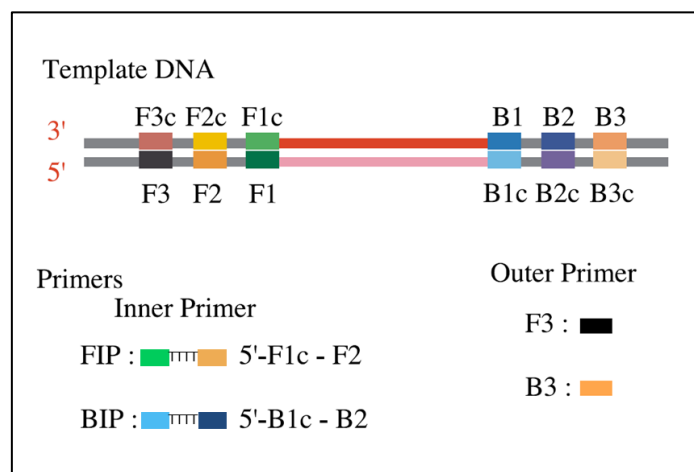


Abbildung 10 LAMP-Methode: Schematische Übersicht der notwendigen Primer und deren Zielregionen, modifiziert nach Mori et al. (2004).

Matrizenstrang binden und ebenfalls als Startpunkt für die *Bst* DNA Polymerase dienen. Die *Bst* DNA Polymerase verfügt über „*strand displacement activity*“, diese beruht im wesentlichen auf dem Fehlen einer 5' - 3' - Exonukleaseaktivität und erlaubt der *Bst* DNA Polymerase so, den neu synthetisierten DNA Strang zu verdrängen. Hierauf beruht auch der isothermale Ablauf der Reaktion.

Es ist nicht notwendig, den neu synthetisierten DNA Strang durch Erhitzen zu denaturieren, stattdessen wird durch die Synthese am Startpunkt F3 / B3 der neu synthetisierte Strang mit den Startprimern F2 / B2 von der Matrize verdrängt. Der so abgespaltene Strang beginnt nun mit der Zielsequenz für den F1c / B1c Primer. Dieser Reaktionsschritt findet an dem neuen Strang in beide Richtungen statt, so dass als Ergebnis des ersten Reaktionsteils das Ausgangsmaterial entsteht (Abb. 11). Diese Struktur der Primer führt durch „*self priming*“ der DNA zu Fragmenten mit charakteristischen Loop-Strukturen.

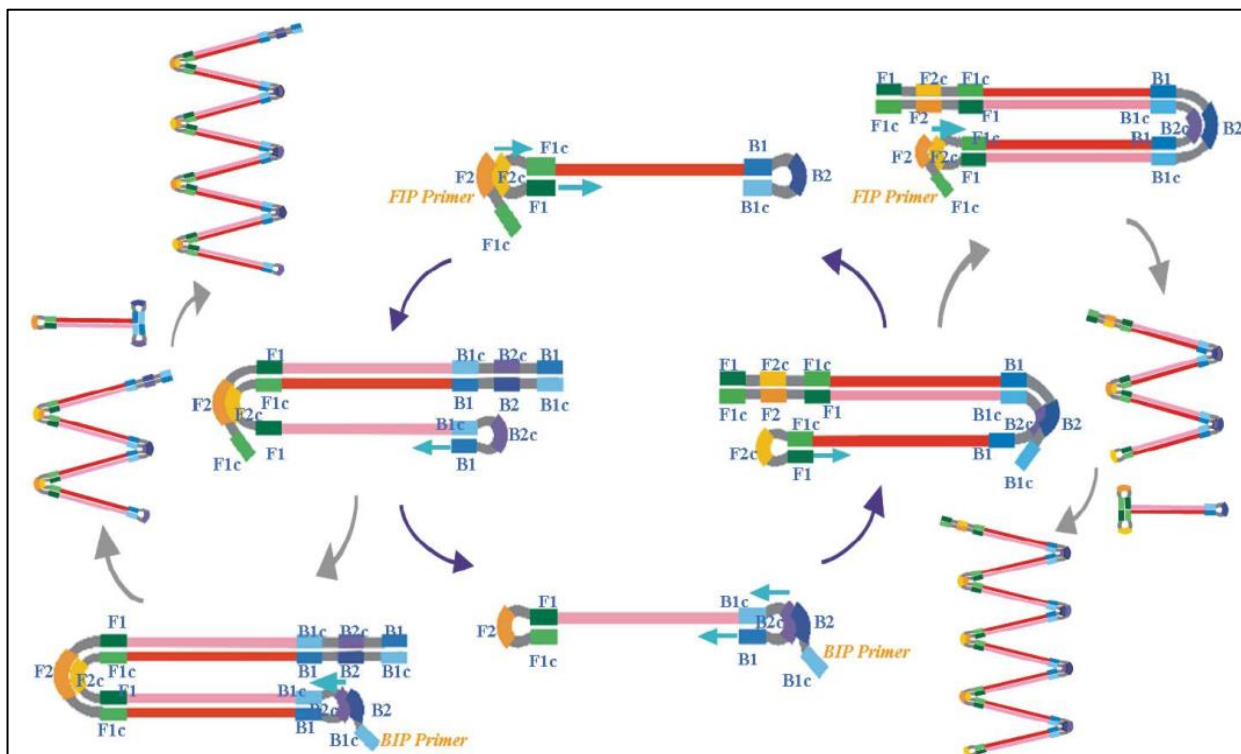


Abbildung 11 LAMP-Methode: Exponentielle Amplifikation der Ausgangsfragmente. Es entstehen Multimere der Ausgangsfragmente in unterschiedlichen Größen (nach Mori et al. (2004) J. Biochem. 59:145-157).

Diese unterschiedlich langen Fragmente sind als typisches Leiterbild in der Agarose-Gelelektrophorese erkennbar. Eine LAMP-Reaktion benötigt je nach Version der eingesetzten *Bst* DNA Polymerase 30-60 Minuten, um aus einigen wenigen DNA

Molekülen eine exponentielle Menge an Amplifikaten zu produzieren. Dabei wird etwa 50-mal so viel DNA wie bei einer standardmäßigen PCR produziert (Tanner und Evans, 2014) und damit ist eine LAMP-Reaktion deutlich schneller als eine PCR. Besonders der isothermale Reaktionsablauf macht die Methode zu einer interessanten Alternative zur PCR. Es ist kein aufwendiges PCR Programm mit unterschiedlichen Temperaturschritten notwendig, es kann somit auf einen kostenintensiven PCR-Zykler verzichtet werden. Ein einfacher Heizblock oder ein Wasserbad reichen für die Reaktion aus. Da bei der LAMP-Methode eine ausreichende Menge DNA amplifiziert wird, um eine Identifizierung mit bloßem Auge („*naked eye*“) zu ermöglichen, wird für die Auswertung einer Reaktion zudem nicht die Agarose-Gelelektrophorese benötigt, die ebenfalls zusätzliches Laborequipment benötigt.

Die einfachste Methode zum visuellen Nachweis wäre die Messung der Trübungszunahme in der Probe, da als „Nebenprodukt“ der LAMP-Reaktion große Mengen Magnesium-Pyrophosphat ($Mg_2P_2O_7$) ausfallen. Die so entstehenden Trübungsunterschiede sind nur mit viel Erfahrung mit dem bloßen Auge zu erkennen.

Um die Identifizierung positiver Reaktionen ohne größere Gerätschaften zu optimieren, wurde bereits der Einsatz von verschiedenen Indikatorfarbstoffen untersucht. Diese ermöglichen meist eine Auswertung innerhalb von Sekunden nach Reaktionsende (Zhang *et al.*, 2014). Bereits mit dem bloßen Auge sind die Proben durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen differenzierbar. Besonders deutlich wird der Unterschied, wenn eine UV-Licht Quelle zu Hilfe genommen wird. Positive Reaktionen zeigen unter dem UV-Licht ein deutliches Leuchten. Farbstoffe wie SYBR™ Green müssen allerdings nach Reaktionsende zugegeben werden, da sie sonst die Amplifikation hemmen können (Tao *et al.*, 2011). Dieser Schritt birgt ein erhebliches Kontaminationsrisiko (Tao *et al.*, 2011, Hong *et al.*, 2012), zeigt allerdings – mit einer Nachweisgrenze von nur einer Kopie der Zielsequenz pro μl - die höchste Sensitivität. Der Einsatz von kolorimetrischen Indikatorfarbstoffen stellt eine weitere Möglichkeit der direkten Auswertung dar. Der Vorteil dabei ist, dass die Indikatorfarbstoffe wie Hydroxynaphtholblau (HNB) oder Calcein bereits vor Reaktionsbeginn zum Reaktionsgemisch gegeben werden können (Goto *et al.*, 2009). Nachteilig ist die schlechtere Nachweisgrenze im Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff (Tabelle 1). Zudem können zu Beginn der Reaktion zugegebene Indikatorstoffe sogar zur Hemmung der Reaktion führen (Zhang *et al.*, 2014).

Ebenfalls in Tabelle 1 aufgeführt ist die bereits oben erwähnte Gelelektrophorese zum Nachweis der Reaktionen. Ein klarer Nachteil dieser Methode liegt auch hier im Öffnen der Reaktionsgefäße und dem damit verbundenen Kontaminationsrisiko. Zudem benötigt diese Methode deutlich mehr Zeit und Laborarbeit als die anderen Methoden. Der Vorteil liegt in der hohen Sensitivität und der Angabe der Amplifikatgrößen (Le *et al.*, 2012). Letzteres kann gerade zur Kontrolle der Primer sinnvoll sein. Primerdimere können so ausgeschlossen werden, und es kann anhand der Bandengröße gezeigt werden, dass das gewünschte Produkt amplifiziert wurde.

Neben diesen hier beschriebenen Methoden gibt es noch weitere Methoden zur Auswertung von LAMP-Reaktionen, wie die Trübungsmessung und die „real time“ – Fluoreszenzmessung, aber auch den Einsatz von elektrochemischen Sensoren (Zhang *et al.*, 2014). Diese Methoden brauchen jedoch weiteres Equipment und sind daher hier vollständigshalber erwähnt. Sie wurden in dieser Arbeit allerdings nicht berücksichtigt und werden daher auch nicht weiter ausgeführt.

Tabelle 1 Verschiedene Methoden zum Nachweis von positiven LAMP-Reaktionen, mod. nach (Zhang *et al.*, 2014).

2 Zielsetzung

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile	Nachweisgrenze
naked eye (weißer Niederschlag)	Magnesium - Pyrophosphat Niederschlag	einfach, frei von Kontaminationen	Subjektiver Fehler, geringe Sensitivität	6×10^4 KbE ml ⁻¹ (Kubota <i>et al.</i> , 2008)
naked eye (DNA Farbstoff)	Fluoreszenz Farbstoff (Zugabe nach der Reaktion)	einfach, sehr hohe Sensitivität	Kreuz - Kontaminationen	1 Kopie µl ⁻¹ (Hong <i>et al.</i> , 2012)
naked eye (Farbmessung)	kolorimetrischer Indikator (Zugabe vor der Reaktion)	Einfach, frei von Kontaminationen, sensitiv	Hemmung der Amplifikation	30 KbE ml ⁻¹ (Safavieh <i>et al.</i> , 2014)
Gel- elektrophorese	Elektrophoresische Auftrennung der DNA (DNA Farbstoff)	Angabe über Fragmentgrößen, hohe Sensitivität	langwierig, hohes Kontami- nationsrisiko	100 fg DNA (Le <i>et al.</i> , 2012)

Bakteriophagen können in milchverarbeitenden Betrieben erheblichen finanziellen Schaden verursachen. Um Strategien zur Vermeidung dieser Schäden zu entwickeln, ist es notwendig ein besseres Verständnis der Biologie der Phagen zu erlangen.

In dieser Arbeit sollten daher insgesamt 9 Phagen (7 *Lactococcus*- und 2 *Leuconostoc*-Phagen) u.a. durch Genomsequenzierung näher charakterisiert werden.

Die zwei *L. lactis* Phagen P1048 und P596 gehören den seltenen Phagengruppen 949 bzw. P087 an. Sie wurden ausgewählt um die Kenntnisse über diese seltenen Phagen zu erweitern. Zur Phagengruppe P087 gehören Phagen mit charakteristisch „geflochtenen“ Phagenschwänzen und ausgeprägter Basisplatte. Zu Beginn der Arbeit war lediglich die DNA des Typphagen P087 sequenziert (Villion et al., 2009). Zur 949 Gruppe gehören die größten bekannten *L. lactis* Phagen. Zu Beginn der Arbeit war nur ein bekannter Vertreter sequenziert - der Namensgeber der Gruppe - der Phage 949 (Samson und Moineau, 2010).

Die *L. lactis* Phagen P1045 und P1046 wurden beide durch Mitomycin C Behandlung desselben *L. lactis* Stammes freigesetzt. Die Freisetzung von zwei Phagen aus einem Stamm ist untypisch und wurde durch die Wachstumskurve des Stammes bestätigt, da diese keiner typischen Lysekurve entsprach. Durch die genomische Charakterisierung der beiden Phagen sollte geklärt werden, ob beide Phagen tatsächlich aus einem Stamm freigesetzt wurden und ob evtl. beide Phagen genetisch miteinander in Beziehung stehen. Besonders problematisch sind hitzeresistente Phagen, da diese nicht durch die Standard-Pasteurisierung inaktiviert werden können (Atamer et al., 2009a). Von den vier hitzresistentesten Phagen P656, P680, P1532 und P4565 war zum Zeitpunkt der Arbeit nur die Genomsequenz für den Phagen P680 (Mahony et al., 2013a) publiziert. Mithilfe der Genomsequenzierung der drei anderen hitzeresistenten Phagen, sollte untersucht werden, ob sich *in silico* eine Erklärung für die extreme Hitzeresistenz finden ließ. Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit ein molekularbiologisches Nachweissystem für die zum Start der Arbeit bekannten vier besonders hitzeresistenten *L. lactis* Phagen entwickelt werden.

Anforderungen an das Nachweissystem waren dabei eine einfache Handhabung, eine kurze Testdauer und dabei möglichst geringe Kosten. Zudem sollte die Nachweisgrenze der konventionellen PCR um wenigstens eine log Stufe optimiert werden. Diese betrug zu Beginn der Forschungsarbeiten 10^4 PbE ml⁻¹ für Vertreter der *L. lactis* Phagengruppe 936.

Die in der Einleitung beschriebene Amplifikationsmethode LAMP schien diese Anforderungen zu erfüllen, so dass diese Methode an das komplexe Medium Molke adaptiert und ein spezifischer LAMP-Nachweis für die hitzeresistenten Phagen der 936 Phagengruppe entwickelt werden sollte.

Schließlich wurden zwei *Leuconostoc* spp. Phagen zur DNA Sequenzierung ausgewählt, da einer dieser Phagen in Vorarbeiten nicht durch das etablierte PCR Nachweissystem für *Leuconostoc* spp. Phagen (Ali *et al.*, 2013) nachgewiesen werden konnte. Ziel war hier der erfolgreiche PCR-Nachweis aller bekannten *Leuconostoc* spp. Phagen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im diesem Abschnitt sind die verwendeten Geräte, Materialien und eingesetzten Bakterien und Phagen aufgelistet und beschrieben.

3.1.1 Geräte und Materialien

Die verwendeten Geräte sind im Anhang 1 dargestellt.

3.1.2 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien (Tabelle 2) wurden mit ddH₂O angesetzt und für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.3 Software

Neben Standardsoftware wie dem Microsoft Office Paket (Microsoft®) wurde spezielle Software für die Analysen eingesetzt. Diese ist in Tabelle 3 aufgelistet. Bei den Programmen SigmaPlot, GelCompar II, Geneious und CLC handelt es sich um kommerzielle Software. Von CLC wurde nur der frei zur Verfügung stehende „restricted mode“ verwendet, der die Betrachtung von Genomsequenzen und einfache Vergleiche erlaubt.

Tabelle 2 Allgemeine Nährmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen.

Medium / Lösung	Zusammensetzung	Menge
M17 - Medium (LM17/GM17) (Terzaghi und Sandine, 1975)	Phytone-Peptide	0,5 % (w/v)
	Poly-Peptide	0,5 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,25 % (w/v)
	Fleischextrakt	0,5 % (w/v)
	Ascorbinsäure	0,05 % (w/v)
	Na-β-Glycerophosphat	1,9 % (w/v)
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,025 % (w/v)
	1 M CaCl ₂	0,1 % (v/v)
M17 - Oberschicht-Weichagar	Bacto-Agar	0,75 % (w/v)
	Phytone-Peptide	0,5 % (w/v)
	Poly-Peptide	0,5 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,25 % (w/v)
	Fleischextrakt	0,5 % (w/v)
	Ascorbinsäure	0,05 % (w/v)
	Na-β-Glycerophosphat	1,9 % (w/v)
	1 M MgSO ₄	0,1 % (v/v)
M17 - Unterschichtagar	LM17/GM17-Medium	
	Agar-Agar	
	Zuckerlösung (Lactose/Glucose)	
Zuckerlösung für Unter-schichtagar (Krusch et al., 1987)	Lactose / Glucose	
	1 M CaCl ₂	
GM17-Medium für mesophile (Terzaghi und Sandine, 1975)	M17-Medium mit	
	Glucose	0,5 % (w/v)
LM17-Medium für mesophile (Terzaghi und Sandine, 1975)	M17-Medium mit	
	Lactose	0,5 % (w/v)
MRS-Medium (De Man et al., 1960)	MRS Medium	5,22 % (w/v)
	pH 5,7	
MRS-Unterschichtagar	MRS Medium	
	Agar-Agar	
	pH 5,4	
MRS-Oberschicht-Weichagar	MRS Medium	
	Agar-Agar	
	pH 5,4	

Tabelle 3 Im Rahmen der Arbeit verwendete Analysensoftware.

Software	Anwendungsbereich	Referenz/Hersteller	Internetadresse
Artemis	Annotation von Nukleotidsequenzen	(Carver <i>et al.</i> , 2012)	http://sanger-pathogens.github.io/Artemis/Artemis/
BlastN/BlastP	Abgleich einer Nukleotid-/Aminosäuresequenz mit einer Datenbank	(Madden, 2013)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CLC - genomic workbench	Sequenzanalysen (Assembly, Alignments, etc.)	QIAGEN Aarhus, Aarhus, Denmark	https://www.qiagenbioinformatics.com/
easyfig	Sequenzvergleiche (Alignment und BLAST)	(Sullivan <i>et al.</i> , 2011)	
GelCompar II	Normalisierung von Gelbildern	Applied Maths, Missouri, USA	http://www.applied-maths.com
Genious 9.16	Sequenzanalysen (Assembly, Alignments, etc.)	Biomatter, Auckland, Neuseeland	https://www.geneious.com/
Mauve	Multiple Genomalignments	(Darling <i>et al.</i> , 2010)	http://darlinglab.org/
MEGA7	Sequenzanalysen (Alignments, phylogenetische Analysen)	(Kumar <i>et al.</i> , 2016)	https://www.megasoftware.net/
PHASTER	Onlinetool zur Prophagensuche	(Arndt <i>et al.</i> , 2016)	http://phaster.ca/
PrimerExplorer V4	Onlinetool zum Primerdesign für LAMP-Assays		http://primerexplorer.jp/e/
PROTEIN CALCULATOR v3.4	Berechnung von Proteineigenschaften anhand der AS-Sequenz		http://protcalc.sourceforge.net/
Rast / myRast	Automatische Annotation von Nukleotidsequenzen	(Aziz <i>et al.</i> , 2008)	http://blog.theseed.org/server/s/
SigmaPlot 9.0	Statistik und grafische Darstellung	Systat Software GmbH	
SPAdes 3.11.1	Assembly von Sequenzdaten	(Bankevich <i>et al.</i> , 2012)	http://spades.bioinf.spbau.ru/release3.11.1/

3.1.4 Phagen und Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenzierung der Genome von 9 Phagen durchgeführt (siehe Kapitel 2 und Tabelle 4). Die ausgewählten Phagen stammen aus der Phagensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT), Max Rubner-Institut, Kiel. Bevor sie in die Phagensammlung aufgenommen wurden, wurden alle Phagen dreifach Einzelplaque isoliert.

Tabelle 4 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Phagen und ihre Wirtsstämme, rot geschriebene Phagen wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit sequenziert.

Phagen- bezeichnung	Phagengruppe	Wirtsstamm	Quelle / Referenz
<i>Lactococcus lactis</i>			
P656	936	15-2	Atamer et al. 2009a
P4565	936	9-21	Atamer et al. 2009a
P1532	936	7-18	Atamer et al. 2009a
P596	P087	7-2	Stammsammlung MBT
P1048	949	ML-8	Stammsammlung MBT
P1045	n. b.	MBT60, MBT13 (Wirt) MBT75 (lysogen)	Stammsammlung MBT
P1046	n. b.	MBT60, MBT13 (Wirt) MBT75 (lysogen)	Stammsammlung MBT
P680	936	F7/2	Atamer et al. 2009a
P008	936	F7/2	Atamer et al. 2009a
<i>Leuconostoc</i> spp.			
P965	<i>Ln.</i> <i>pseudomesenteroides</i> Phage	111	Wagner et al. 2017
P974	<i>Ln. mesenteroides</i> Phage	C008	Wagner et al. 2017

Zudem wurden weitere Phagen und ihre Genomsequenzen in der Arbeit verwendet, jedoch nicht im Rahmen der Arbeit sequenziert.

Die verwendeten Bakterien (Wirtsstämme) wurden ebenfalls der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT), Max Rubner-Institut, Kiel entnommen.

3.2 Mikrobiologische Methoden:

Im diesem Abschnitt werden Methoden zur Anzucht und Kultivierung der eingesetzten Bakterien und Phagen, sowie mikrobiologische Methoden zur Phagencharakterisierung beschrieben.

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Lactococcus lactis Stämme wurden in flüssigem Nährmedium (LM17 für Lactose verwertende Stämme und GM17 für Lactose negative Stämme) kultiviert. *Leuconostoc* spp. Stämme wurden in MRS-Flüssigmedium kultiviert. Der Einsatz der Kulturen erfolgte ausschließlich als Tageskulturen. Dazu wurden 5 ml des entsprechenden Flüssigmediums 2 %ig mit der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer $OD_{620\text{ nm}}$ von 0,5 im Wasserbad bei 30 °C inkubiert.

3.2.2 Spotttest

Die Phagen wurden aus der Phagensammlung entnommen und für die Anzucht gespottet. Dazu wurden je 300 µl der jeweiligen Wirtsstammkultur (Tabelle 4), 100 µl 100 mM CaCl_2 mit 3 ml Weichagar (50 °C) vermischt und auf eine entsprechende Unterschichtplatte (LM17-, GM17- oder MRS-Unterschichtagarplatte) gegossen. Anschließend wurden 100 µl der Phagenlysate in die Mitte der Platten pipettiert. Die Platten wurden bei 30 °C für 16 bis 18 Stunden inkubiert.

Zur weiteren Verwendung wurde der Spot anschließend mit einer sterilen Impföse abgekratzt und in 5 ml der jeweiligen Bouillon (LM17, GM 17 oder MRS) vermischt mit

100 µl 40 mM CaCl₂ gegeben und 3 Stunden geschüttelt. Das so erhaltene Phagenlysat wurde im Anschluss steril filtriert.

3.2.3 Plaquetest

Durch den quantitativen Plaquetest kann der Phagentiter bestimmt werden. Zur genauen Konzentrationsbestimmung von Phagen wurde daher zunächst eine serielle dezimale Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe hergestellt. Von jeder hergestellten Verdünnung wurden 100 µl mit 100 µl einer 40 mM CaCl₂ Lösung und 300 µl einer Bakterien-Tageskultur vermischt. Während einer 10 minütigen Inkubationszeit adsorbieren die Phagen an der Wirtszelle. Der Ansatz wurde mit 3 ml des zuvor erhitzten Oberschicht-Weichagar vermischt und auf einer dem Wirtsstamm entsprechenden Unterschichtagarplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht (ca. 16 bis 18 h) bei 30 °C inkubiert. Die Verdünnungen, die deutlich unterscheidbare Einzelplaques aufwiesen, wurden zur Analyse ausgezählt. Dabei wurden nur Platten, die mehr als 10 und weniger als 300 Plaques aufwiesen, zur Berechnung des Titers berücksichtigt. Dadurch konnte, unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungsstufe die Anzahl der Plaque bildenden Einheiten pro Milliliter wie folgt berechnet werden.

$$\text{Titer (PbE/ml)} = \frac{((\text{Plaques } \sum \text{Platten: } > 10 < 300) * d)}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1 \dots}$$

3.2.3 Lytische Anzucht von Phagen

Kleine Anzucht:

Mit der kleinen lytischen Anzucht wurde das richtige Verhältnis von Bakterien und Phagen ermittelt, um eine möglichst hohe Phagenausbeute zu erreichen. Dazu wurde zunächst von dem Phagenlysat eine Verdünnungsreihe hergestellt. Von jeder der Verdünnungsstufen wurden 0,1 ml mit 0,1 ml 40 mM CaCl₂ und 0,3 ml Wirtsstamm vermischt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden 5 ml Nährbouillon (je nach Wirtsstamm LM17, GM17 oder MRS) zugegeben und im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe der Nährbouillon, sowie im 30-minütigen Abstand wurde mit

einem Photometer die OD_{620nm} gemessen. Damit sollte das Wachstum und die anschließende Lyse der Bakterien dokumentiert werden. Die Verhältnisse von Phagen zu Bakterien, die zu einer guten Lyse führten (Anstieg der OD_{620nm} auf ~ 1 , dann Abfall auf ca. $\sim 0,1$) wurden für die große Anzucht eingesetzt.

Große Anzucht:

Um Phagenlysate mit Titern von $>10^9$ PbE ml^{-1} zu erhalten, ist es notwendig diese Phagen zunächst in einem großen Volumen lytisch zu vermehren. Die so erhaltenen Phagen werden dann über einen CsCl Gradienten aufkonzentriert. Die im Rahmen der kleinen Anzucht ermittelten Verhältnisse von Phagen zu Wirtstamm wurden auf ein Volumen von 1 l hochgerechnet. Auch das Volumen von $CaCl_2$ wurde entsprechend umgerechnet. Wie bei der kleinen Anzucht wurden auch die Ansätze im großen Volumen im Wasserbad inkubiert. Die OD_{620nm} der Ansätze wurde, wie beim kleinen Maßstab, bis zur kompletten Lyse der Bakterien gemessen.

3.2.4 Anreicherung und Reinigung der Phagen über CsCl Gradienten

Im ersten Schritt wurden zu 1000 ml Phagenlysate aus der großen Anzucht (Kapitel 3.2.3) je 300 μl DNase und RNase ($10 \text{ mg } ml^{-1}$) gegeben und eine Stunde bei $37^\circ C$ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 M NaCl, welches unter sanftem Rühren gelöst wurde. Durch anschließendes Zentrifugieren bei $4^\circ C$ und 7000 rpm (Beckman Coulter J2-21 Zentrifuge; Rotor: JA-10) für 10 Minuten wurden die Phagenpartikel von den bakteriellen Zelltrümmern getrennt. Dem phagenhaltigen Überstand wurde PEG 6000 in einer Endkonzentration von 10 % zugegeben und ca. 1 Stunde gerührt. Die Lösung wurde über Nacht bei $4^\circ C$ inkubiert. Die nun gefällten Phagen wurden bei $4^\circ C$ und 8000 rpm (Beckman Coulter J2-21 Zentrifuge; Rotor: JA-10) für 20 Minuten zentrifugiert.

Tabelle 5 Herstellung der jeweiligen CsCl-Lösungen für den CsCl-Gradienten.

Dichte (δ)	CsCl (g)	SM-Puffer (g) ad
1,2	8,72	39
1,3	13,10	42
1,4	17,45	45
1,45	19,63	46,5
1,5	21,80	48
1,7	30,50	54

Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Phagen in SM-Puffer resuspendiert. Für den CsCl Gradienten wurden CsCl-Lösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt (siehe Tabelle 5). Diese wurden in einem Zentrifugenröhrchen vorsichtig übereinander geschichtet und mit 5 - 6 ml des resuspendierten Phagenpellets überschichtet. Der Gradient wurde bei 10 °C und 25000 rpm (Optima™ L-90K; Rotor: SW32.1 Ti) für 20 Stunden zentrifugiert. Dabei reichern sich die Phagen in einer bläulichen Bande in Bereich der Dichten 1,4 - 1,45 an (Abb. 12, roter Pfeil). Diese konnte im Anschluss mit einer Kanüle und Spritze abgenommen werden.

3.2.5 Erhitzungsversuche

Durch die Erhitzungsversuche der Phagen wurden zwei Fragestellungen bearbeitet. Zum einen sollte geklärt werden, ob sich ein hitzeresistenter von einem hitzesensitiven Phagen der gleichen Phagengruppe (Phagengruppe 936) bei gleicher prozentualer Inaktivierung morphologisch unterscheidet. Zum anderen wurden Mutanten eines hitzesensitiven Phagen (P008) mit dem Wildtyp verglichen, um zu klären ob Mutationen, die zu unterschiedlichen Schwanzlängen führen, einen Einfluss auf die Hitzeresistenz der Phagen haben. Dazu wurden Phagenlysate in Wasser auf einen Ausgangstitern von 10^9 - 10^{10} PbE ml⁻¹ verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde je 0,1 ml der Phagensuspension mit 1,4 ml ddH₂O in ein Edestahlröhrchen (1,5 ml Volumen) gegeben (Abb. 13). Die Röhrchen wurden für jeden Phagen bei einer konstanten Temperatur für unterschiedliche Zeiten im Wasserbad inkubiert (siehe Kapitel 4.3.4). Zu definierten Zeiten wurden dann

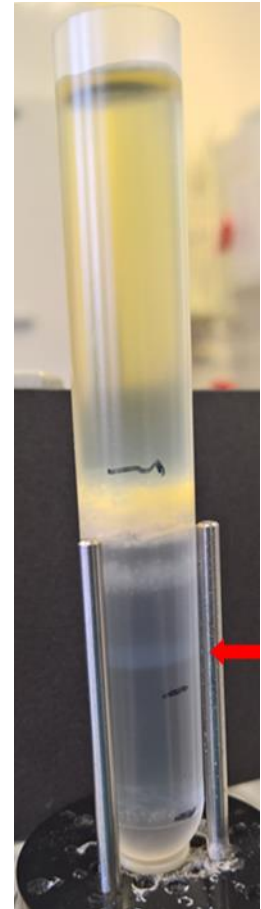


Abbildung 12 CsCl Gradient nach der Zentrifugation. Der rote Pfeil markiert die phagenhaltige blaue Bande.

einzelne Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen und direkt in Eiswasser gekühlt. Im Anschluss wurde der Titer der Phagensuspension und damit der prozentuale Anteil der Inaktivierung bestimmt.

Zur Beantwortung der Frage, ob es morphologische Änderungen zwischen hitzesensitiven und hitzeresistenten Phagen gibt, wurden die Suspensionen der unbehandelten Kontrolle, bei 50 % und bei 90 % Inaktivierung für die Transmissionselektronenmikroskopie vorbereitet.



Abbildung 13 Edelstahlröhrchen zur Phagenerhitzung.

3.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Phagen

Durch den Einsatz der Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Phagenmorphologie ermittelt, zudem wurde das Verhältnis von intakten Phagen zu defekten Phagenpartikeln in den Proben bestimmt.

Für die Herstellung von TEM-Präparaten wurde im ersten Schritt reiner Kohlenstoff mit der Bedampfungsanlage BAL-TEC MED 020 (Balzers, Lichtenstein) auf frisch gespaltenen Glimmerplatten (Plano GmbH, Wetzlar) aufgedampft. Diese Glimmerplatten wurden anschließend in ca. 3 x 3 mm kleine Quadrate geschnitten. Um den Kohlefilm von den Glimmerplatten zu lösen, wurde dieser in 100 µl Phagenlysat getaucht. Die Phagen adsorbieren in einer 5-minütigen Inkubationszeit an dem Kohlefilm. Anschließend wurde dieser mit zwei Tropfen ddH₂O gewaschen und in 80 µl einer 2 %igen Uranylacetatlösung (Agar Scientific, Stansted, England) überführt. Dies führte zur Negativkontrastierung des Präparats. Nach wenigen Sekunden wurde der Film mit einem 400-„mesh“ Kupfernetzchen (Plano GmbH, Wetzlar) aufgenommen und überschüssiges Uranylacetat mit Filterpapier abgezogen.

Die Analysen der Präparate wurden in einem Tecnai 10 Transmissionselektronenmikroskop (FEI Thermo Fisher Scientific, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV Beschleunigungsspannung durchgeführt. Die Dokumentation der Phagen erfolgte mit einer CCD-Kamera (Megaview G2 CCD-Kamera (SIS Olympus, Münster) bei einer

Primärvergrößerung von bis zu 210.000x. Die Verarbeitung der Bilder wurde mit der iTEM 5.2 TEM Imaging Platform Software (SIS Olympus, Münster) durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden:

In diesem Abschnitt werden insbesondere Methoden zur Extraktion und verschiedene Methoden zur Analyse von DNA beschrieben.

3.3.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion von DNA kamen, je nach weiterer Verwendung der DNA, verschiedene Methoden zum Einsatz.

Für die Extraktion von möglichst intakter genomischer DNA aus einer mit einem CsCl Gradienten gereinigten Phagensuspension wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987) und die Extraktion von genomischer DNA mittels des Zymo Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit entsprechend der Herstellerangaben genutzt.

Für die schnelle Extraktion von Phagen DNA, zum Beispiel für einen PCR Nachweis, wurde die „boiling method“ verwendet. Dabei wird die DNA durch das Erhitzen geschädigt, so dass fragmentierte DNA zur weiteren Verwendung entsteht.

3.3.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Isolierung der genomischen Phagen-DNA aus CsCl-gereinigtem Lysat mittels der Phenol-Chloroform Extraktion wurden die unterschiedlichen Löslichkeiten von Proteinen und DNA genutzt, um diese in einem Zweiphasensystem effektiv voneinander zu trennen. Dazu wurden zunächst 500 µl CsCl-gereinigtes Lysat in einen Dialyseschlauch (Visking™ dialysis tubing 8/32, 6 mm Ø, Serva) pipettiert und zweimal jeweils 1 Stunde gegen 500 ml Dialysepuffer bei Raumtemperatur dialysiert.

Das Dialysat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 20 mM EDTA, 100 µg ml⁻¹ Proteinase K und 0,5 % SDS versetzt und 3 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phagen-DNA durch Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol

extrahiert. Dazu wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol vermischt, 30 x invertiert und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert (VWR, Galaxy 14D). Der wässrige Überstand wurde abgenommen und nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von 1 Volumen Chloroform wiederholt, die wässrige Phase in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht gegen ein 1000-faches Volumen TE-Puffer bei 4 °C dialysiert. Die DNA-Konzentration des Dialysats wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand eines aufgetragenen Markers abgeschätzt.

3.3.1.2 **Boiling-Methode**

Bei der *Boiling*-Methode wurde ein beliebiges Volumen einer phagenhaltigen Probe für mindestens 10 min bei 95 °C erhitzt. Dadurch wurde die Proteinhülle des Phagen zerstört und die DNA freigesetzt. Beim Erhitzen der Probe wird die Zelle aufgebrochen, dabei wird die DNA teilweise degeneriert.

3.3.1.3 **Chelex-100 Extraktion**

Um die in Kapitel 3.3.1 erwähnte Schädigung der DNA zu reduzieren, wurde die *Boiling*-Methode durch den Einsatz des Komplexbildners Chelex-100™ (Bio-Rad) optimiert. Chelex-100™ wird vor dem Erhitzungsschritt zu der Probe pipettiert und hat einen schützenden Effekt auf die DNA. Durch die Bindung von polyvalenten Ionen werden vorhandene Nukleasen nahezu inaktiviert (Walsh *et al.*, 1991). Polyvalente Ionen in der Milch sind unter anderem Ca^{2+} und Mg^{2+} . Bei einer PCR wird Mg^{2+} von der Polymerase zur Vervielfältigung der DNA benötigt. Chelex-100™ muss daher vor dem Einsatz der Probe in einer PCR restlos entfernt werden, um zu verhindern, dass notwendige Ionen gebunden werden.

Bevor die DNA weiterverarbeitet werden konnte, wurde das Gemisch für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um Chelex-100™ vom Überstand abzutrennen. Der Überstand wurde dann abgenommen und für weitere Analysen eingesetzt.

Für eine höchstmögliche DNA Ausbeute wurde die optimale Konzentration von Chelex-100™ ermittelt. Diese lag in den Vorversuchen bei 10 %, welche bei allen Versuchen eingesetzt wurde.

3.3.2 DNA-Auftrennung via Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook und Russel, 2001) wurde DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Gele mit unterschiedlichem Agarosegehalt (0,8; 1,5 oder 2 %) wurden durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer (Tab. 6) gelöst und in einen Gel-Schlitten mit einem Kamm gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer mit 1x TAE gefüllten Kammer (Mini-Sub® Cell GT, Bio-Rad) mit DNA-Proben beladen. Diese wurden zuvor mit 6x Loading Dye (Tab. 6) vermischt. Als Größenstandard (Marker) wurde je nach erwarteter Fragmentgröße λ -DNA HindIII geschnitten (AppliChem GmbH, Darmstadt) und die DNA Marker 1 kb und 100 bp plus eingesetzt. Die DNA-Proben wurden bei 96 V (Mini Power Pack P20, Biometra) für ca. 60 min aufgetrennt.

Für die Visualisierung der Gele wurden diese 15 min in einer Ethidiumbromid Lösung ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ddH₂O) gefärbt und anschließend weitere 15 min in ddH₂O entfärbt und unter UV-Licht fotografiert (Universal Hood II ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

3.3.3 DNA-Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die für die Sequenzierung ausgewählten, morphologisch sehr ähnlichen Phagen alle unterschiedlich waren. Restriktionendonukleasen des Typs II wurden von Thermo Fisher Scientific und New England Biolabs GmbH bezogen. Der DNA-Verdau wurde gemäß den Herstellerangaben mit 100 ng DNA mit 5 bis 10 Units des Enzyms in den dazugehörigen Puffern für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Im Anschluss folgte eine Überprüfung der Restriktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese (3.3.2).

Tabelle 6 Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese und die Pulsfeldgelelektrophorese

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge
50 x TAE-Puffer	Tris-Acetat	2 M
	EDTA-Dinatriumsalz	0,05 M
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
1 x TAE-Laufpuffer	50x TAE	40 ml
	ddH ₂ O	1960 ml
Agarosegel (0,8, 1,5 oder 2 %)	Agarose	0,8 g / 1,5 g / 2 g
	1x TAE	ad 100 ml
6x <i>Loading Dye</i>	Bromphenolblau	33 % (v/v)
	Glycerin	0,25 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	20 µl
	ddH ₂ O	100 ml
10 x TBE-Puffer	TRIS-HCl	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	0,025 M
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
0,5 x TBE	10 x TBE	115 ml
	ddH ₂ O	2185 ml
Agarosegel (PFGE, 1,1 %)	Agarose (BioRad Nr. 162-0137)	1,1 g
	0,5 x TBE	ad 100 ml

3.3.4 Genomgrößenbestimmung durch die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE wurde durchgeführt, um die zu erwartenden Größen der für die Sequenzierung ausgewählten Phagengenome anhand des Gelbildes einschätzen zu können.

Dazu wurde ein 1,1 prozentiges Agarose-Gel (Pulsed Field Certified Agarose (BioRad Nr. 162-0137)) mit 0,5x TBE Puffer gegossen (Tabelle 6). In 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen wurden 150 ng der Phagen DNA mit 40 µl der 1,1 prozentigen Agarose vermischt. Dieses Gemisch wurde zügig in die Geltaschen pipettiert. Die Geltaschen wurden anschließend mit einem Tropfen der Agarose verschlossen. Als Marker wurde der

„Low Range PFG Marker“ (New England Biolabs) eingesetzt. Dieser weist Markerbanden im Bereich von 2,03 kb bis 194 kb auf (Abb. 14).

Für die PFGE wurde der 0,5 x TBE Puffer frisch angesetzt und 2 L davon in die Kammer gefüllt. Im Anschluss wurde das Gel vorsichtig in die Kammer gelegt. Die PFGE wurde bei 175 V und 14 °C für 20 Stunden laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg ml⁻¹) für 30 min gefärbt und 30 min im Wasserbad entfärbt. Die Banden der Phagengenome wurden unter UV-Licht in einer Geldokumentationsapparatur sichtbar gemacht (Universal Hood II ChemiDoc XRS, Bio-Rad) und erfasst. Die so entstandenen Bilder wurden mit dem Programm GelCompar II (APPLIED MATHS) analysiert. Den Banden des aufgetragenen Markers wurden dabei im Programm die bekannten Fragmentgrößen zugeordnet. Anhand dieser Banden errechnet das Programm dann die theoretischen Größen der aufgetragenen genomischen Banden.

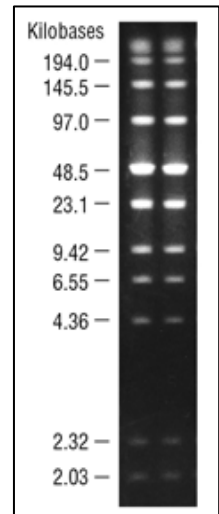


Abbildung 14 Low Range PFG Marker (NEB).

3.3.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit der PCR wurden spezifisch bestimmte DNA Abschnitte vervielfältigt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR Reaktionen wurde ein PCR Mastermix eingesetzt (5PRIME MasterMix). Dieser PCR Mastermix beinhaltet alle für die Reaktion notwendigen Standardreagenzien. Eine Polymerase, zur Vervielfältigung der Ziel DNA Sequenz, dNTP`s zum Aufbau eines neuen DNA Stranges, sowie der Reaktionspuffer und MgCl₂, die von der Polymerase zum optimalen arbeiten benötigt werden. Lediglich die spezifischen Primer (die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet), das DNA Template sowie eine entsprechende Menge ddH₂O müssen noch mit dem Mastermix vermischt werden.

Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide (Primer) und ihre Schmelztemperaturen.

Primer	5' → 3' Sequenz	Schmelztemperatur T _m (°C)	Quelle
936A	TCAATGGAAGACCAAGCGGA	57,3	Labrie und Moineau (2000)
936B	GTAGGAGACCAACCCAAGCC	61,4	Labrie und Moineau (2000)
LnP-F	TCAACNGGTGTNCAAAAAGTTT	52,0	Ali <i>et al.</i> (2013)
LnP-R	CTTCGTCTTCATCGTCACTTTC	58,4	Ali <i>et al.</i> (2013)
P1046-F	AAGCAGGAACCGCATCATCA	57,3	diese Arbeit
P1046-R	GTGTTTTCAAGTTTGAGAGCACT	57,1	diese Arbeit

Die PCR findet anschließend in einem ThermoCycler statt, der in der Lage ist exakt auf definierte Temperaturen zu erhitzen bzw. zu kühlen und ermöglicht damit die für die PCR notwendige Abfolge von unterschiedlichen Temperaturschritten. Diese umfassen in der Regel drei Temperaturschritte. Einen hohen (94-98 °C) zum Trennen der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige DNA (Denaturierung). Einen Temperaturschritt zum Anlagern der Primer (Annealing), dieser hängt von der Schmelztemperatur der Primer ab und liegt meistens 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer (in der Regel 55-65 °C). Schließlich einen Temperaturschritt zum Synthetisieren des neuen DNA Stranges (Elongation), dieser hängt von der eingesetzten Polymerase ab und liegt meist zwischen 68 und 74 °C.

Diese Schritte stellen einen Zyklus der PCR dar. Je nach Anwendung kann ein solcher Zyklus bis zu 35-mal hintereinander erfolgen. In Tabelle 8 sind die typischerweise durchgeführten Schritte dargestellt.

Zusätzlich zu den beschriebenen Zyklen besteht ein PCR Programm zudem aus zwei weiteren Schritten. Einer initialen Denaturierung und einer finalen Elongation. Die längere initiale Erhitzung soll sicherstellen, dass zu

Tabelle 8 Ablauf einer PCR. Die hervorgehobenen Schritte sind Teile der Zyklen und werden bis zu 35-mal wiederholt.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	98 / 95	5 min
Denaturierung	98 / 95	30 s
Annealing	T _M minus 5 °C	30-120 s
Elongation	72 °C	15–60 s
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlen	4 - 8	∞

Beginn der Reaktion sämtliche DNA-Moleküle einzelsträngig vorliegen. Die finale Elongation soll dafür sorgen, dass an allen noch einzelsträngig vorliegenden DNA-Molekülen die Polymerase einen komplementären Strang synthetisiert.

3.3.6 Southern Blot Analysen (DNA-DNA Hybridisierung)

DNA-DNA Hybridisierungen der Phagen P1045 und P1046 mit dem Wirtsstamm wurden mit dem DIG DNA Labeling kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und können im Detail bei Ali (2009) nachgelesen werden.

Zunächst wurde die DNA der als Sonden eingesetzten Phagen mit dem Enzym HindIII verdaut und mit Digoxigenin (DIG) markiert. Die so entstandenen Sonden aus Phagen DNA wurden mit der geblotteten Wirts-DNA hybridisiert. Zur Analyse der Hybridisierung wurde die Membran mit einer Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche Diagnostics GmbH) inkubiert und anschließend auf einem Röntgenfilm visualisiert.

3.3.7 Genomsequenzierung

Die aufgearbeiteten Phagen-DNAs der neun ausgewählten Phagen wurde am „Danish National High-Throughput DNA Sequencing Centre“ (Universität Kopenhagen) auf einem Roche 454 GS FLX Pyrosequenzierungsgerät sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden zudem assembliert und in Form von Dateien im Fasta Format zur Verfügung gestellt.

Die beiden sequenzierten *L. lactis* Stämme (Laborstamm A und MBT60) wurden auf einem Illumina MiSeq Sequenziergerät im MRI am Standort Kiel sequenziert. Die Proben wurden entsprechend des Herstellerprotokolls mit dem Illumina Nextera XT Kit vorbereitet und mit der Illumina V3 Reaktionschemie sequenziert. Die hierbei generierten FastQ Dateien wurden *de novo* assembliert (siehe Kapitel 3.4).

3.4 Bioinformatische Auswertung der Sequenzen

Die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Bakteriengenome wurden zunächst assembliert und anschließend annotiert.

Für die Phagengenome begann die Bioinformatische Auswertung mit der Annotation aller Genomsequenzen, gefolgt von phylogenetischen Analysen der Genomsequenzen. Für die hitzestabilen Phagen wurden vergleichende Sequenzanalysen mit den Programmen CLC-genomic workbench, Mauve und Artemis (Tabelle 3) durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen ob sich die Genome der hitzestabilen Phagen von den hitzesensitiven Phagen unterscheiden. Darüber hinaus wurden speziell mit dem Programm Mauve nach geeigneten Zielregionen für ein molekulares Nachweissystem dieser Problemphagen gesucht.

3.4.1 *De novo* Assembly der Genomsequenzen

Beim *de novo* Assembly werden aus den kurzen DNA Sequenzen (*reads*), die man nach einer Sequenzierung als Ergebnis erhält, längere Fragmente zusammengefügt (assembliert). Dafür werden die *reads* untereinander gelegt und überlappende Bereiche gesucht, die dann zu einer längeren Sequenz (*contig*) zusammengefügt werden (Abb. 15 b). Aus diesen *contigs* können noch längere Sequenzen generiert werden (*scaffolds*) und aus einer möglichst kleinen Anzahl an *scaffolds* kann ein durch ein *de novo* Assembly generiertes Genom dargestellt werden.

Das Assembly wurde mit den Programmen SPAdes und Geneious durchgeführt (Tabelle 3).

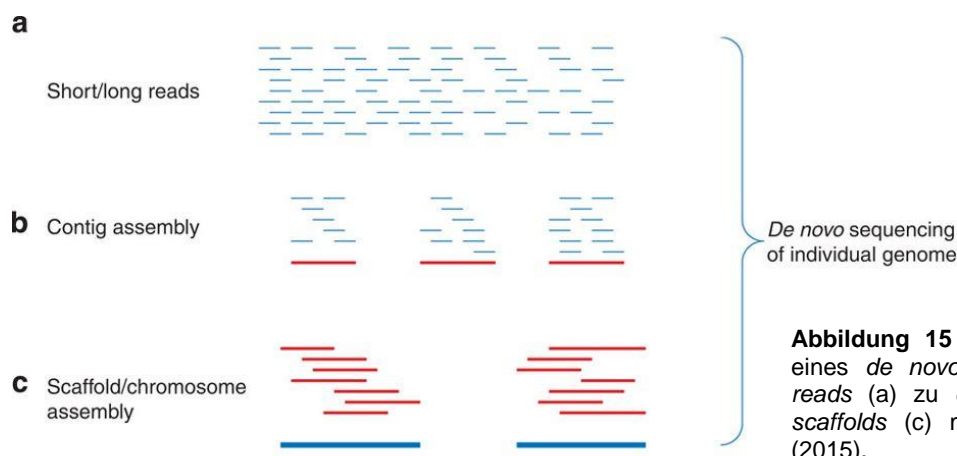


Abbildung 15 Schematische Darstellung eines *de novo* Assembly von einzelnen *reads* (a) zu *contigs* (b) und weiter zu *scaffolds* (c) modifiziert nach Lu *et al.* (2015).

3.4.2 Annotation der Genomsequenzen

Die erhaltenen Genomsequenzen im Fasta Format wurden mit den Programmen myRast (Aziz *et al.*, 2008), Artemis (Carver *et al.*, 2012) und Geneious (Biomatter Limited, New Zealand) annotiert. Zunächst wurde mit dem Programm myRast eine automatische Annotation durchgeführt. Das Programm identifiziert offene Leseraster (*open reading frames*, orf), also die Sequenzabschnitte, die immer mit einem Startcodon beginnen und mit einem Stopcodon enden. Bei prokaryotischer DNA ist das häufigste Startcodon AUG, aber auch alternative Startcodons wie GUG und UUG können als Startcodon durch die Polymerase erkannt werden (Madigan *et al.*, 2006).

Die erhaltenen Annotationen wurden mit den Programmen Artemis und Geneious überprüft. Dazu wurde zunächst durch eine BLASTn Analyse der gesamten DNA Sequenz (Tabelle 2) der nächste publizierte Verwandte ermittelt. Diese Sequenz wurde anschließend für vergleichende Sequenzanalysen (Mega, Geneious, Artemis) verwendet. Die neue Sequenz wurde dabei mit der publizierten verglichen und aneinander ausgerichtet (Alignment). Durch den Abgleich der Sequenzen konnte überprüft werden, ob eine unterschiedliche Anzahl an annotierten „*open reading frames*“ („orfs“) vorliegt und worin die Ursache dafür besteht. Denkbar sind Fehler bei der Annotation (z.B. unterschiedliche Startcodons), aber auch tatsächliche Unterschiede im Genom, wie Deletionen oder Insertionen im Bereich der „orfs“.

3.4.3 Alignments der Genome besonders hitzeresistenter Phagen

Durch den detaillierten Sequenzvergleich der Genome der hitzeresistenten Phagen mit anderen Phagen wurde nach einem Hinweis auf die besondere Hitzeresistenz gesucht. Zudem wurde nach geeigneten Zielregionen für den spezifischen molekularen Nachweis dieser hitzeresistenten Phagen gesucht. Dazu wurde die Sequenz des bereits publizierten, besonders hitzestabilen Phagen P680 (NC_021852) von der NCBI Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) heruntergeladen. Die Sequenz wurde mit den drei neu sequenzierten, zusammengesetzten und annotierten hitzestabilen Phagen verglichen. Dazu wurde mit dem Programm Mauve (Darling *et al.*, 2010) ein Alignment

des Gesamtgenoms der Phagen durchgeführt. Mauve teilt eine Sequenz in einzelne Blöcke, die dann mit den Blöcken der anderen Sequenzen verglichen werden. Der Vorteil gegenüber anderen Programmen zum Alignment von DNA Sequenzen liegt unter anderem darin, dass die zu vergleichenden Sequenzen komplett unterschiedlich strukturiert sein können und dennoch ähnliche Regionen identifiziert werden können. Neben Mauve wurden Alignments auch mit dem Programm MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) durchgeführt. Bei diesem Programm werden die Sequenzen vom jeweiligen Startpunkt miteinander verglichen. Bei nah verwandten Organismen, die eine ähnliche Genomstruktur aufweisen, ist dies eine robuste Methode zum Genomvergleich. Zudem können die durchgeführten Alignments als *multiple alignment* Dateien abgespeichert werden. Weitere Programme zum alignen von Sequenzen sind in Tabelle 3 dargestellt. Zum Vergleich einzelner Proteine wurden ebenfalls Alignments der einzelnen Proteinsequenzen oder Nukleotidsequenzen erstellt.

3.4.4 Erstellung von Stammbäumen

Zur phylogenetischen Untersuchung der Phagen wurden ihre Sequenzen in Stammbäume eingelesen. Dabei ist es möglich einzelne Gene, die Gesamtheit aller Gene oder die gesamte Sequenz mit anderen entsprechenden Daten zu analysieren. Zudem können sowohl Aminosäuren-Sequenzen als auch Nukleotid-Sequenzen miteinander verglichen werden.

Für Analysen der Gesamtheit der Gene der Phagengruppen, wurden die identifizierten Leseraster mit dem Programm Geneious extrahiert und in die, beim Startcodon beginnende, entsprechende Aminosäuresequenz umgewandelt. Die so erhaltenen Aminosäuresequenzen wurden entsprechend ihrer Reihenfolge im annotierten Genom, beginnend bei der kleinen Untereinheit des Terminasegens, hintereinander zusammengefügt (konkateniert). Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm Geneious aligned und als Protein-Fasta-Datei exportiert. Diese Datei wurde in das Programm MEGA7 geladen, wo die phylogenetischen Analysen durchgeführt wurden

Einzelne Gene wurden aus den Genomsequenzen der jeweiligen Phagen extrahiert und anschließend mit dem Programm MEGA7 miteinander *aligned*. Mithilfe der Alignment-Dateien wurden dann phylogenetische Berechnungen gemacht (MEGA7).

Soweit nicht anders angegeben wurden bei allen Analysen Maximum Likelihood Stammbäume berechnet und ein Bootstrap von 500 gewählt.

3.5 Entwicklung eines LAMP-Assays für Bakteriophagen der Milchsäurebakterien

Die Genome der hitzestabilen Phagen wurden mit Hilfe des Programmes Mauve mit allen zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Phagengenomen der 936 Phagengruppe verglichen. So wurde durch das Alignment aller verfügbaren Sequenzen dieser Gruppe nach einer potentiellen Zielregion für Primer für den LAMP-Nachweis gesucht. Diese Zielregion sollte idealerweise nur bei den vier hitzestabilen Phagen vorkommen. Sollte das nicht möglich sein, so sollte die Zielregion bei so wenig Phagen wie möglich vorkommen, um so mit möglichst geringer Fehlerate die besonders problematischen hitzeresistenten Phagen nachzuweisen.

Für die identifizierte Zielregion wurde anschließend für alle Phagen die über diese Region verfügen, erneut ein Alignment durchgeführt. So wurde innerhalb dieses Bereiches nach möglichst konservierten Bereichen für hitzestabile Phagen gesucht, wobei die Genomsequenzen anderer Phagen in diesem Bereich variabel sein sollten.

3.5.1 Entwicklung von LAMP-Primersets

Die Primersets wurden online auf der Website <https://primerexplorer.jp/e/> erstellt. Um passende Primer für alle vier hitzeresistenten Phagen zu erhalten, wurden die Sequenzen der potentiellen Zielregion in eine multiple-Alignment-Datei untereinander angeordnet. Diese Datei wurde auf der Website hochgeladen und durch das Programm PrimerExplorer V4 analysiert (Abb. 16).

Das Programm generiert verschiedene, mögliche Primersets innerhalb des ausgewählten Bereichs. Aus diesen Primer-Sets wurden die Sets ausgewählt,

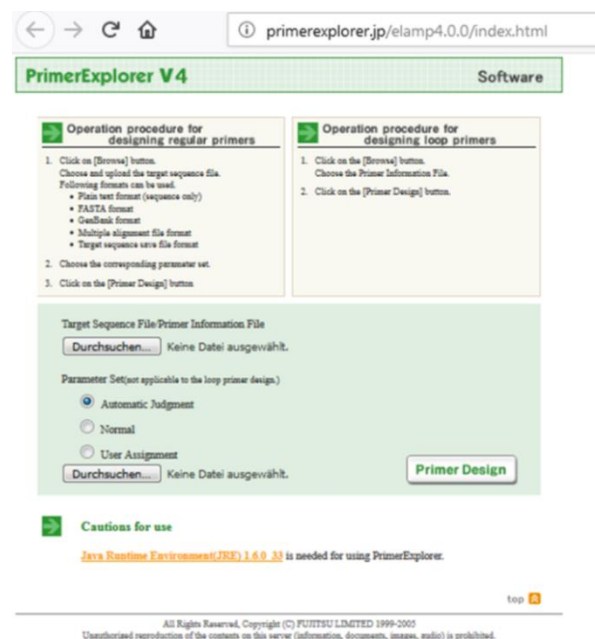


Abbildung 16 Benutzeroberfläche der online-Software PrimerExplorer (Tabelle 3).

deren Bestreben zur Primer Dimer Bildung am geringsten waren. Ein Indikator ist die freie Energie Dimer (minimum) dG , welche einen Hinweis auf die Neigung eines Primers zur Dimer Bildung gibt. So sollte der dG -Wert für die Primer Dimere möglichst hoch sein. Je niedriger der Wert umso mehr Energie wird benötigt, um entstandene Dimere wieder zu trennen.

Dazu kommen noch die dG Werte der 5' bzw. 3' Enden der einzelnen Primersequenzen. Diese sollten möglichst klein sein - am besten unter -4.

3.5.2 LAMP-Assay

Die gezielte Amplifikation von DNA Regionen durch die LAMP-Methode wurde in einem Thermoblock bei 60 bis 65 °C durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 1,6 μM der FIP und BIP Primer, jeweils 0,2 μM der F3 und B3 Primer, optional 0,8 μM der Loop Primer (zur Beschleunigung der Reaktion), 16 U der *Bst* 2.0 DNA Polymerase (NEB, USA), 0,8 M Betaine, jeweils 0,4 mM A, T, G und C dNTPs und 1 x *Bst* Reaktionspuffer (Nagamine *et al.*, 2002). Die Inkubationszeit im Thermoblock lag bei 30 bis 60 Minuten. Im Anschluss wurden die Reaktionen auf Eis gekühlt oder direkt ausgewertet.

3.5.3 Nachweis von positiven LAMP-Reaktionen

Zum Nachweis von positiven LAMP-Reaktionen wurde zunächst die Agarose-Gelelektrophorese (Kaptitel 3.3.2) getestet. Da bei einer LAMP-Reaktion eine Vielzahl an Fragmentgrößen entstehen, die immer aus verschiedenen Mengen aneinandergereihter Kopien der Zielregion bestehen, ist bei der Gelelektrophorese eine leiterähnliche Struktur zu erwarten.

Neben der Gelelektrophorese wurden verschiedene Farbindikatoren zur visuellen Auswertung von LAMP-Reaktionen getestet (Tabelle 9).

Tabelle 9 verwendete Methoden zur Auswertung von LAMP-Reaktionen

Farbstoff	Art
Gelelektrophorese	Elektrophoretische Auftrennung
Calcein	kolorimetrischer Nachweis
Hydroxynaphthol Blau (HNB)	kolorimetrischer Nachweis
SYBR® Safe	Fluoreszenz Farbstoff

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der ausgewählten Phagen:

Wie in Kapitel 2 beschrieben, war eine Voraussetzung für die Untersuchungen in dieser Arbeit, dass die Genomsequenzen der beschriebenen Phagen vorliegen. Zunächst wurden die ausgewählten 9 Phagen (Tabelle 10) hinsichtlich ihrer Morphologie und Genome charakterisiert. Diese Charakterisierung diente der Vorbereitung für die Sequenzierung. So konnte ausgeschlossen werden, falsche Phagenisolate oder Phagen doppelt für die Sequenzierung vorzubereiten.

Anschließend wurden die Phagen-DNA am „Danish National High-Throughput DNA Sequencing Centre“ (Universität Kopenhagen) sequenziert (siehe Kapitel 3.3.7).

4.1.1 Morphologische Analysen

Tabelle 10 Kopfdurchmesser und Schwanzlängen der untersuchten Phagen. Schwarz: hitzeresistente Phagen; Blau: *Leuconostoc* spp. Phagen; Blau: seltene *L. lactis*.

Phage	Kopfdiagonale (nm)	Schwanzlänge (nm)
P1532	57	145
P4565	57	155
P656	57	160
P596	63	188
P1048	75	520
P1045	55	125
P1046	66	320
P965	54	142
P974	55	150

Länge variierenden Schwanz (Tabelle 10). Alle untersuchten Phagen gehören morphologisch der Gruppe der *Siphoviridae* Phagen an (Abb. 17).

Nach der erfolgreichen Anzucht und Aufreinigung der Phagen über die CsCl-

Dichtegradientenzentrifugation wurden die Phagen unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht. Dabei bestätigte sich die bereits bekannte Morphologie (Abb. 17). Die TEM Bilder zeigten zudem, dass es sich zum überwiegenden Teil um intakte Phagenpartikel handelt (> 90 % nach Auszählung im TEM). Diese bestanden aus einem mit DNA gefüllten Kapsid und einem in der

Die Schwanzlängen der drei hitzeresistenten *L. lactis* Phagen (P656, P1532 und P4565) lagen zwischen 145 nm und 160 nm. Die Kopfdurchmesser lagen bei allen drei hitzeresistenten Phagen bei 57 nm (Tabelle 10, schwarz, Abb. 17 A-C). Die Schwanzlängen der seltenen *L. lactis* Phagen reichten von 125 nm beim Phagen P1045 (Kopfdurchmesser ca. 55 nm) bis zu 520 nm für den Phagen P1048 (Kopfdurchmesser ca. 75 nm) (Tabelle 10, schwarz, Abb. 17 D-F, I).

Die beiden *Leuconostoc* spp. Phagen P965 und P974 wiesen einen Kopfdurchmesser von ca. 54-55 nm auf und eine durchschnittliche Schwanzlänge von 142 nm (P965) und 150 nm (P974) (Tabelle 10, blau, Abb. 17 G und H).

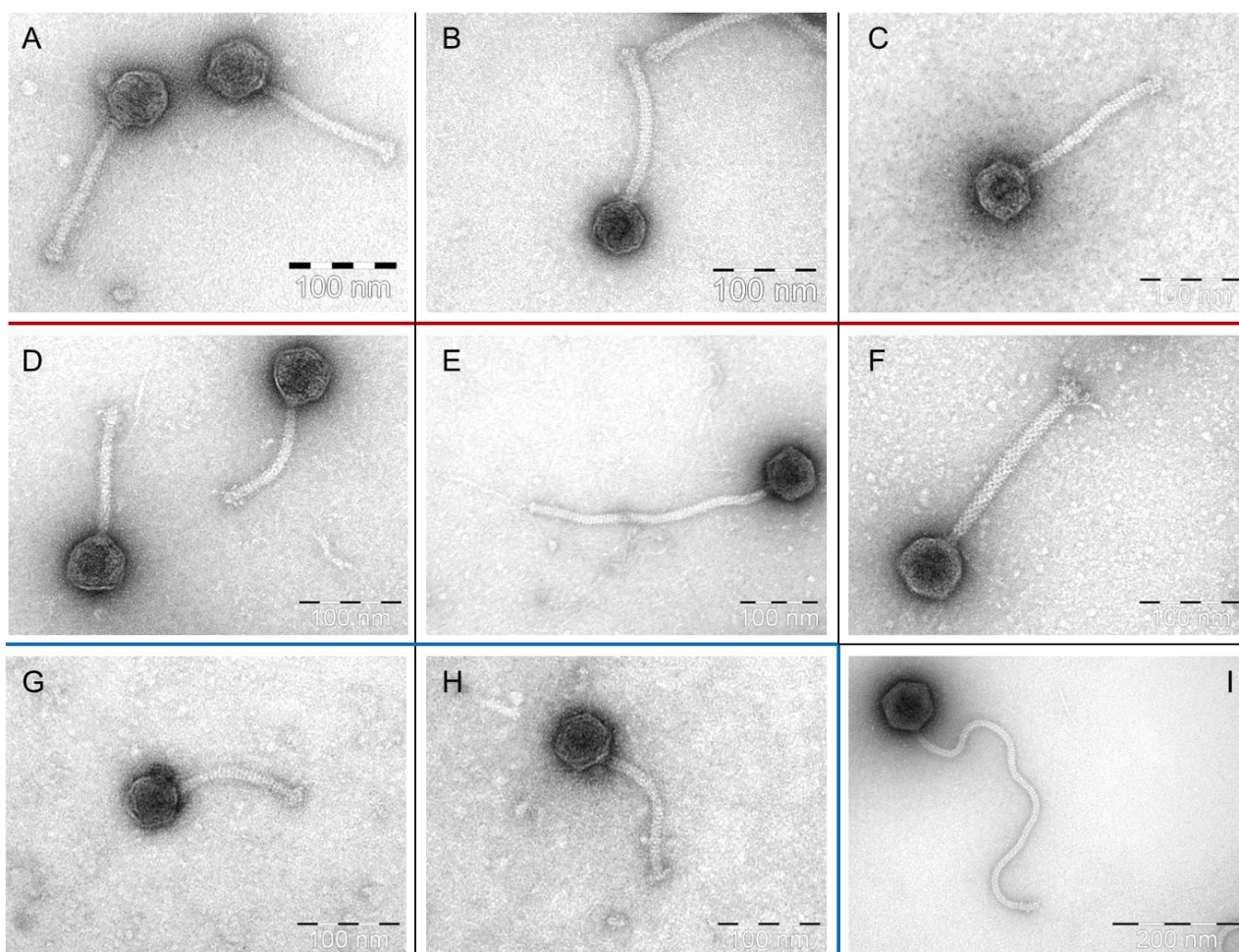


Abbildung 17 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 7 aufgereinigten *L. lactis* und 2 *Leuconostoc* spp. Phagen. *L. lactis* Phagen: P1532 (A), P4565 (B), P656 (C), P1045 (D), P1046 (E), P596 (F), P1048 (I); *Leuconostoc* spp. Phagen: P965 (G) und P974 (H).

4.1.2 Restriktionsverdau der genomischen DNA

Der Restriktionsverdau der genomischen DNA der ausgewählten Phagengenome diente dazu ausschließen zu können einen identischen Phagen doppelt zu sequenzieren. Dazu wurde, nach der Extraktion der genomischen Phagen DNA aus dem CsCl-Dichtegradienten, die DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten. Der hitzeresistente Phage P1532 zeigte keinen enzymatischen Verdau und der Verdau des Phagen P656 (Abb. 18, Spur 1) bestand nur aus zwei Banden. Die hitzeresistenten Phagen wurden daher zusätzlich mit dem Enzym EcoRV geschnitten, dabei zeigten alle Genome unterschiedliche Bandenmuster (Abb. 18). Der Phage P087 (Abb.18, Spur 7) wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen und diente lediglich als positiv Kontrolle für das eingesetzte Enzym, da für diesen Phagen ein Restriktionsmuster bekannt war.

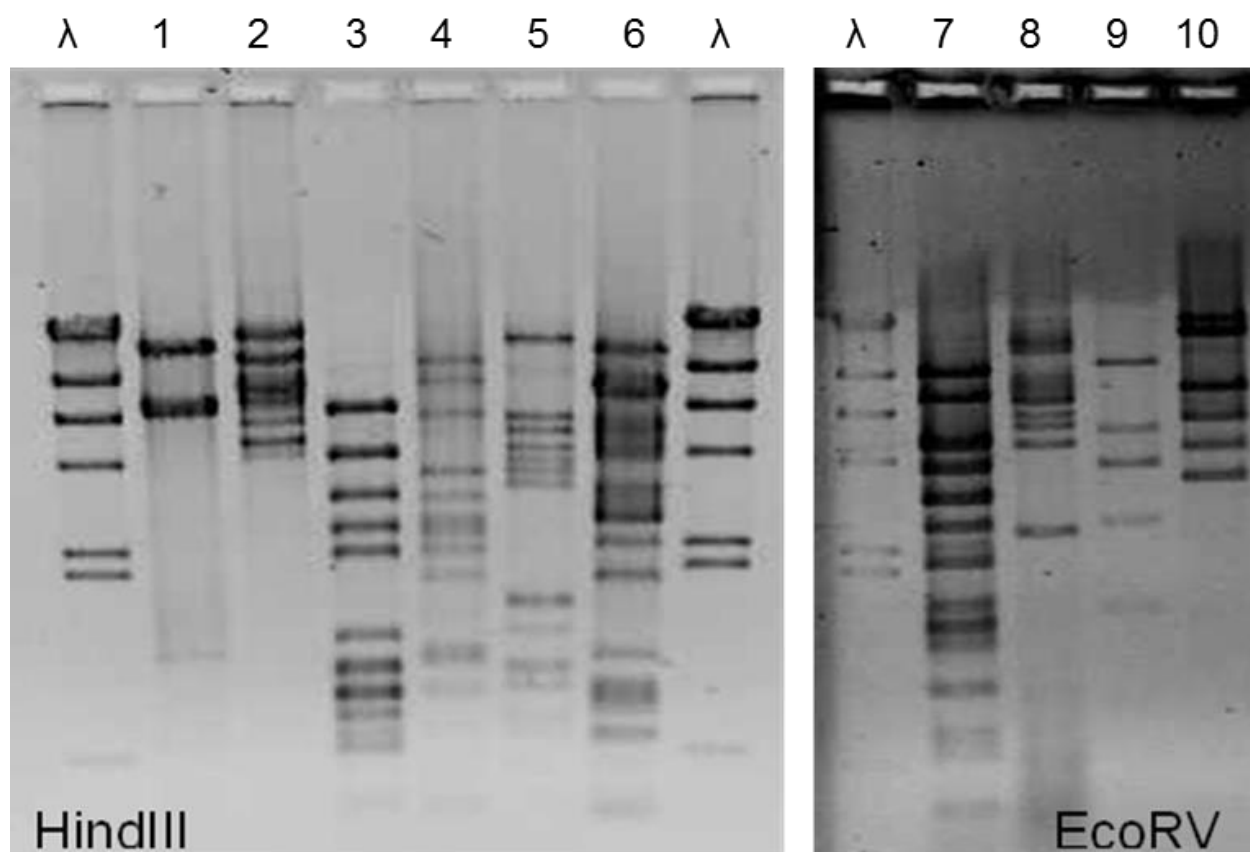


Abbildung 18 Gelelektrophorese der mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA der aufgereinigten Phagen. Mit HindIII wurden die Phagen P656 (1), P4565 (2), P1045 (3), P596 (4), P1046 (5) und P1048 (6) geschnitten. Für die Phagen P087 (7), P656 (8), P1532 (9) und P4565 (10) wurde zudem das Enzym EcoRV eingesetzt. DNA des Phagen λ geschnitten mit HindIII wurde als Marker eingesetzt.

4.1.3 Größenbestimmung der Phagengenome

Für die Sequenzierung der Genome war es notwendig, die ungefähren Genomgrößen der Phagen zu ermitteln. Dafür wurde die intakte genomische DNA der einzelnen Phagen mithilfe der PFGE der Größe nach aufgetrennt und die Größe anhand des PFGE-Gelbilds ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt. Die Bandengrößen der genomischen DNA der analysierten Phagen wurden, unter Berücksichtigung der bekannten Größen der Markerbanden, mit dem Programm GelCompare ermittelt. Diese lagen für die hitzeresistenten *L. lactis* Phagen zwischen 25 kb und 30 kb (Tabelle 11, Abb. 19 A und B Spuren 2, 3 und 4). Die beiden Phagen mit den erwartungsgemäß größten Genomen, die *L. lactis* Phagen P596 und P1048 zeigten, auf dem Gel keine distinkte Bande. Der Phage P1048 wurde zweimal aufgetragen, da er bereits bei einem Vorversuch keine distinkte Bande zeigte. Die Genombanden der weiteren *L. lactis* Phagen lagen im Bereich von ca. 32 kb (P1045) und 50 kb (P1046). Die Genombanden der beiden *Leuconostoc* Phagen (P965 und P974) lagen beide bei ca. 27 kb.

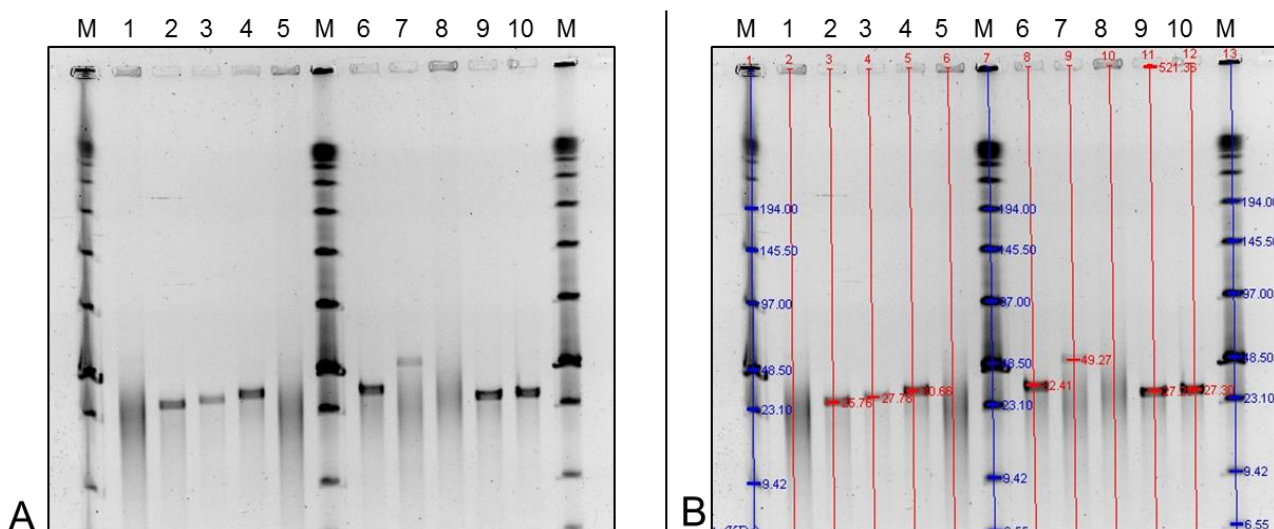


Abbildung 19 Pulsfeldgelelektrophorese der intakten genomischen DNA der zur Sequenzierung vorbereiteten Phagen P596 (1), P656 (2), P1532 (3), P4565 (4), P1048 (5), P1045 (6), P1046 (7), P1048 (8), P965 (9), P974 (10). Abbildung A stellt das Originalbild dar, Abb. B zeigt die Analyse mit GelComparII.

4.1.4 Sequenzierung der Phagengenome

Die reine, intakte genomische DNA der Phagen wurde zusammen mit den Daten zur Konzentration und den abgeschätzten Genom-größen an das „Danish National High-Throughput DNA Sequencing Centre“ (Universität Kopenhagen) verschickt (Tabelle 11) und dort sequenziert (Kapitel 3.3.7). für die beiden Phagen P596 und P1048 konnte anhand der PFGE keine Genomgröße abgeleitet werden, daher wurden die Genomgrößen der nächsten bekannten Verwandten verwendet (Tabelle 11, grüne Schrift). Die durch die Genomsequenzierung generierten Rohdaten konnten zu jeweils einer Sequenz für jeden Phagen assembliert werden (Tabelle 12). Bei den drei hitzeresistenten Phagen hat der Phage P656 das kleinste Genom mit einer Länge von 28.396 bp und der Phage P4565 das größte Genom mit einer Länge von 32.697 bp. Die Genome der beiden Phagen, die keine distinkte Bande in der PFGE zeigten lagen bei 57.909 bp (P5966) und 123.079 bp (P1048) (Tabelle 12).

Tabelle 11 Zur Sequenzierung vorbereitete Phagen-DNA. Der DNA Gehalt wurde mit dem NanoDrop 2000c bestimmt. Die Genomgröße wurde anhand der PFGE geschätzt (Abb. 19).

Phage	DNA-Gehalt (ng/µl)	Gesamt-DNA in 50 µl (ng)	Genomgröße (kb, geschätzt)
P1532	5,2	260	27
P4565	23,84	1192	30
P656	7,6	380	25
P596	25,52	1276	60
P1048	35,5	1776	115
P1045	27,6	1380	32
P1046	27,6	1365	50
P965	26	1300	27
P974	26	1300	27

4.1.5 Identifizierte offene Leseraster und Genkarten:

Mithilfe des Programms myRAST (Tabelle 3) wurden offene Leseraster identifiziert und direkt funktionell zugeordnet (annotiert). Die dabei resultierende Anzahl an orfs (*open reading frames*) ist in Tabelle 12 aufgelistet. Der Phage mit dem kleinsten Genom (965) verfügte demnach bei einer Genomgröße von 26657 bp über 38 ors. Der Phage P1048 mit dem größten Genom von 123023 bp und über 164 orfs.

Der bereits publizierte Vertreter der hitzeresistenten Phagen P680 weist eine Genomgröße von 29631 bp und 52 orfs auf. Die weiteren hitzeresistenten *L. lactis* Phagen schwankten in ihrer Anzahl an orfs zwischen 46 (P1532) und 55 (P4565) (Tabelle 12).

Tabelle 12 Ergebnisse der assemblierten und annotierten Sequenzen der neun untersuchten Phagen. Dargestellt sind die geschätzten und tatsächlichen Genomgrößen, die Anzahl der identifizierten orfs und die 2 nächsten Verwandten nach einer Blastn Untersuchung mit Coverage und Sequenzähnlichkeit. Der Phage P680 wurde nicht in dieser Arbeit sequenziert, da er jedoch zu den vier extrem hitzeresistenten Phagen gehört wird er hier mitaufgelistet.

Phage (Accession Nr.)	Genom- größe (kb) geschätzt	Genom- größe (bp)	Anzahl orf	Nächste Verwandten (nach BLAST)	Accession Nr.	Coverage / Ähnlichkeit (%)
P1532 (MN552148)	27	29075	46	P680	KC182551	81 / 95
				CaseusJM1	KC522412	82 / 93
P4565 (MN552150)	30	32697	55	P680	KC182551	72 / 95
				CB19	FJ848884	68 / 95
P656 (MN552149)	25	28396	47	jj50	DQ227764	73 / 93
				p2	GQ979703	72 / 93
P680	-	29631	52	P008	DQ054536	82 / 94
				PhiA.16	KP793102	79 / 95
P965 (MN552146)	27	26526	38	P793	KC013021	96 / 94
				phiLN03	KC013022	85 / 93
P974 (MN552147)	27	27942	39	phiLNTR3	KC013029	99 / 99
				phiLNTR2	KC013028	99 / 99
P596 (MN528768)	60	57909	80	P087	FJ429185	98 / 97
				LW33	KY554764	93 / 96
P1048 (MN552145)	115	123023	164	949	HM029250	78 / 94
				AM11	KY554775	84 / 94
P1045 (MN552144)	32	31050	51	58502	KX160209	97 / 99
				62502	KX160210	94 / 99
P1046 (MN552143)	50	54289	73	1706	EU081845	90 / 95

In Tabelle 12 sind zudem die nächsten Verwandten nach BLAST aufgelistet. Zwei der drei sequenzierten hitzeresistenten Phagen (P1532 und P4565) haben den ebenfalls hitzeresistenten Phagen P680 als nächsten Verwandten. Für die unbekannt Phagen P1045 und P1046 konnten nächste Verwandte mit hoher Sequenzähnlichkeit identifiziert werden und so den Phagengruppen P335 Untergruppe BM13 (P1045) und 1706 (P1046) zugeordnet werden.

Die Sequenzen der 9 sequenzierten Phagen wurden bei GenBank hinterlegt, die entsprechenden Accession-Nr. sind in Tabelle 12 aufgeführt.

4.2 *in-silico* Analysen der Mitglieder der seltenen Phagengruppen

Über einige, seltene Gruppen der *L. lactis* Phagen ist bisher wenig bekannt. Diese werden im folgenden Kapitel genauer betrachtet.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es für die beiden *L. lactis* Phagengruppen P087 und 949 jeweils nur eine publizierte Genomsequenz. Im Laufe der Arbeit wurden für beide Gruppen jedoch weitere Sequenzen veröffentlicht, die im Rahmen der Analysen berücksichtigt wurden. Die beiden in Zuge dieser Arbeit sequenzierten Phagen P596 (P087 Gruppe) und P1048 (949 Gruppe) wurden hinsichtlich ihrer Einordnung in der jeweiligen Phagengruppe mit den neu publizierten Sequenzen analysiert.

Der Phage P1046 wurde nach einer BLAST Analyse der Phagengruppe 1706 zugeordnet, für diese Gruppe gibt es zurzeit nur eine bekannte Sequenz. Auch der Phage P1045, der der P335 Untergruppe BM13 zugeordnet wurde (Tabelle 12), zählt zu den seltenen Phagen. Die Zuordnung dieser Phagen zu den jeweiligen Phagengruppen geschah jedoch erst nach der Sequenzierung, basierend auf ihrer Genomsequenz. Ausgewählt für die Sequenzierung wurden die beiden Phagen, da sie von einem Wirtsstamm freigesetzt wurden. Dieses untypische Ereignis sollte erklärt werden.

4.2.1 Analyse der Genomsequenz des Phagen P596 aus der Phagengruppe P087

Zu Beginn der Arbeit lag nur die publizierte Genomsequenz des Typphagen P087 vor. Bis 2018 stieg die Zahl der publizierten Genome der seltenen Phagengruppe P087 auf sieben an. Von diesen sind in Abb. 20 die konkatenierten AS-Sequenzen, zuzüglich des in dieser Arbeit sequenzierten Phagen P596 in einem phylogenetischen Dendrogramm dargestellt (Stand März 2018). Der Phage P596 ist als nächstes mit dem Typphagen P087 verwandt, mit dem er auch in Abb. 21 direkt verglichen dargestellt ist. Die beiden Phagen AM6 und AM7 sind sehr nah miteinander verwandt und bilden mit den beiden Phagen P087 und P596 ein Cluster. Neben diesem Cluster gibt es noch ein eng miteinander verwandtes Cluster, dass der Phagen LW31, LW32 und LW33. Der Phage LW4 clustert deutlich abseits der übrigen Phagen.

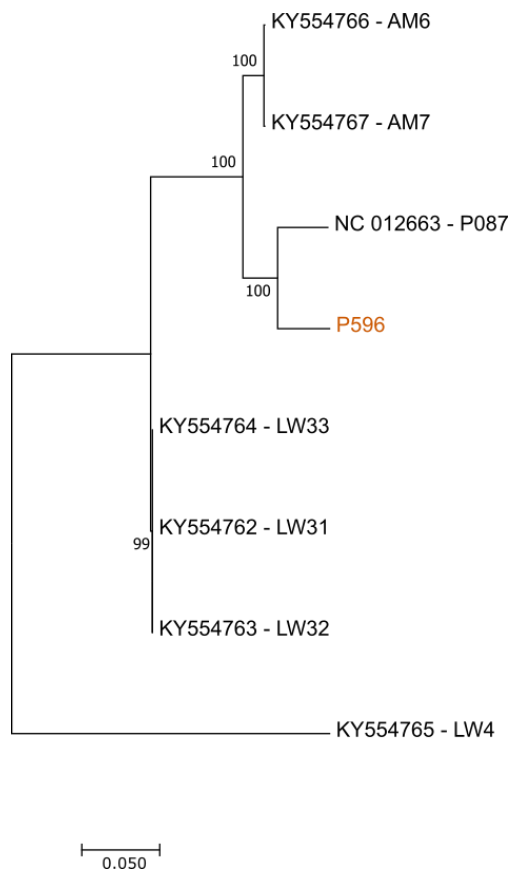


Abbildung 20 Stammbaum aller concatenierten AS-Sequenzen der P087 Phagengruppe. Der in dieser Arbeit sequenzierte Phage P596 ist orange markiert.

Im Anhang 2 sind die offenen Leseraster der Phagen P087 und P596 tabellarisch gelistet. Die beiden Phagengenome unterscheiden sich im Vorhandensein bzw. Fehlen von 12 offenen Leserastern. Dabei kommen beim Phagen P596 drei orfs vor, die dem Phagen P087 fehlen, umgekehrt sind es 9 orfs.

Bei diesen 12 orfs ist nur bei zweien eine Funktion zugeordnet. So verfügt der Phage P596 an Position 5012 über ein putatives Endonucleasegen, der Phage P087 dagegen verfügt an Position 11474 über ein putatives Methylasegen. Diese Unterschiede in den Genomen sind in Abb. 21 graphisch dargestellt, der Genomvergleich zeigt wenige Bereiche die nicht bei beiden Phagen vorkommen. Der überwiegende Teil zeigt jedoch eine hohe Sequenzähnlichkeit (dunkelblau).

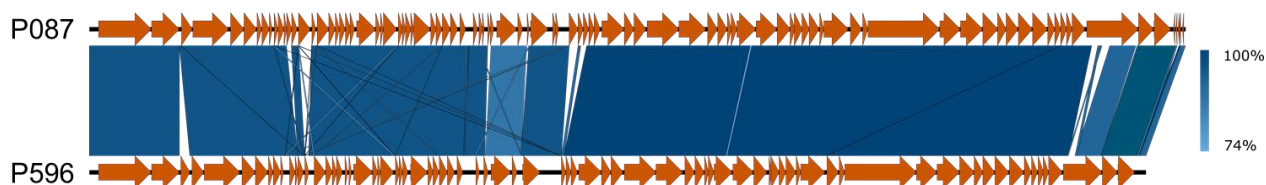


Abbildung 21 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P596 mit dem Typphagen P087, die blauen Bereiche sind Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit.

Die Rezeptorbindeproteine (RBP) der Phagengruppe P087 wurde genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz der RBP-Gene nur geringe Abweichungen aufzeigt (Abb. 22).

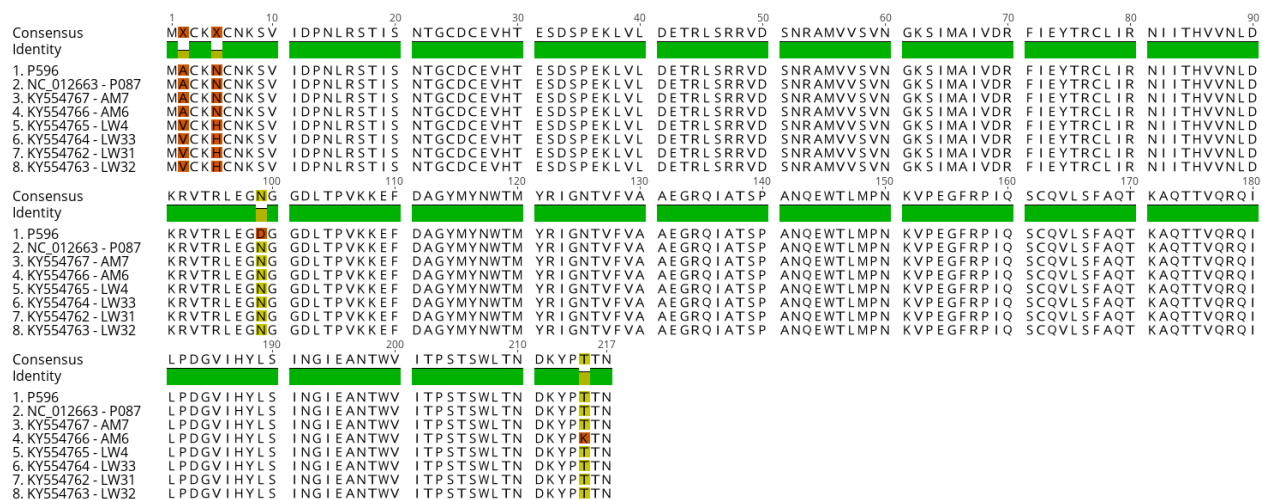


Abbildung 22 Alignment der Aminosäuresequenz der Rezeptor-Binde-Proteine der P087 Phagengruppe. Markiert sind AS die nicht bei allen Vertretern gleich sind.

4.2.2 Analyse der Genomsequenz des Phagen P1048 aus der Phagengruppe 949

Zu Beginn der Arbeit lag nur eine publizierte Genomsequenz der Phagengruppe 949 vor, die des Namensgebers der Gruppe, des Phagen 949. Im Jahr 2015 umfassten die Datenbanken 3 publizierte Genomsequenzen (Abb. 24). Im März 2018 waren es bereits 13 Phagengenome der 949 Phagengruppe. Der kleinste Phage der Gruppe, der Phage 949, hat ein Genom mit einer Länge von 114.768 Basenpaaren (bp) und 154 orfs. Der größte Phage der Gruppe, der Phage AM4, hat ein Genom mit einer Länge von 132.949 bp und 197 orfs. Die Gruppe ist im Bereich der Strukturproteine stark homolog (Abb. 24, unterhalb der schwarzen Linie, dargestellt für drei Phagen im Vergleich mit dem Phagen P1048) die anderen Bereiche des Genoms variieren deutlich (Abb. 24).

Ein Vergleich der konkatenierten AS-Sequenzen aller bekannten Vertreter der 949 Phagengruppe ist in Abb. 23 in einem Phylogramm dargestellt. Die Phagen AM1, AM2, AM3, AM8, AM9, AM11 und AM12 liegen sehr nah in einem Cluster, der Phage LW81 liegt etwas abseits dieses Clusters. Die Phagen AM4 und AM5 liegen ebenfalls in einem

sehr nah verwandten Cluster. Der nächste Verwandte zum Phagen P1048 scheint der Typphage 949 zu sein. Die Phagen WRP3 und phiL47 bilden ein weiteres Cluster. Die offenen Leseraster des Phagen P1048 und des nächsten Verwandten nach BLAST, dem Typphagen 949, sind in Anhang 3 tabellarisch gelistet. Die beiden Phagengenome unterscheiden sich im Vorhandensein bzw. Fehlen von insgesamt 73 orfs. Davon verfügt der Phage P1048 über 46 orfs, die dem Phagen P1048 fehlen und umgekehrt sind es 27 orfs.

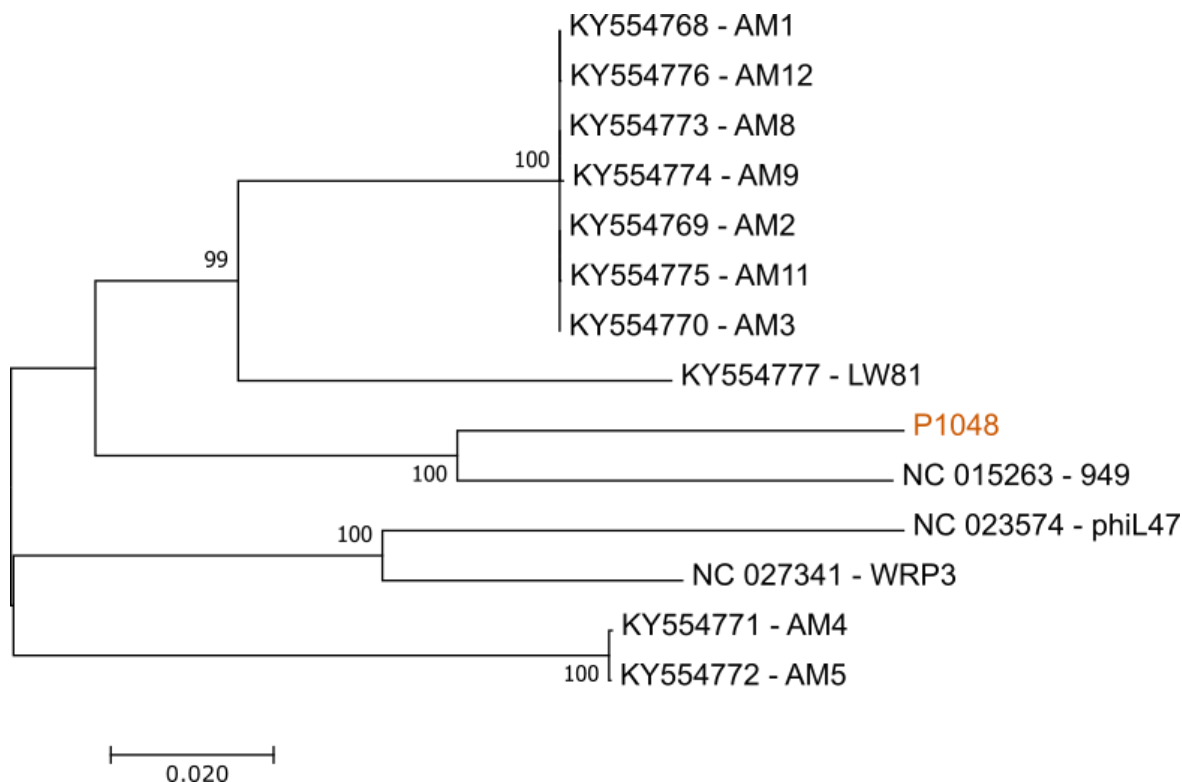


Abbildung 23 Stammbaum aller konkatenierten AS-Sequenzen der 949 Phagengruppe. Der in dieser Arbeit sequenzierte Phage P1048 ist orange markiert.

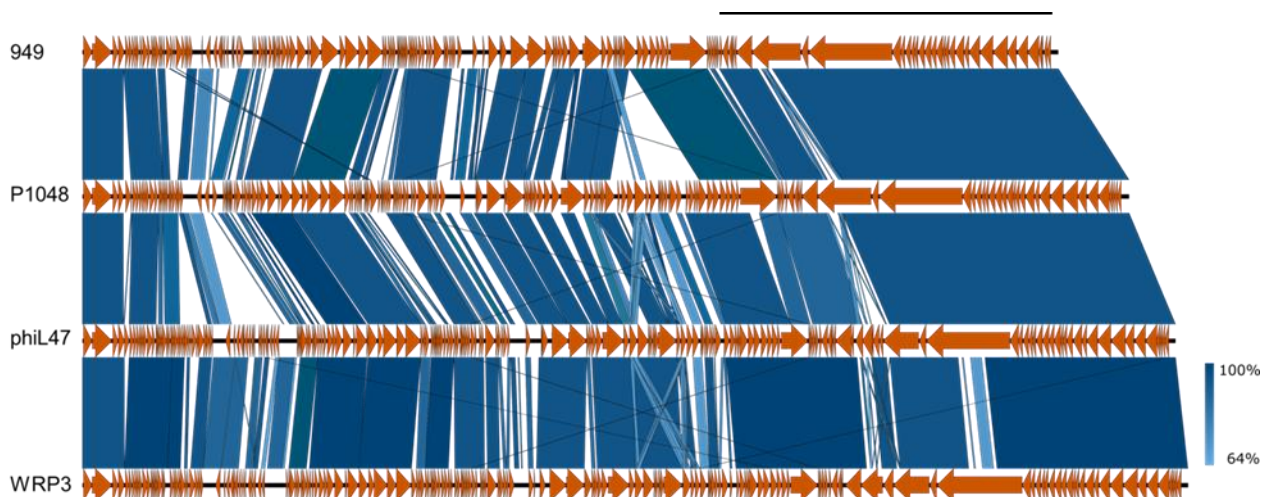


Abbildung 24 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P1048 mit dem Typphagen 949 und den beiden weiteren 949 Phagen phiL47 und WRP3, die blauen Bereiche sind Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit. Der Bereich unterhalb der schwarzen Linie codiert hauptsächlich für Strukturproteine.

Die Rezeptorbindeproteine (RBP) der Phagengruppe 949 wurden genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz der RBP-Gene deutliche Abweichungen aufweist. In Abb. 25 ist die Ähnlichkeit der AS-Sequenzen der *rbp*-Gene dargestellt. Bei den Phagen AM1, AM2, AM3, AM8, AM9, AM11 und AM12 sind die AS-Sequenzen identisch. Ebenfalls identische AS-Sequenzen des RBP haben die beiden Phagen AM4 und AM5. Über 99 % Ähnlichkeit haben die Sequenzen der Phagen phiL47 und WRP3 zueinander. Der Phage P1048 zeigt zu seinem nächsten Verwandten, dem Phagen 949, eine AS-Sequenzähnlichkeit von über 87 %.

Ein Alignment der AS-Sequenzen der RBP zeigt, dass die größten Variationen zwischen den Phagen im Bereich des C-terminalen Ende der Sequenzen liegen (Abb. 26).

	KY554777 - LW81	KY554773 - AM8	KY554770 - AM3	KY554776 - AM12	KY554768 - AM1	KY554769 - AM2	KY554774 - AM9	KY554775 - AM11	KY554771 - AM4	KY554772 - AM5	NC_023574 - phil47	NC_027341 - WRP3	P1048	NC_015263 - 949
KY554777 - LW81	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%	75.08%
KY554773 - AM8	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554770 - AM3	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554776 - AM12	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554768 - AM1	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554769 - AM2	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554774 - AM9	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554775 - AM11	75.08%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
KY554771 - AM4	76.08%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%
KY554772 - AM5	76.08%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	89.84%	100%	93.61%	93.61%	93.28%	77.58%	76.10%
NC_023574 - phil47	74.75%	88.85%	88.85%	88.85%	88.85%	88.85%	88.85%	88.85%	93.61%	93.61%	93.28%	99.02%	75.78%	74.96%
NC_027341 - WRP3	75.08%	89.18%	89.18%	89.18%	89.18%	89.18%	89.18%	89.18%	93.28%	93.28%	99.02%	75.78%	74.96%	75.08%
P1048	66.50%	78.89%	78.89%	78.89%	78.89%	78.89%	78.89%	78.89%	77.58%	75.78%	75.78%	75.78%	75.78%	87.89%
NC_015263 - 949	64.34%	75.61%	75.61%	75.61%	75.61%	75.61%	75.61%	75.61%	76.10%	76.10%	74.96%	87.89%	74.96%	64.34%

Abbildung 25 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des RBP der Vertreter der 949 Phagegruppe.

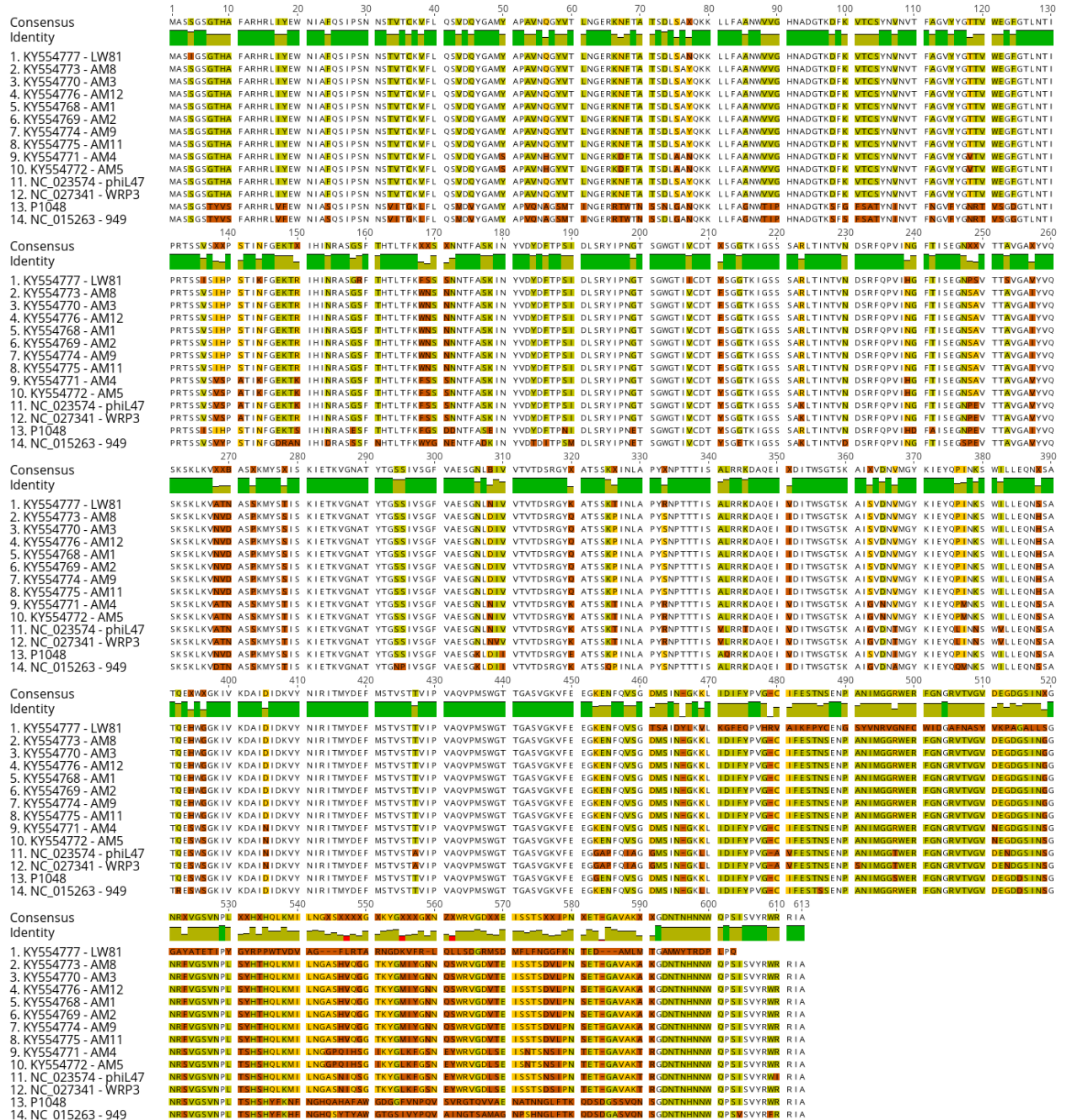


Abbildung 26 Alignment der Aminosäuresequenz der Rezeptor-Binde-Proteine der 949 Phagengruppe. Markiert sind AS die nicht bei allen Vertretern gleich sind.

4.2.3 Phagen P1045 und P1046

Untypischerweise wurden die beiden Phagen P1045 und P1046 in Voruntersuchungen nach Induktion mit Mitomycin C im Überstand desselben Stamms detektiert (siehe Kapitel 2, Zielsetzung, Tabelle 4). Beide Phagen wurden im Überstand elektronenmikroskopisch nachgewiesen und zeigten eine heterogene Morphologie auf. Zwar gehören beide Phagen zu den *Siphoviridae*-Phagen und verfügen somit über isodiametrische Köpfe, sie unterscheiden sich jedoch im Durchmesser der Köpfe (Tabelle 9) sowie in der Schwanzlänge. Der Phage P1045 verfügt über einen kurzen Schwanz (Kurztailphage) mit 125 nm (Abb. 17 D, Tabelle 9) und der Phage P1046 über einen langen Schwanz (Langtailphage) mit 320 nm (Abb. 17 E, Tabelle 9).

Nach der Annotation der sequenzierten Phagengenome konnten die beiden Phagen unterschiedlichen Phagengruppen zugeordnet werden. Der Kurztailphage P1045 zeigt hohe Verwandtschaft zur BM13 Untergruppe der P335 Phagengruppe, während der Langtailphage P1046 der Phagengruppe 1706 angehört (Tabelle 11).

In Abb. 27 (P1046) und 28 (P1045) sind die annotierten Genomsequenzen der beiden Phagen mit den nächsten Verwandten dargestellt. Der Phage P1046 trägt Teile eines Lysogeniemoduls im Genom, in Form eines putativen Gens, welches einen Repressor codiert. Dieses wurde beim nächsten Verwandten 1706 gefunden. Der Phage P1046 zeigt hier starke Homologien, jedoch liegen in diesem Bereich zwei orfs vor (Abb. 27, gelbe Pfeile). Im Genom des Phagen P1045 dagegen lassen sich keine Anzeichen für ein Lysogeniemodul detektieren.

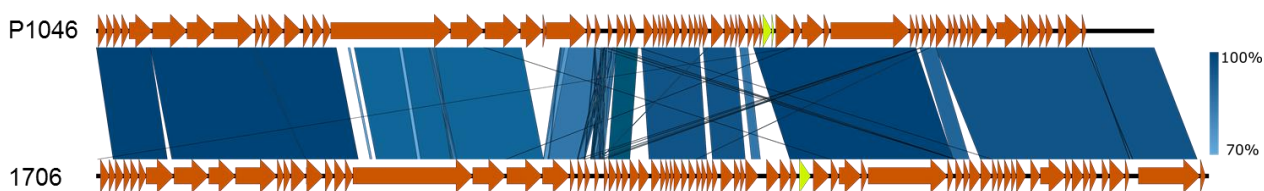


Abbildung 27 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P1046 mit dem nächsten Verwandten nach BLAST Phage 1706, die blauen Bereiche sind Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit. Gelb markiert sind die orfs die potentiell für einen Repressor codieren.

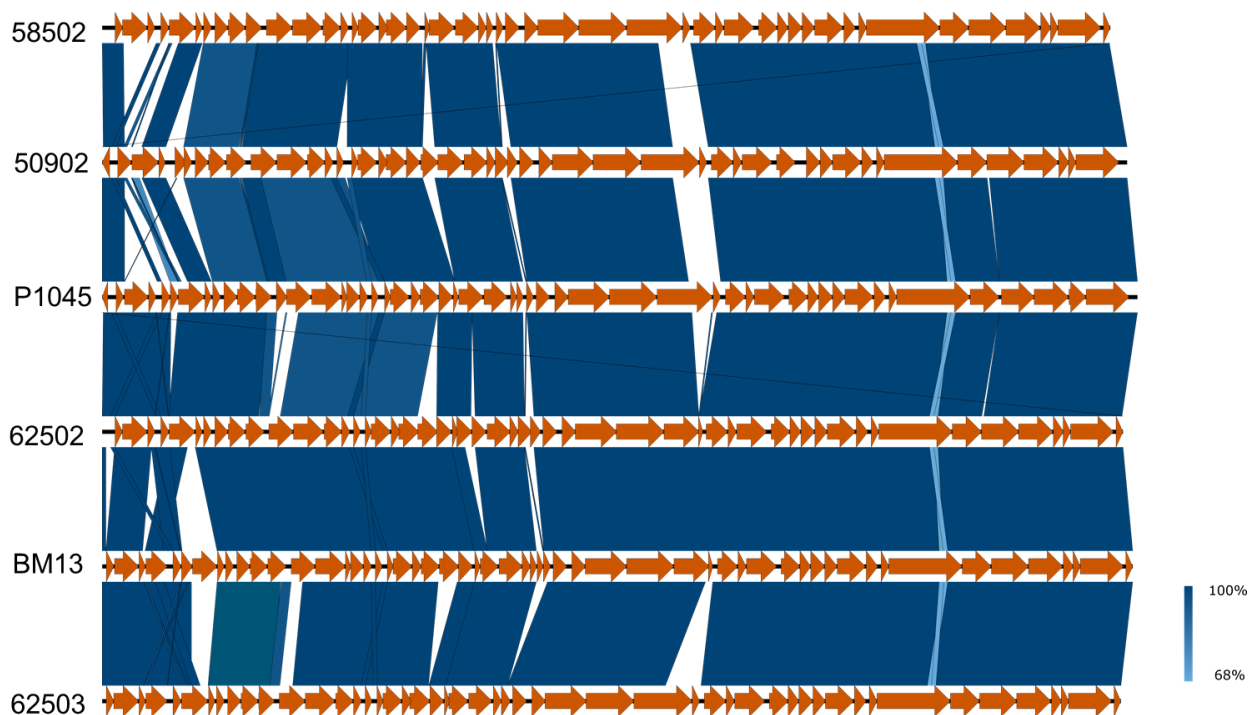
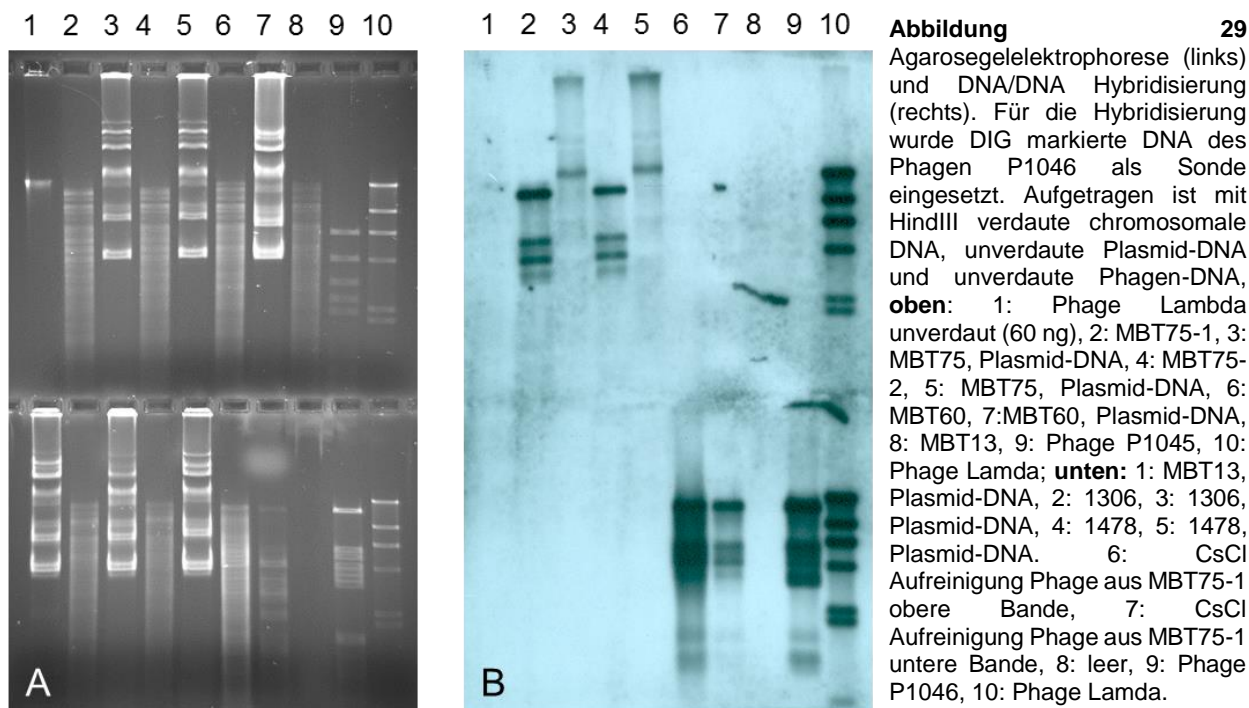


Abbildung 28 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P1045 mit den Mitgliedern der nach BLAST am nächsten verwandte Phagengruppe P335, Untergruppe BM13. Die blauen Bereiche sind Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit.

Durch Hybridisierungsversuche sollte geklärt werden, ob sich die DNA beider Phagen in der Wirtszelle befindet. Dazu wurde die verdaute und DIG markierte DNA der beiden Phagen als Sonde eingesetzt.

Aufgetragen wurde beim Einsatz der beiden Sonden neben einem Standard (Lambda DNA, HindIII verdaut), jeweils die chromosomale DNA des Wirtsstamms (Laborstamm A) in Doppelbestimmung, die Plasmidfraktion des Wirtsstamms, der Laborstamm zur Anzucht der beiden Phagen (MBT60), weitere Laborstämme die durch die beiden Phagen infiziert werden können (MBT13, 1306, 1478) und über CsCl aufgereinigte Phagen-DNA aus der Induktion des Ursprungstamms.

Zudem wurden beide Sonden auch bei beiden Phagen eingesetzt, so dass die beiden Phagen zusammen positiv und negativ Kontrolle für die entsprechenden Sonden darstellten. Die chromosomale DNA der verschiedenen Stämme wurde vor Auftragen auf das Gel mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Die Plasmidfraktion wurde unverdaut aufgetragen.



Während auf dem Gelbild (Abb. 29 A; Anhang 4 A) Restriktionsmuster aller Proben zu erkennen sind, sind bei den Ergebnissen der DNA-DNA Hybridisierung (Abb. 29 B, Anhang 4 B) nur wenige Signale zu erkennen.

Beim Einsatz der P1045-Sonde zeigen sich neben der Markerbande lediglich bei der Positivkontrolle, dem Phagen P1045 selbst, Signale (Anhang 4 B).

Beim Einsatz des Phagen P1046 als Sonde zeigten sich positive Hybridisierungssignale mit dem Ursprungstamm A (Abb. 29 oben, Spuren 2 und 4) und mit der Plasmidfraktion des Ursprungstammes A (Abb. 29 oben, Spuren 3 und 5). Auch die, über einen CsCl Gradienten aufgereinigten Phagenpräparate hybridisierten mit der Sonde (Abb. 29 unten, Spuren 6 und 7).

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurde der Ursprungstamm MBT75 und der Laborstamm MBT60 auf einem Illumina MiSeq Hochdurchsatzsequenzierer sequenziert, anschließend assembliert und annotiert. Für den Ursprungstamm MBT75 sind die ersten 15 contigs mit Größe und Coverage in Tabelle 13 dargestellt. Contig 11 (Tabelle 13, rot) wies eine 10mal höhere Coverage als die restlichen Contigs auf.

Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit den Genomsequenzen der beiden Phagen P1046 und P1045 mit dem Programm Mauve aligned (Abb. 30) und zudem auf der online Plattform PHASTER (Tabelle 3) analysiert.

Während der Phage P1045 keine größeren homologen Bereiche mit den beiden Wirtsstämmen aufzeigte, war der Phage P1046 über seine gesamte Genomlänge sehr ähnlich zu einem Teil des Wirtsstamms MBT75 (Abb. 30, roter Kreis). Die Analyse der Plattform PHASTER zeigte zudem für den Stamm MBT75 einen vollständigen Prophagen im Genom. Die blauen Pfeile in Abb. 31 markieren die relevanten Informationen: der Prophage wird von der Plattform PHASTER als intakter Prophage identifiziert; dieser liegt auf einem einzelnen Contig, dem Contig 11 (Node 11); es konnte keine für Prophagen typische Attachment Site gefunden werden.

Tabelle 13 Coverage der 15 größten Contigs des *L. lactis* Stamms MBT75. Contig 11 (rote Schrift) wich am stärksten ab.

contig	Länge (bp)	Coverage ~
1	289029	107
2	267690	111
3	208922	112
4	176866	110
5	144439	111
6	101905	102
7	95537	121
8	89596	114
9	80192	110
10	56585	102
11	54707	1368
12	53075	107
13	52594	102
14	48565	114
15	48346	105

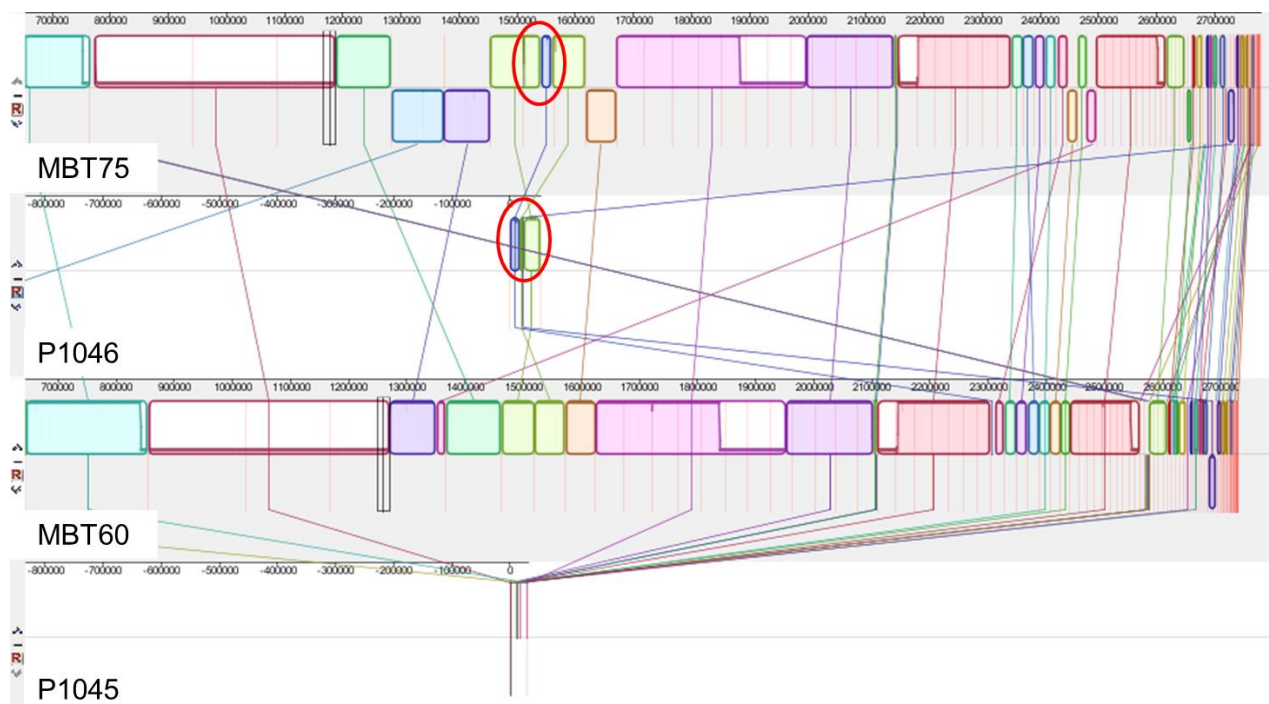


Abbildung 30 Ausschnitt des Alignments der Phagen P1045 und P1046 mit den aneinandergereihten *contigs* der beiden *L. lactis* Stämmen MBT75 und MBT60. Die mit einem roten Kreis hervorgehobenen Regionen weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen Phage und Wirtsstamm auf.

Region Details	
Region	4
Region Length	52.3Kb
Completeness(score)	intact(126) ←
Specific Keyword	terminase,portal,capsid,tail
Region Position	NODE_11_length_54707_cov_570.127-1-52312 ←
# tRNA	1
# Total Proteins	69
# Phage Hit Proteins	65
# Hypothetical Proteins	4
Phage + Hypothetical Protein %	100%
# Bacterial Proteins	0
Attachment Site	no ←
# Phage Species	2

Abbildung 31 Ausschnitt des Ergebnisses für das Contig 11 des *L. lactis* Stamms MBT75 durch das Programm PHASTER (Tabelle 3). Die blauen Pfeile markieren für dieses contig relevante Information über Intaktheit und Länge des Prophagen und ob eine *attachment site* gefunden wurde.

Das so identifizierte Prophagen Contig 11 wurde mit dem Programm Mauve mit dem sequenzierten Phagengenom verglichen (Abb. 32). Bis auf eine kleine Region (Abb. 32, blaue Markierung) sind die beiden Sequenzen nahezu identisch.

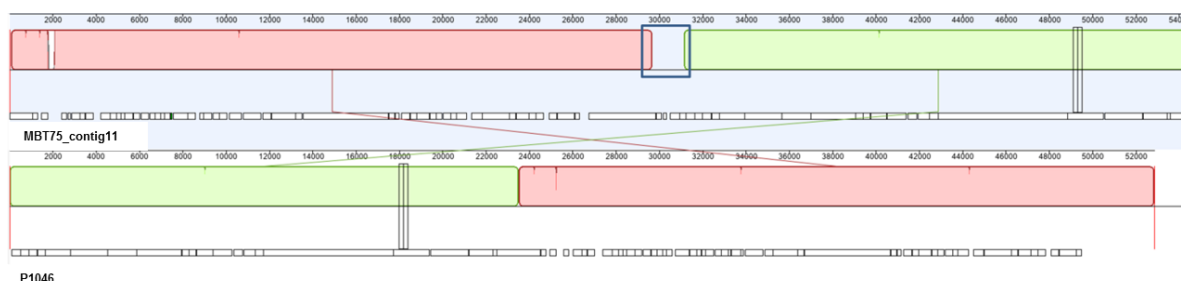


Abbildung 32 Alignment des Phagen P1046 mit dem vollständigen contig 11 des Assemblys des *L. lactis* Stamms MBT75. Der blaue Rahmen markiert einen größeren Unterschied zwischen den beiden Sequenzen.

Für die folgenden Analysen wurde die Sequenz des Contig 11 so modifiziert, dass sie mit demselben Protein wie die Sequenz des Phagen P1046 anfängt. So konnte der Bereich des potentiellen Antirepressor-Gens (Abb. 25, gelbe Annotationen) zwischen Contig 11 und P1046 verglichen werden (Abb. 33). Dabei zeigte sich im Contig 11 nur ein orf, während die Sequenz des Phagen P1046 zwei orfs aufweist. In Abb. 33 ist der Bereich in dem sich beide Sequenzen unterscheiden rot markiert. Der Unterschied einer Base führt zu einem entstehenden Stoppcodon beim Phagen P1046, das nächste Basentriplett ist dann TTG, welches einem weiteren potentiellen Startcodon entspricht und damit zu zwei orfs führt.

4.3 *in silico* Analysen zur Hitzeresistenz der 936 Phagen

Im folgenden Abschnitt werden die Genome der in dieser Arbeit sequenzierten, hitzeresistenten Phagen der 936 Phagengruppe (P1532, P656, P4565 und der bereits sequenzierte Phage P680) betrachtet und zudem die Genomsequenzen von drei weiteren hitzeresistenten Phagen, den *L. lactis* Phagen P956, P959 und P983 (Wagner *et al.*, 2017)) berücksichtigt. Diese wurden im Zeitraum dieser Arbeit sequenziert. Die assemblierten und annotierten Genome der hitzeresistenten Phagen werden genauer mit vorhandenen Genomsequenzen der 936 Phagengruppe analysiert. Dadurch sollte die Frage geklärt werden, ob es auf Genom- bzw. Aminosäureebene einen Hinweis auf die Hitzeresistenz dieser Phagen gibt.

4.3.1 Vergleichende Sequenzanalysen

Die Genomsequenz des Phagen P680 wurde im Jahr 2013 publiziert (Mahony *et al.* (2013a))(AccessionNr. KC182551). Diese Sequenz wurde zusammen mit den Genomsequenzen der drei weiteren hitzeresistenten 936 Phagen mit den publizierten Vertretern der 936 Gruppe verglichen. Dazu wurden insgesamt 99 Genome der 936 Phagengruppe von der NCBI Datenbank heruntergeladen. Mit den Programmen Geneious und MEGA7 wurden Alignments und Stammbäume erstellt. Der Stammbaum in den Abb. 33 und 34 zeigt den Verwandtschaftsgrad von insgesamt 112 Phagen der Phagengruppe 936. Im Stammbaum wurden nur die identifizierten codierenden Bereiche miteinander verglichen. Das entstandene phylogenetische Dendrogramm wird aufgrund der Größe in zwei Teilen dargestellt (Abb. 35 und 36). Die vier hitzeresistenten Phagen P1532, P680, P656 und P4565 sind ebenso wie die 3 weiteren hitzeresistenten Phagen P959, P956 und 959 der 936 Phagengruppe orange gekennzeichnet. Insgesamt wurden 17695 Positionen durch das Programm MEGA7 für die Analysen berücksichtigt.

Das entstandene Dendrogramm trennt sich zu Beginn bereits in zwei große Cluster, die in Abb. 35 und 36 aufgeteilt sind. In beiden Cluster liegen weitere verzweigte Cluster. Die vier hitzeresistenten Vertreter P680, P1532, P4565 und P656 liegen über die Cluster verteilt. Der Phage P680 liegt mit den Phagen P956, 959 und P983 in einem Cluster. In

diesem Cluster sind die Verwandtschaftsbeziehungen nicht sehr eng, wie die Heatmap in Abb. 37 zeigt. Hier liegt die Ähnlichkeit zwischen dem Phagen P680 und den im Cluster am nächsten bei ihm liegenden Phagen P983 (Abb. 36) bei ca. 80 %. Der ebenfalls hitzeresistente Phage P956, der auch in diesem Cluster liegt, verfügt über knapp 74 % Sequenzübereinstimmung auf AS-Level. Die beiden Phagen P1532 und P4565 liegen im zweiten großen Cluster des Stammbaums, der sich über die Abb. 35 und 36 erstreckt. Einige der dargestellten Phagen in den Abb. 35 und 36 bilden sehr homogene Cluster und werden in weiteren Analysen zu den in den Abb. 35 und 36 beschriebenen, mit blauen Klammern markierten, Clustern zusammengefasst.

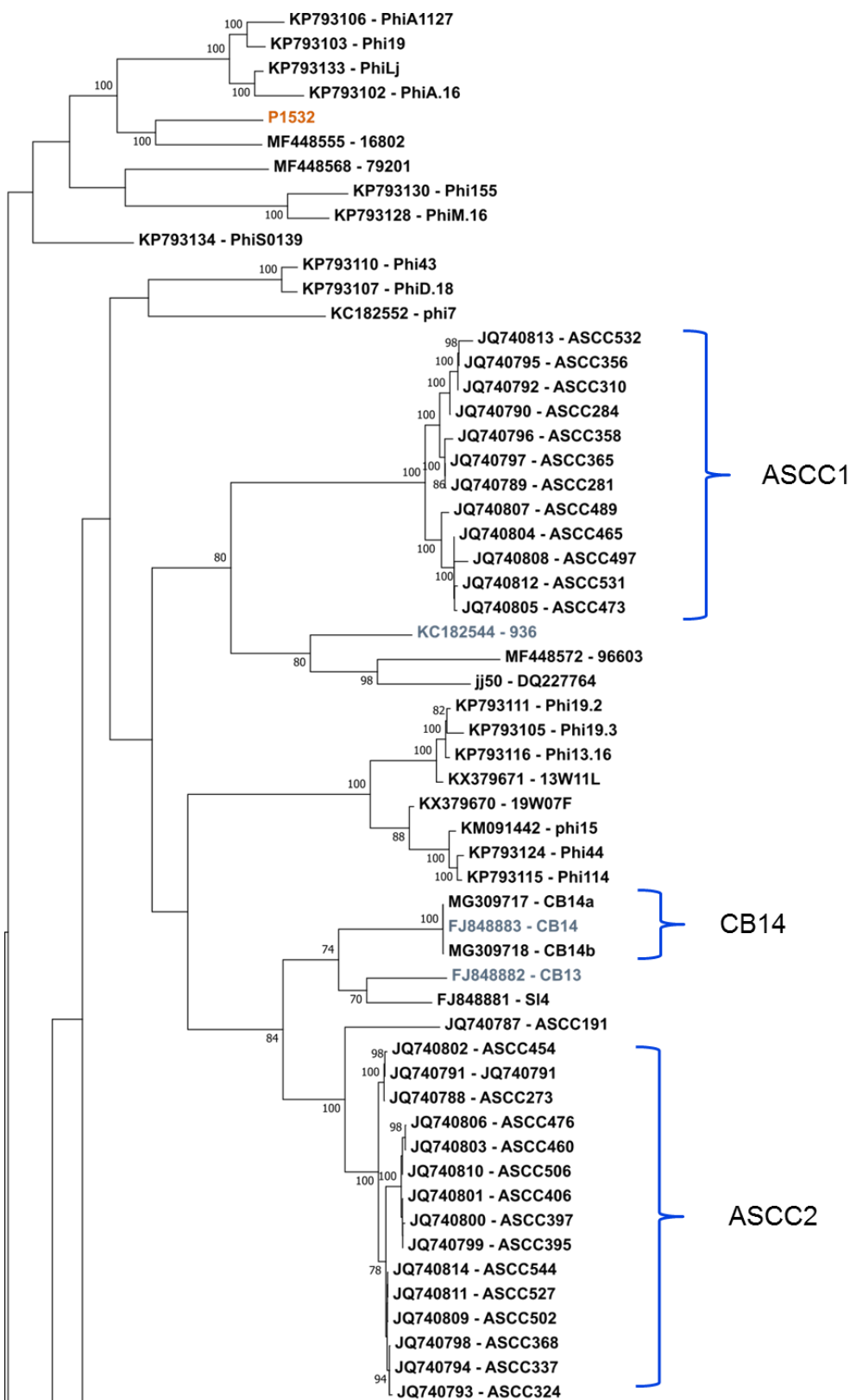


Abbildung 35 Teil 1 des phylogenetischen Stammbaumes der concatenierten Proteinsequenzen von 112 bekannten Genomsequenzen der Phagengruppe 936. Blaue Klammern markieren Gruppen von Phagensequenzen mit hoher Sequenzähnlichkeit. Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, Phagen die im Folgenden genauer verglichen wurden sind in blauer Schrift.

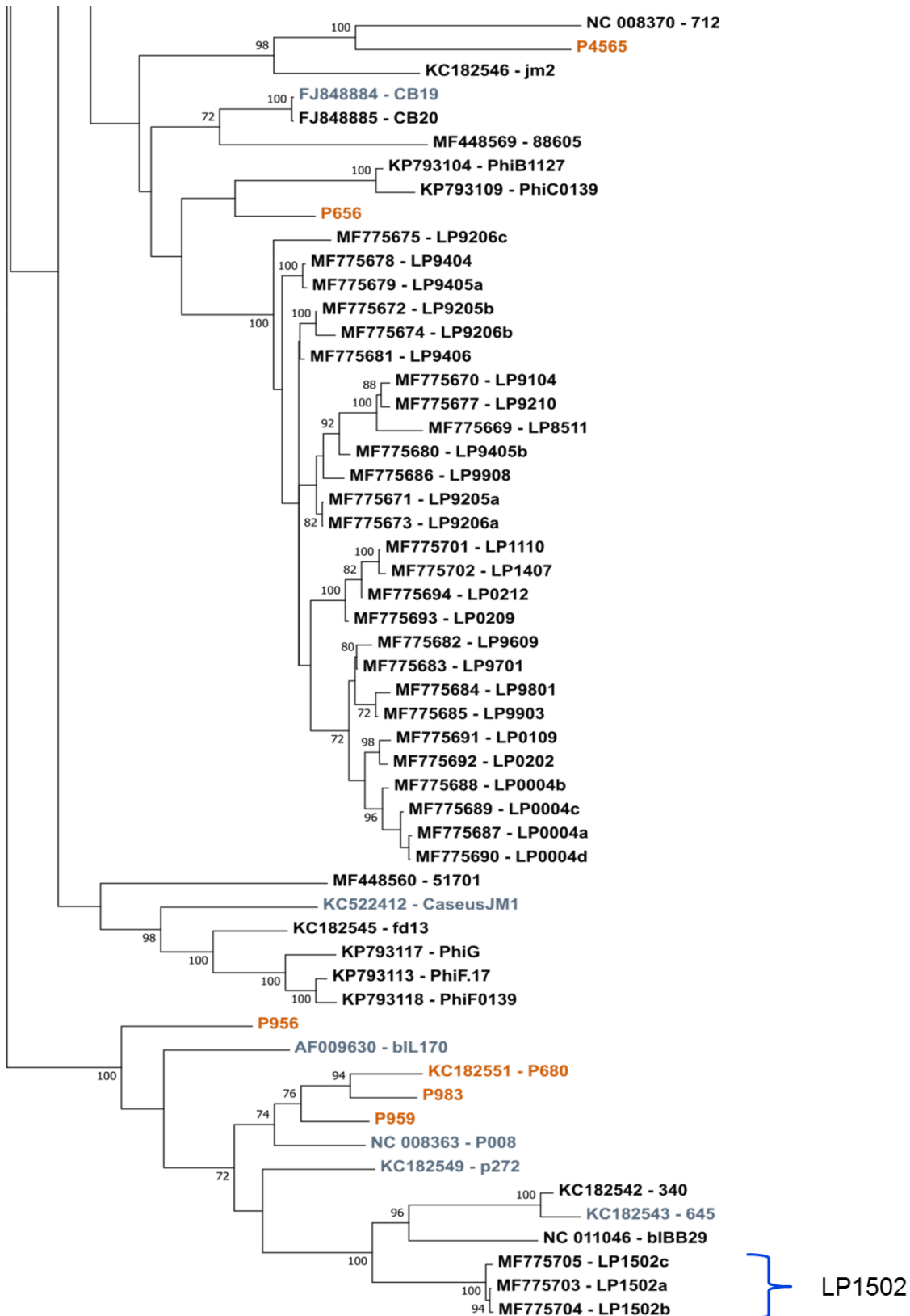


Abbildung 36 Teil 2 des phylogenetischen Stammbaumes der konkatenierten Proteinsequenzen von 112 bekannten Genomsequenzen der Phagengruppe 936. Blaue Klammern markieren Gruppen von Phagensequenzen mit hoher Sequenzähnlichkeit. Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, Phagen die im Folgenden genauer verglichen wurden sind in blauer Schrift.

	P1532	P656	P680	P4565	P983	P959	P956	P008	p272	645	CB19	bil170	CB14	CB13
P1532		69.99%	70.87%	62.96%	70.92%	68.67%	57.67%	60.00%	56.61%	59.82%	68.94%	62.56%	63.81%	64.13%
P656	69.99%		69.75%	65.05%	63.55%	68.78%	65.93%	67.08%	64.28%	60.45%	69.56%	58.01%	66.82%	65.23%
P680	70.87%	69.75%		63.44%	80.53%	80.59%	73.89%	71.36%	72.00%	68.73%	70.46%	71.96%	66.94%	65.26%
P4565	62.96%	65.05%	63.44%		58.35%	58.35%	65.25%	58.88%	61.42%	58.25%	64.92%	56.23%	62.37%	60.67%
P983	70.92%	63.55%	80.53%	58.35%		75.17%	67.45%	65.08%	65.04%	64.49%	64.26%	70.28%	61.04%	63.16%
P959	68.67%	68.78%	80.59%	65.25%	75.17%		68.97%	69.18%	68.14%	69.28%	74.75%	69.66%	69.55%	65.64%
P956	57.67%	65.93%	73.89%	58.88%	67.45%	68.97%		73.98%	79.27%	62.84%	63.24%	65.26%	62.22%	58.14%
P008	60.00%	67.08%	71.36%	61.42%	65.08%	69.18%	73.98%		72.91%	62.46%	65.84%	74.79%	64.47%	58.83%
p272	56.61%	64.28%	72.00%	58.25%	65.04%	68.14%	79.27%	72.91%		64.73%	63.03%	69.88%	63.22%	57.16%
645	59.82%	60.45%	68.73%	56.01%	64.49%	69.28%	62.84%	62.46%	64.73%		66.37%	65.72%	65.04%	59.00%
CB19	68.94%	69.56%	70.46%	64.92%	64.26%	74.75%	63.24%	65.84%	63.03%	66.37%		67.76%	87.78%	70.28%
bil170	62.56%	58.01%	71.96%	56.23%	70.28%	69.66%	65.26%	74.79%	69.88%	65.72%	67.76%		65.60%	60.70%
CB14	63.81%	66.82%	66.94%	62.37%	61.04%	69.55%	62.22%	64.47%	63.22%	65.04%	87.78%	65.60%		76.33%
CB13	64.13%	65.23%	65.26%	60.67%	63.16%	65.64%	58.14%	58.83%	57.16%	59.00%	70.28%	60.70%	76.33%	

Abbildung 37 Prozentuale Ähnlichkeiten der konkatenierten AS-Sequenz aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen. Die blauen Kästen markieren Phagen, die in Abb. 36 in einem Cluster liegen, der gelbe Kasten markiert die prozentuelle Ähnlichkeit dieser Phagen mit dem hitzeresistenten Phagen P680.

Bei einem schematischen Vergleich der Genomkarten der hitzeresistenten Phagen mit dem schematischen, typischen Aufbau eines 936 Phagen-genoms (Abb. 8, (Mahony *et al.* 2012)) zeigten alle 4 hitzeresistenten Phagen konservierte Genomkarten (Abb. 38). Es ließen sich allerdings auch Unterschiede identifizieren. Dem hitzeresistenten Phagen P656 fehlt zum Beispiel das Gen, welches die „Neck Passage Structure“ (NPS) codiert (Kragenstruktur unter dem Phagenkopf; in Abb. 38 grün markiert).

Elektronenmikroskopisch konnten die NPS-Phagenstrukturproteine der 3 übrigen Phagen bestätigt werden (Abb. 39), lediglich beim Phagen P656, dem das Gen fehlt, war diese nicht nachzuweisen.

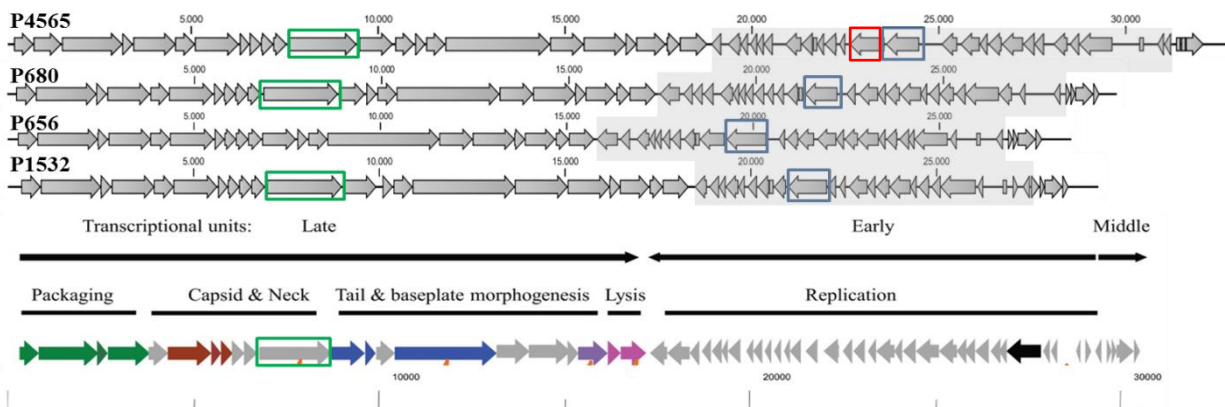


Abbildung 38 Schematische Übersicht der Genome der hitzeresistenten *L. lactis* Phagen im Vergleich mit einer schematischen Darstellung eines typischen 936-Phagen (modifiziert nach Mahony *et al.* 2012). Das die „Neck Passage Structure“ (NPS) codierende Gen ist grün und das nur in wenigen 936 Genomen identifizierte Gen im Replikationsmodul ist blau umrandet. Beim Phagen P4565 liegt dieses Gen doppelt vor (rote Umrandung).

Weitere vergleichende Sequenzanalysen (Software Mauve) ergaben, dass alle 4 Phagen Genome ein spezifisches Gen, dessen Funktion zum Zeitpunkt der Analysen nicht bekannt war, aufwiesen. Dieses liegt an zentraler Stelle im Bereich der „frühen Gene“, dem Replikationsmodul (Abb. 38 und Abb. 40, jeweils blau markiert). Beim Phagen P4565 lag dieses Gen zudem 2-mal vor (Abb. 38, rot markiert). Neben diesen vier Phagen konnte das Gen zunächst nur in wenigen weiteren Phagen Genomen identifiziert werden (Phagen: fd13 (Mahony *et al.*, 2013a), CaseusJM1 (Murphy *et al.*, 2014), CB13 (Rousseau und Moineau, 2009) und ASCC191-verwandte Phagen aus Australien (Castro-Nallar *et al.*, 2012)). Diese Region wurde daher als potentielle Zielregion für ein spezifisches Nachweissystem für die hitzeresistenten Phagen genauer analysiert (siehe Kapitel 4.4.4).

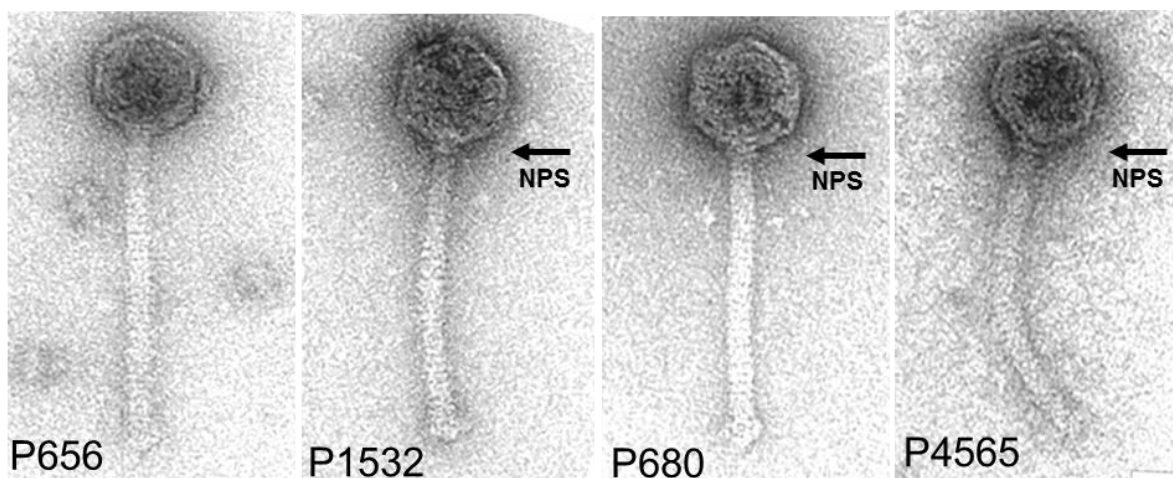


Abbildung 39 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der hitzeresistenten *L. lactis* Phagen. Der Pfeil markiert die „Neck Passage Structure“ (NPS) Strukturproteine.

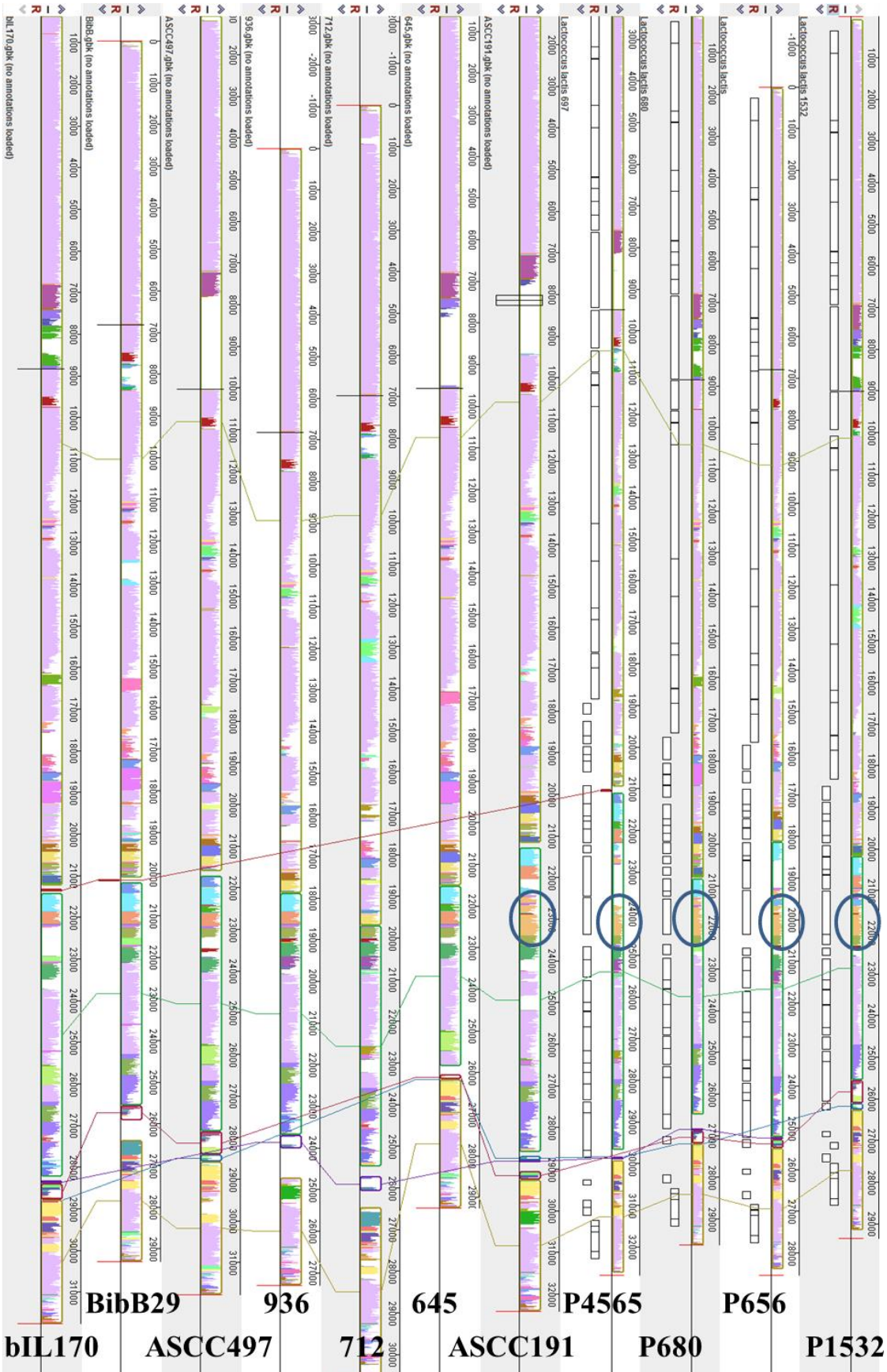


Abbildung 40 Vergleich von ausgewählten Mitgliedern der *Lactococcus lactis* 936 Phagengruppe. Die unterschiedlichen Farben zeigen homologe Regionen unter den Phagen. Die in Lila gekennzeichneten DNA-Regionen sind in allen verglichenen Sequenzen konserviert. Der blau markierte Bereich kommt nur in wenigen Phagen vor.

4.3.2 *in silico* Vergleich der Strukturproteine

Mit dem Ziel herauszufinden, ob die Genome der hitzeresistenten Phagen der 936 Phagengruppe einen Hinweis auf den Ursprung der Hitzeresistenz liefern, wurden verschiedene Strukturproteine analysiert.

Für die Gene, die die Strukturproteine „*tape measure protein*“ (tmp), „*major capsid protein*“ (mcp), „*receptor binding protein*“ (RBP) und das „*phage portal protein*“ codieren, wurden die Isoelektrischen Punkte (IEP) der vier hitzeresistenten Phagen mit einer Auswahl der publizierten Phagengenome der 936 Phagengruppe miteinander verglichen. Zum Vergleich der Oberflächenladungen wurden die isoelektrischen Punkte (IEP) der Aminosäuresequenzen mit dem online Tool PROTEIN CALCULATOR v3.4 berechnet

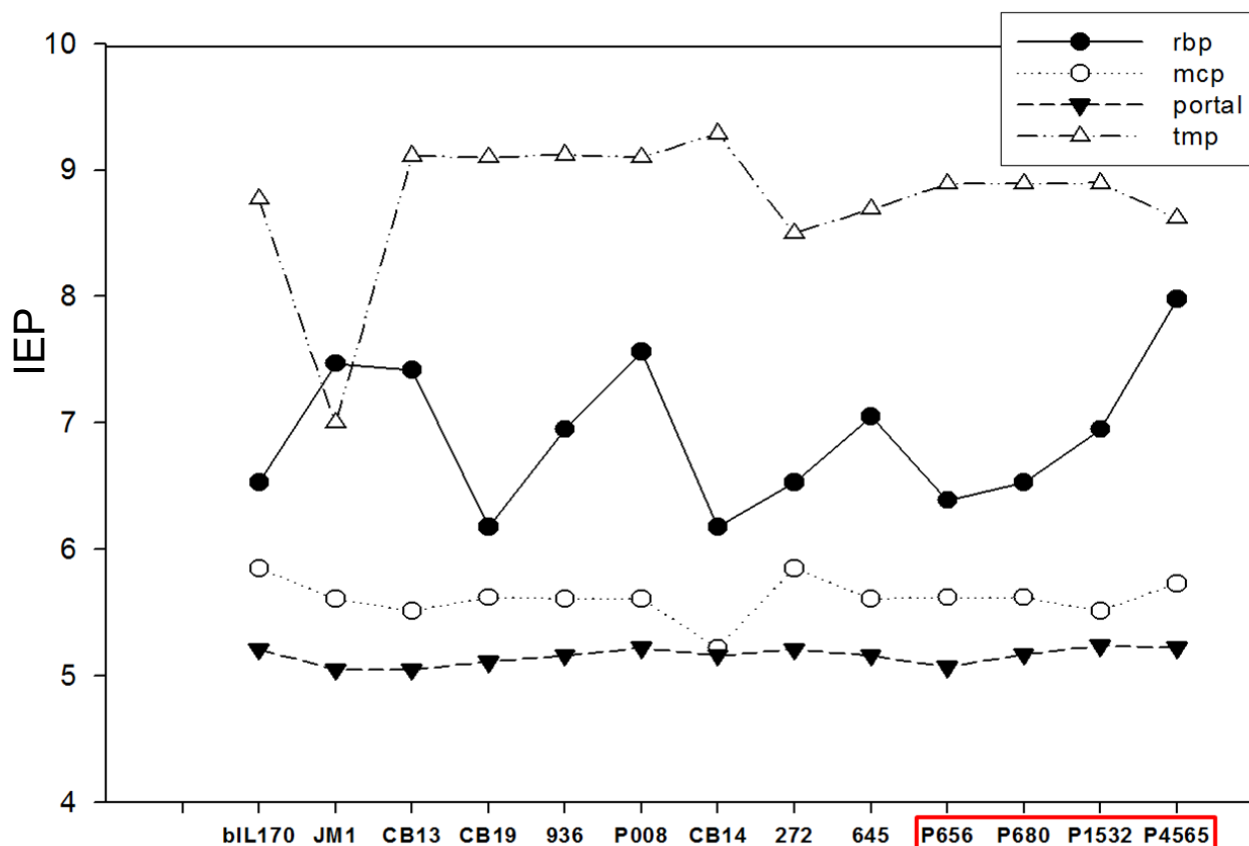


Abbildung 41 IEP von 13 ausgewählten Vertretern der 936 Phagengruppe für vier Strukturproteine. Die vier hitzeresistenten Phagen sind rot umrandet (P656, P680, P1532, P4565)

(Tabelle 14) und mit SigmaPlot 9.0 grafisch dargestellt (Abb. 41). Die hitzeresistenten

Phage	tmp (tape measure protein)	RBP (receptor binding protein)	mcp (major capsid protein)	Portal
bIL170	8,77	6,53	5,85	5,21
Caseus JM1	7	7,47	5,61	5,05
CB13	9,11	7,42	5,51	5,05
CB14	9,29	6,18	5,22	5,16
CB19	9,1	6,18	5,62	5,11
P008	9,1	7,56	5,61	5,22
936	9,12	6,95	5,61	5,16
p272	8,5	6,53	5,85	5,21
645	8,69	7,05	5,61	5,16
P656	8,89	6,39	5,62	5,07
P680	8,89	6,53	5,62	5,17
P1532	8,897	6,95	5,51	5,24
P4565	8,62	7,98	5,73	5,22

Phagen sind rot markiert.

Tabelle 14 Isoelektrische Punkte der Aminosäuresequenzen von vier ausgewählten Proteinen. Die hitzeresistenten Phagen sind rot markiert.

Wie Abb. 41 zu entnehmen ist, streuen die Isoelektrischen Punkte der hitzeresistenten Vertreter ebenso wie die zum Vergleich hinzugezogenen Sequenzen. Im Folgenden werden diese Gene phylogenetisch betrachtet, um zu untersuchen, ob es auf Sequenzebene eine Besonderheit bei den hitzeresistenten Phagen gibt.

4.3.2.1 Major capsid Protein

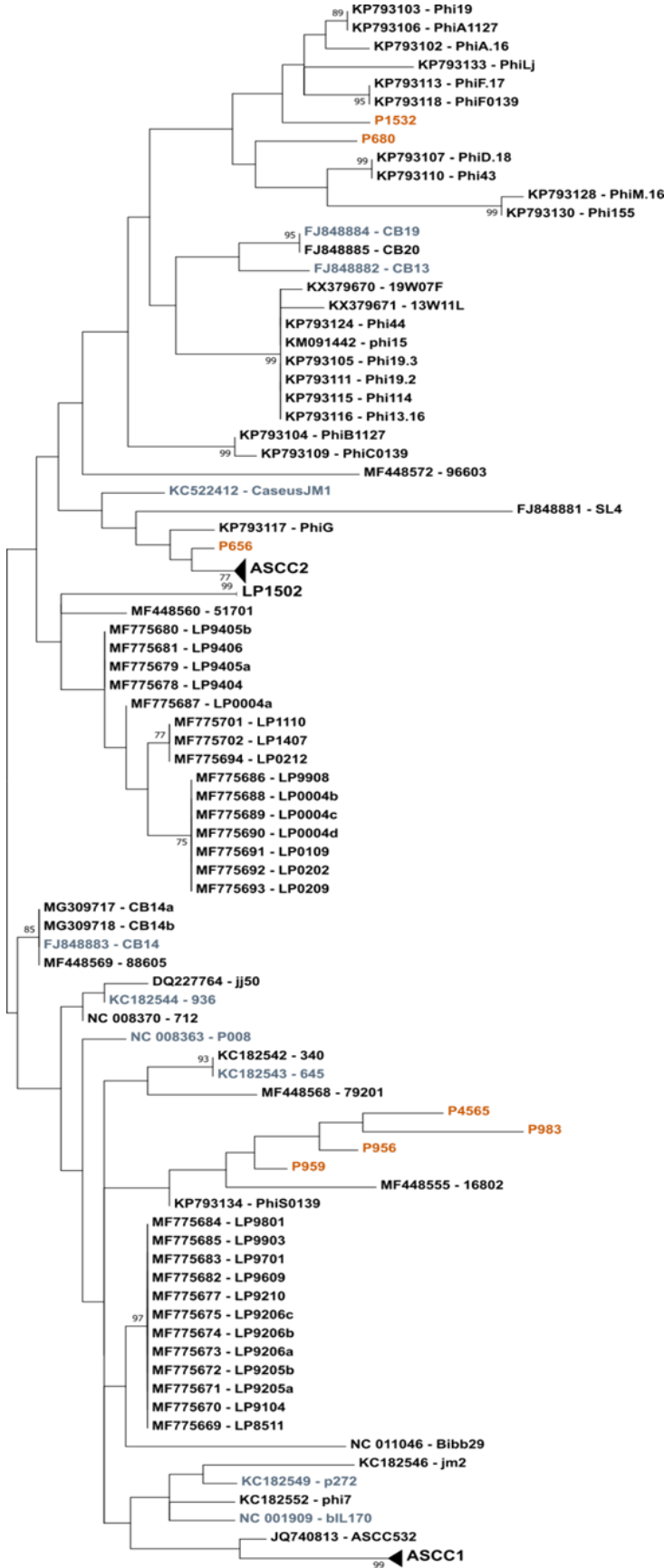
Das „major capsid protein“ (*mcp*) stellt die hauptsächliche Komponente des Kapsids dar. Dieses Gen ist bei den 936 Phagen sehr konserviert, was bereits die prozentuelle Ähnlichkeit der Proteinsequenzen in Abb. 42 zeigt. Abb. 43 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der *mcp*-Gene von 112 *L. lactis* 936 Phagen.

	P1532	P656	P4565	P680	P956	P959	P983
P1532		96.183%	96.183%	96.947%	95.929%	95.929%	94.402%
P656	96.183%		96.692%	97.201%	96.947%	97.710%	95.929%
P4565	96.183%	96.692%		97.201%	98.219%	97.710%	97.201%
P680	96.947%	97.201%	97.201%		96.947%	97.455%	95.929%
P956	95.929%	96.947%	98.219%	96.947%		98.477%	97.462%
P959	95.929%	97.710%	97.710%	97.455%	98.477%		96.954%
P983	94.402%	95.929%	97.201%	95.929%	97.462%	96.954%	
NC_001909 - bIL170	94.402%	96.183%	96.438%	94.911%	95.674%	96.438%	95.674%
FJ848883 - CB14	95.929%	98.219%	96.438%	96.438%	96.193%	96.954%	95.685%
FJ848882 - CB13	97.710%	96.438%	96.438%	97.201%	96.193%	96.447%	95.178%
KC182543 - 645	95.420%	97.455%	97.710%	95.929%	96.954%	97.208%	95.939%
FJ848884 - CB19	96.692%	95.420%	96.438%	96.183%	94.656%	94.911%	94.148%
KC522412 - CaseusJM1	96.183%	97.964%	96.438%	97.201%	96.193%	97.462%	95.685%
KC182544 - 936	95.165%	96.947%	96.438%	95.674%	96.183%	96.947%	95.674%
KC182549 - p272	94.911%	96.183%	96.947%	94.911%	96.183%	96.438%	95.674%
NC_008370 - 712	95.420%	97.201%	96.692%	95.929%	96.438%	97.201%	95.929%
NC_008363 - P008	95.420%	97.455%	97.201%	95.929%	96.947%	97.710%	96.438%
DQ227764 - jj50	94.656%	96.947%	96.438%	95.674%	96.183%	96.947%	95.674%
FJ848885 - CB20	96.692%	95.420%	96.438%	96.183%	94.670%	94.924%	94.162%

Abbildung 42 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des „mcp“ aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen

Alle Proteinsequenzen besitzen Sequenzähnlichkeiten von über 94 % (Abb. 42). Zudem ist das Gen bei den meisten 936 Phagen genau 394 AS groß. Nach der phylogenetischen Analyse bilden sich zwei größere Cluster. Im kleineren Cluster liegen 45 Vertreter der 936 Phagengruppe, darunter die hitzeresistenten Phagen P1532, P680 und P656. Die drei neuen, ebenfalls hitzeresistenten Phagen P959, P956 und P983 liegen zusammen mit dem Phagen P4565 im anderen größeren Cluster nah beieinander (Abb. 43, orange Schrift). In blauer Schrift in Abb. 42 sind die in Kapitel 4.3.2 eingesetzten Phagen zur Analyse der IEP. Die AS-Sequenzen der *mcp*-Gene dieser Phagen liegen ebenfalls über das gesamte Dendrogramm verteilt.

Gens von 112 *L. lactis* Phagen. Entsprechend der Gruppeneinteilung aus den Abbildungen 35 und 36 (blaue Klammern) sind einige Phagen zu Gruppen zusammengefasst (◀). Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, die weiteren Phagen aus Tabelle 14 in blauer Schrift dargestellt.



0.005

4.3.2.2 Tape measure protein

Das *tape measure protein* (*tmp*) spielt eine wichtige Rolle bei der Injektion der Phagen-DNA in die Wirtszelle und definiert zudem die Länge des Phagenschwanzes (siehe Kapitel 1.4).

In Abb. 44 ist der phylogenetische Stammbaum des *tmp*-Gens (welches bei den Phagen der 936 Phagengruppe zwischen 831 und 1000 AS groß ist) von 111 *L. lactis* 936 Phagen, darunter die 6 hitzeresistenten Vertreter (orange gefärbt). Das *tmp*-Gen des Phagen P983 wurde bei dieser Analyse nicht berücksichtigt, da es aufgrund einer Variation im Genom nicht als ein einzelnes Gen vorlag, sondern in zwei Gene gestückerelt mit einem nicht codierenden Bereich.

Die AS-Sequenzähnlichkeiten der *tmp*-Gene liegen zwischen 60 % und 100 %. In Abb. 44 sind die AS-Sequenzähnlichkeiten der verglichenen, hitzeresistenten Phagen mit den Phagen, die für die IEP Analyse verwendeten Phagen, dargestellt. Bereits bei dieser Auswahl liegt die Ähnlichkeit zwischen 65 % und 92 %.

Im Stammbaum (Abb. 45) liegen die hitzeresistenten Phagen verteilt über verschiedene Cluster, lediglich die Phagen P680, P959 und P956 liegen in einem Cluster. Diese zeigten in Abb. 44 auch die höchste AS-Sequenzähnlichkeit bei den hitzeresistenten Phagen.

	P1532	P656	P4565	P680	P959	P956
P1532		79.279%	79.958%	66.902%	67.109%	65.792%
P656	79.279%		76.777%	73.774%	72.978%	72.873%
P4565	79.958%	76.777%		65.388%	66.200%	65.388%
P680	66.902%	73.774%	65.388%		91.817%	93.886%
P959	67.109%	72.978%	66.200%	91.817%		94.110%
P956	65.792%	72.873%	65.388%	93.886%	94.110%	
NC_001909 - bIL170	66.398%	73.073%	66.700%	92.249%	92.581%	91.812%
FJ848883 - CB14	69.269%	75.776%	68.869%	71.872%	73.778%	72.072%
FJ848882 - CB13	75.100%	80.981%	81.124%	67.771%	68.780%	67.570%
KC182543 - 645	67.003%	72.873%	65.994%	91.048%	92.036%	92.576%
FJ848884 - CB19	80.020%	84.885%	80.823%	71.586%	72.796%	71.185%
KC522412 - CaseusJM1	73.966%	79.780%	75.177%	80.131%	81.228%	79.803%
KC182544 - 936	67.067%	73.473%	65.866%	69.970%	71.176%	70.270%
KC182549 - p272	66.095%	72.773%	66.398%	92.576%	93.455%	93.450%
NC_008370 - 712	65.766%	73.774%	72.472%	70.771%	70.875%	70.170%
DQ054536 - P008	66.801%	73.574%	66.095%	92.686%	93.346%	92.686%
DQ22776 - jj50	73.273%	82.783%	74.775%	72.472%	72.477%	70.971%
FJ848885 - CB20	80.020%	84.885%	80.823%	71.586%	72.796%	71.185%

Abbildung 44 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des TMP aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen

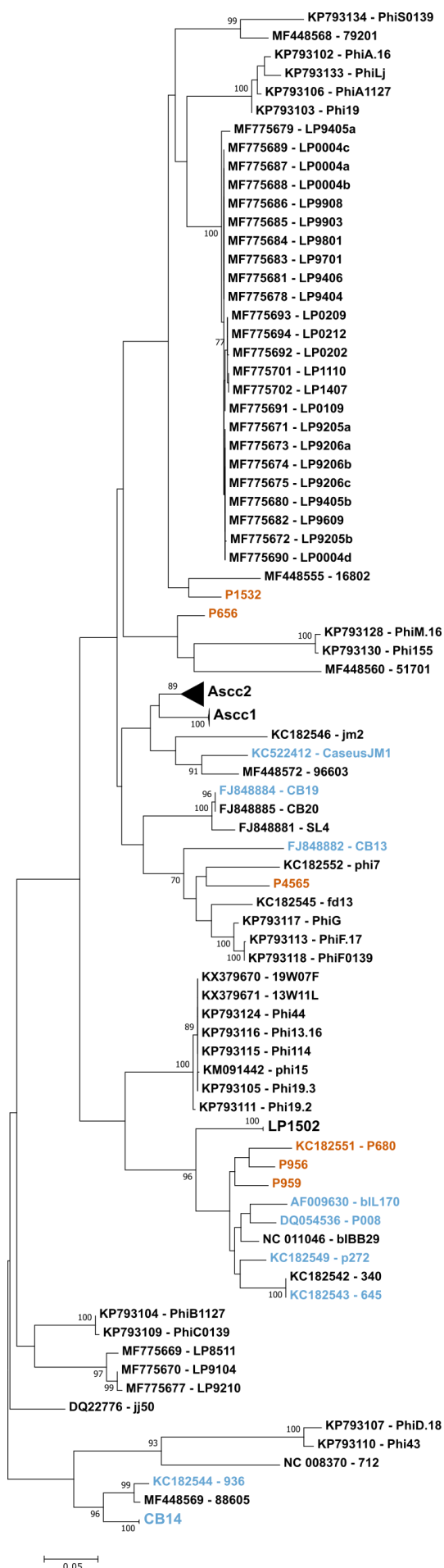


Abbildung 45 Phylogenetischer Stammbaum des *tmp*-Gens von 111 AS-Sequenzen. Entsprechend der Gruppeneinteilung aus den Abbildungen 35 und 36 (blaue Klammern) sind einige Phagen zu Gruppen zusammengefasst (◄). Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, die weiteren Phagen aus Tabelle 14 in blauer Schrift dargestellt.

4.3.2.3 Rezeptorbindeprotein

Das Rezeptorbindeprotein (RBP) spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Infektion der Wirtszelle. Die Aminosäuresequenzen der *rbp*-Gene von sechs der sieben hitzeresistenten 936 Phagen wurden zusammen mit 105 936 Phagensequenzen in einen phylogenetischen Stammbaum geladen (Abb. 46 und 47). Die AS-Sequenz des RBP des hitzeresistenten Phagen P959 wurde bei dieser Analyse nicht berücksichtigt, da es über zwei orfs im Bereich des RBP verfügte, die beide erheblich kürzer waren als die *rbp*-Gene der übrigen 936 Phagen. Die Phagen P680, P983 und P956 bilden ein nah verwandtes Cluster. Die Phagen P656 und P1532 liegen in einem Cluster, welches mit dem Cluster der Phagen P680, P983 und P956 eine große Gruppe bildet (Abb. 46). Der Phage P4565 liegt jedoch in einem zweiten großen Cluster von den übrigen hitzeresistenten Phagen entfernt (Abb. 47).

Da es nicht möglich war, die in Abb. 35 und 36 definierten Cluster für das Dendrogramm des RBP zusammenzufassen, ist der Baum wie auch bei den Abb. 35 und 36 über 2 Seiten gestreckt.

Die drei in einem kleinen Cluster liegenden Phagen P680, P983 und P956 zeigen beim AS-Sequenzvergleich hohe Ähnlichkeiten von über 97 % (Abb. 48). Zu den anderen hitzeresistenten Phagen liegen die AS-Sequenzähnlichkeiten bei ca. 50 %.

Der Phage 4565 der im Cluster nahe zum Phagen CaseusJM1 liegt (Abb. 47) weist zu diesem auch über 80 % AS-Sequenzähnlichkeit auf.

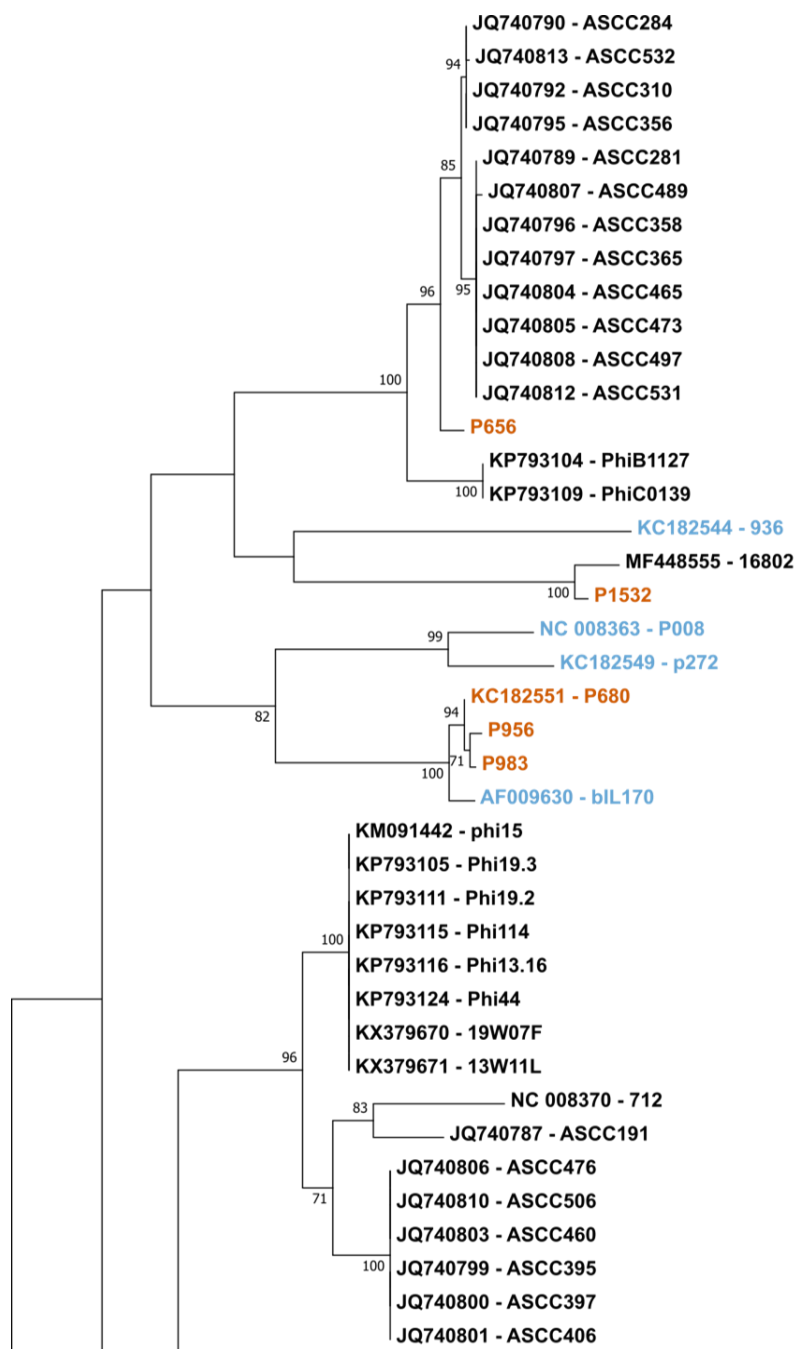


Abbildung 46 Teil 1 des phylogenetischen Stammbaumes der RBP AS-Sequenzen von 111 *L. lactis* Phagen der 936 Phagengruppe. Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, die weiteren Phagen aus Tabelle 14 in blauer Schrift dargestellt.

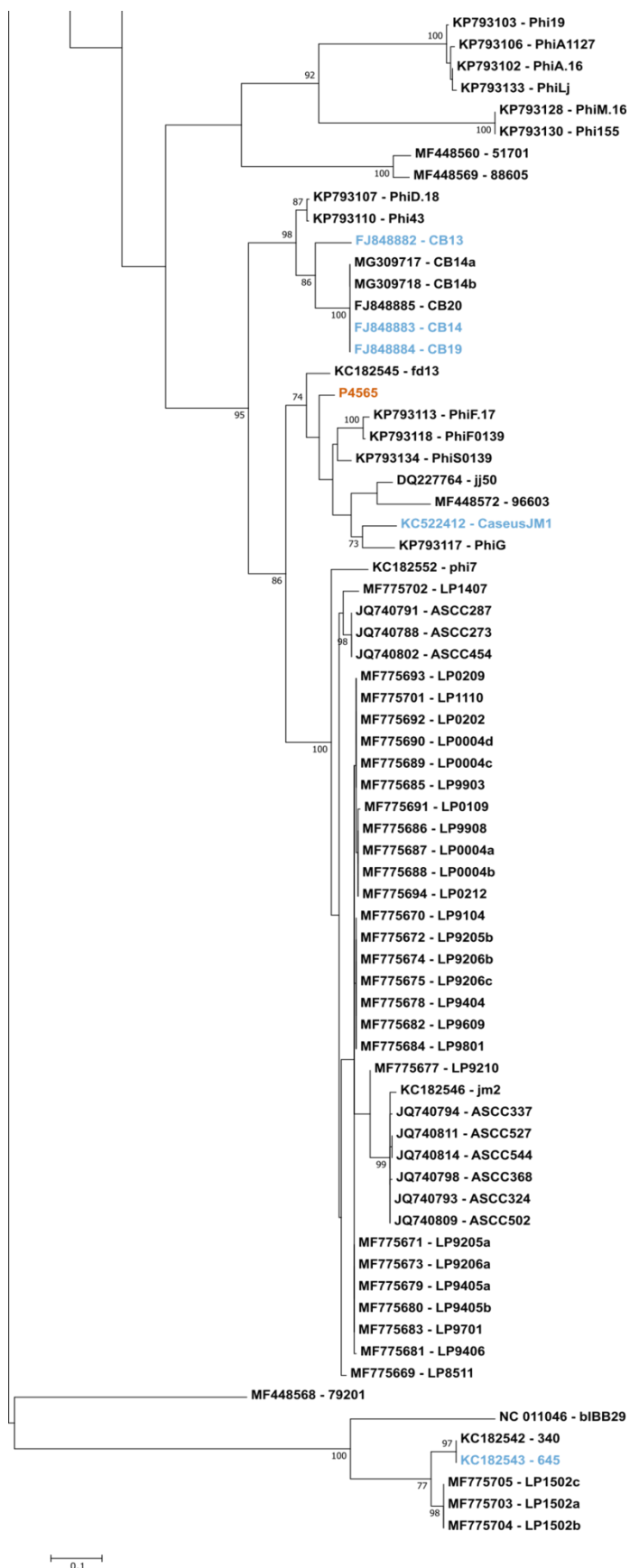


Abbildung 47 Teil 2 des phylogenetischen Stammbaumes der RBP AS-Sequenzen von 111 *L. lactis* Phagen der 936 Phagengruppe. Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, die weiteren Phagen aus Tabelle 14 in blauer Schrift dargestellt.

	P1532	P656	P4565	P680	P956	P983
P1532		50.916%	49.813%	50.000%	50.000%	49.649%
P656	50.916%		48.699%	53.285%	52.555%	52.571%
P4565	49.813%	48.699%		52.963%	52.222%	52.609%
P680	50.000%	53.285%	52.963%		97.761%	98.151%
P956	50.000%	52.555%	52.222%	97.761%		97.405%
P983	49.649%	52.571%	52.609%	98.151%	97.405%	
NC_001909 - bIL170	48.897%	51.825%	53.333%	94.776%	92.537%	93.674%
FJ848883 - CB14	47.426%	47.080%	75.556%	47.273%	46.545%	46.562%
FJ848882 - CB13	47.794%	47.810%	74.074%	48.364%	47.273%	47.653%
KC182543 - 645	33.453%	30.479%	36.331%	34.164%	33.808%	34.180%
FJ848884 - CB19	47.426%	47.080%	75.556%	47.273%	46.545%	46.562%
KC522412 - CaseusJM1	48.689%	49.442%	84.528%	50.000%	49.259%	49.646%
KC182544 - 936	43.841%	46.014%	39.855%	44.203%	44.203%	43.495%
KC182549 - p272	47.426%	48.897%	47.059%	55.882%	54.779%	55.531%
NC_008370 - 712	44.604%	46.809%	50.719%	45.683%	45.324%	45.340%
NC_008363 - P008	46.739%	48.551%	46.377%	54.182%	53.091%	53.471%
DQ227764 - jj50	48.000%	47.312%	80.727%	50.538%	49.821%	50.196%
FJ848885 - CB20	47.426%	47.080%	75.556%	47.273%	46.545%	46.562%

Abbildung 48 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des RBP aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen.

4.3.2.4 Portal Protein

Abbildung 49 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des „portal proteins“ aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen

Das Portal Protein ist für die Verbindung von Phagenkopf und Phagenschwanz verantwortlich, zudem spielt es eine Rolle bei der Injektion der DNA in die Wirtszelle. Die Aminosäuresequenzen der Portal Proteine der sieben hitzeresistenten 936 Phagen wurden zusammen mit 105 publizierten Portal Protein AS-Sequenzen (936 Phagen) in einen phylogenetisches Dendrogramm berechnet (Abb. 50). Alle sieben hitzeresistenten Phagen liegen auf einem Ast eines Clusters des Stammbaums. Auf diesem Ast liegen noch weitere Phagen, die beiden Phagen CB19 und CB20 (Abb. 49; blaue Markierung), da diese eine über 94 %ige AS-Sequenzähnlichkeiten zu den hitzeresistenten Phagen zeigen. Insgesamt sind die AS-Sequenzen der Portal Proteine eng miteinander verwandt. Mit dem Phagen CaseusJM1 haben die hitzeresistenten Phagen Sequenzähnlichkeiten von 90 - 95 % (Abb. 49, orange Markierung) dieser liegt im selben Cluster jedoch am ganz anderen Ende (Abb. 50). Auch die Phagen 936 und jj50 zeigen AS-Sequenzähnlichkeiten von 88 - 93 % (Abb. 49, rote Markierung, liegen aber auf einem anderen Cluster (Abb. 50).

	P1532	P656	P4565	P680	P956	P983	P959
P1532		92.857%	96.032%	96.032%	92.593%	95.238%	93.122%
P656	92.857%		94.974%	95.767%	93.915%	96.561%	97.619%
P4565	96.032%	94.974%		98.413%	95.238%	97.619%	96.032%
P680	96.032%	95.767%	98.413%		96.296%	98.677%	96.032%
P956	92.593%	93.915%	95.238%	96.296%		95.503%	94.709%
P983	95.238%	96.561%	97.619%	98.677%	95.503%		96.561%
P959	93.122%	97.619%	96.032%	96.032%	94.709%	96.561%	
NC_001909 - bIL170	90.476%	96.032%	92.857%	93.386%	91.270%	94.444%	94.709%
FJ848883 - CB14	91.270%	96.825%	93.651%	94.180%	92.063%	95.238%	95.503%
FJ848882 - CB13	91.799%	95.503%	94.709%	95.238%	93.122%	96.032%	95.767%
KC182543 - 645	91.270%	96.561%	93.651%	94.180%	92.063%	95.238%	95.767%
FJ848884 - CB19	94.444%	97.090%	95.767%	97.090%	94.709%	97.354%	96.561%
KC522412 - CaseusJM1	90.476%	95.767%	93.122%	93.386%	91.270%	94.444%	95.503%
KC182544 - 936	88.889%	93.122%	91.270%	91.534%	89.153%	92.328%	92.593%
KC182549 - p272	91.005%	96.296%	93.386%	93.915%	91.799%	94.974%	95.503%
NC_008370 - 712	88.624%	92.857%	91.005%	91.270%	88.889%	92.063%	92.328%
NC_008363 - P008	89.683%	94.974%	92.063%	92.593%	90.476%	93.651%	94.444%
DQ227764 - jj50	88.624%	92.857%	91.005%	91.270%	88.889%	92.063%	92.328%
FJ848885 - CB20	94.444%	97.090%	95.767%	97.090%	94.709%	97.354%	96.561%

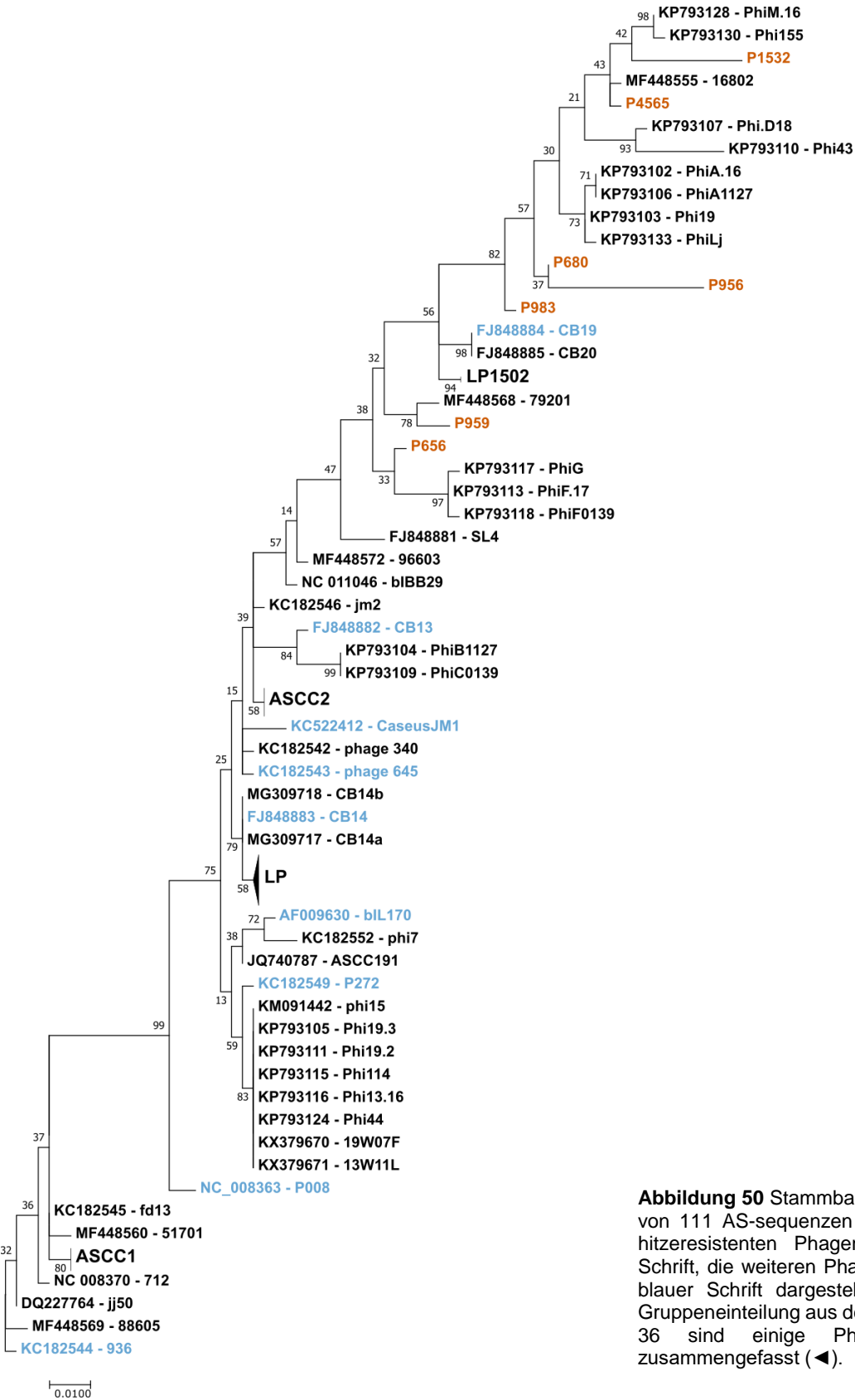


Abbildung 50 Stammbaum des Portal Proteins von 111 AS-Sequenzen der 936 Phagen. Die hitzeresistenten Phagen sind in orangener Schrift, die weiteren Phagen aus Tabelle 14 in blauer Schrift dargestellt. Entsprechend der Gruppeneinteilung aus den Abbildungen 35 und 36 sind einige Phagen zu Gruppen zusammengefasst (◄).

4.3.3 Analyse des Portal Protein clusters der hitzeresistenten Phagen

Die Phagen, die bei der phylogenetischen Analyse des „portal proteins“ mit den bekannten hitzeresistenten Phagen in einem Cluster lagen, sind in Tabelle 15 aufgelistet. Für die Phagen SL4, CB13, CB19 und CB20 lassen sich in der Literatur Hinweise auf eine erhöhte Hitzeresistenz finden (Tabelle 15). Sie überstanden alle eine Erhitzung auf 80 °C für 5 min, wobei der Phage CB13 die höchste Inaktivierung von 2 log-Stufen aufwies, die anderen Phagen von knapp einer log-Stufe (Abb. 72).

In einem Alignment wurden die Portal Protein Gene miteinander verglichen (Abb. 51). Zwischen den Phagen die im Ast der hitzeresistenten Phagen liegen und den restlichen Phagen lassen sich an zwei Stellen Unterschiede feststellen, diese sind jeweils blau markiert. An Stelle 285 des Alignments (Abb. 51) weisen die meisten Phagen des Astes als AS Glycin (G) auf, einige Phagen des Astes weisen dagegen Serin (S) als AS auf. Alle anderen Phagen die nicht auf dem Ast liegen weisen an dieser Stelle Asparagin (N) auf. An Position 289-290 des Alignments weisen nahezu alle Phagen des Astes die Aminosäuren Isoleucin (I) und Asparagin (N) auf, lediglich der Phage P956 hat anstatt eines N ein Threonin (T). Alle anderen Phagen weisen entweder zwei Valin (VV) auf oder ein Valin und ein Isoleucin (VI).

An Position 324 des Alignments (Abb. 51) weisen alle Phagen des Astes ein Alanin (A) auf, während alle anderen Phagen Glycin (G) aufweisen.

Tabelle 15 Liste der Phagen, die mit den hitzeresistenten Phagen auf einem Ast des Clusters in Abb. 50 liegen.

Phage	Accession Nr.	Informationen zur Hitzeresistenz	Referenz
SL4	FJ848881	(Geagea <i>et al.</i> , 2018)	(Rousseau und Moineau, 2009)
79201	MF448568	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
LP1502a	MF775703	N/A	(Kupczok <i>et al.</i> , 2018)
LP1502b	MF775704	N/A	(Kupczok <i>et al.</i> , 2018)
LP1502c	MF775705	N/A	(Kupczok <i>et al.</i> , 2018)
CB20	FJ848885	(Geagea <i>et al.</i> , 2018)	(Rousseau und Moineau, 2009)
CB19	FJ848884	(Geagea <i>et al.</i> , 2018)	(Rousseau und Moineau, 2009)
CB13	FJ848882	(Geagea <i>et al.</i> , 2018)	(Rousseau und Moineau, 2009)
PhiD.18	KP793107	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
Phi43	KP793110	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
PhiA.16	KP793102	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016).
PhiA1127	KP793106	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
PhiLj	KP793133	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
Phi19	KP793103	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
16802	MF448555	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
PhiM.16	KP793128	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)
Phi155	KP793130	N/A	(Murphy <i>et al.</i> , 2016)

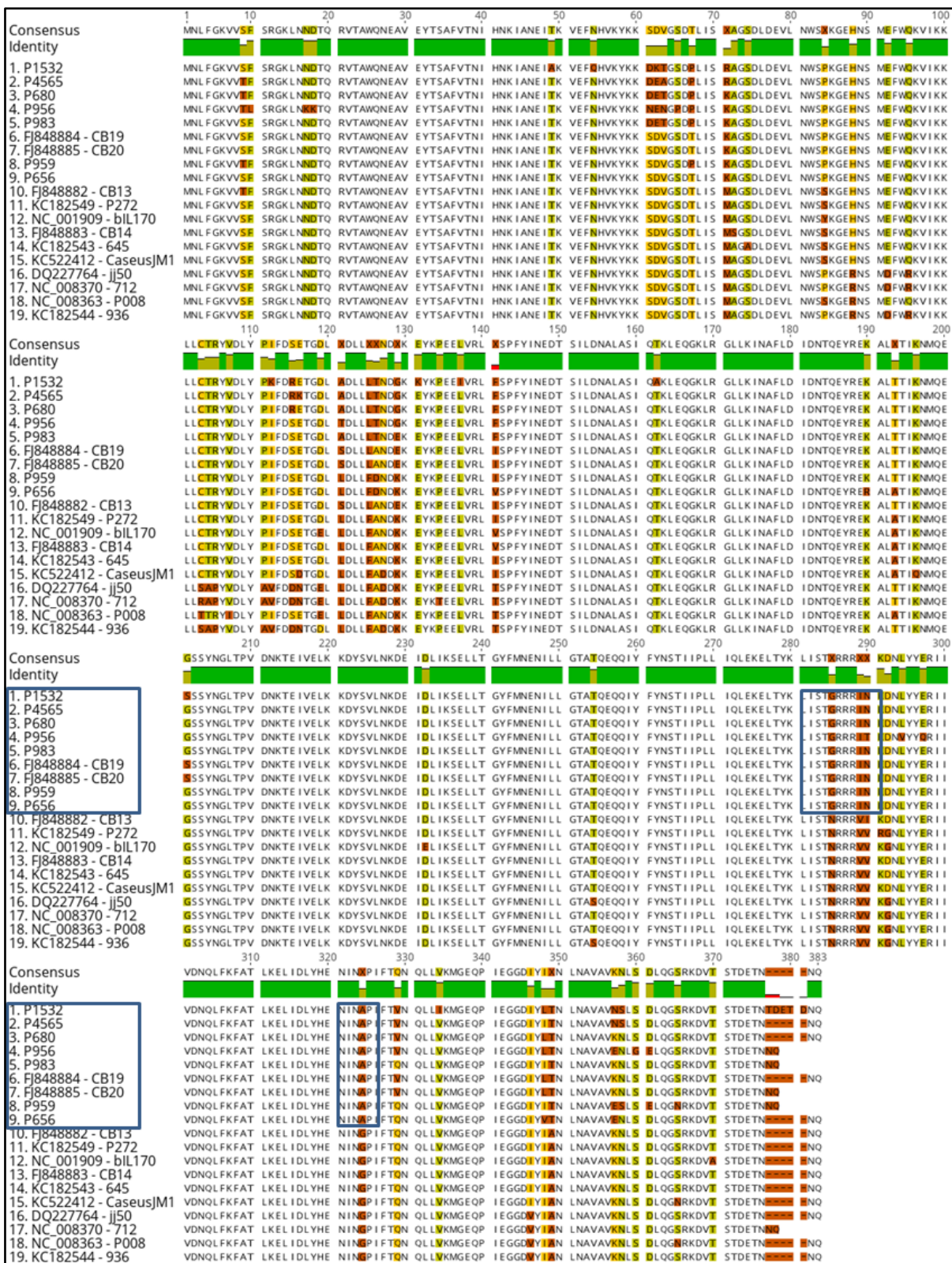


Abbildung 51 Alignment der AS-Sequenzen der Portal Proteine der hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen. Die blau markierten Phagen liegen alle in dem in Kapitel 4.3.2.4 beschriebenen Arm des Stammbaums in dem alle hitzeresistenten Phagen liegen.

4.3.4 Erhitzungsversuche

In den Erhitzungsversuchen wurde untersucht, ob zum einen, eine temperaturabhängige Inaktivierung eines hitzeresistenten Phagen (P1532) morphologisch von einem hitzesensitiveren Phagen (P008) zu unterscheiden ist. Zum anderen wurden verschiedene Mutanten des hitzesensitiven Phagen P008 miteinander verglichen.

4.3.4.1 Morphologische Untersuchungen nach Hitzeinaktivierung

Ein hitzeresistenter Phage (P1532) und ein hitzesensitiver Phage (P008) der *L. lactis* 936 Phagengruppe wurden in Wasser erhitzt. Die Proben, bei denen noch 50 %, und 10 % der eingesetzten Phagen über einen Plaquetest (Kapitel 3.2.3) nachweisbar waren, wurden miteinander verglichen. Zudem wurden die unbehandelten Phagen in die Analyse einbezogen. Da beide Phagen unterschiedliche Inaktivierungskinetiken aufweisen (Muller-Merbach *et al.*, 2005, Atamer *et al.*, 2009a), wurden die beiden Phagen bei zwei spezifischen Temperaturen erhitzt. Der hitzeresistente Phage 1532 wurde auf 75 °C erhitzt, der hitzeempfindliche Phage P008 auf 65 °C. Nach einer Aufwärmphase von einer Minute wurde die erste Probe entnommen, die zweite Probe nach einer weiteren Minute Heißhaltezeit und anschließend jeweils nach 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 15 Minuten. Die Inaktivierung der beiden eingesetzten Phagen über die Zeit ist in Abb. 52 dargestellt. Der Phage 1532 war nach 3 Minuten Heißhaltezeit bereits um eine log-Stufe inaktiviert und damit waren noch 10 % der ursprünglich eingesetzten Phagen aktiv. Eine Inaktivierung von 50 % der Phagen erfolgte nach zwei Minuten Heißhaltezeit. Der Phage P008 war nach 6 Minuten zu 50 % inaktiviert und nach 15 Minuten zu 90 %.

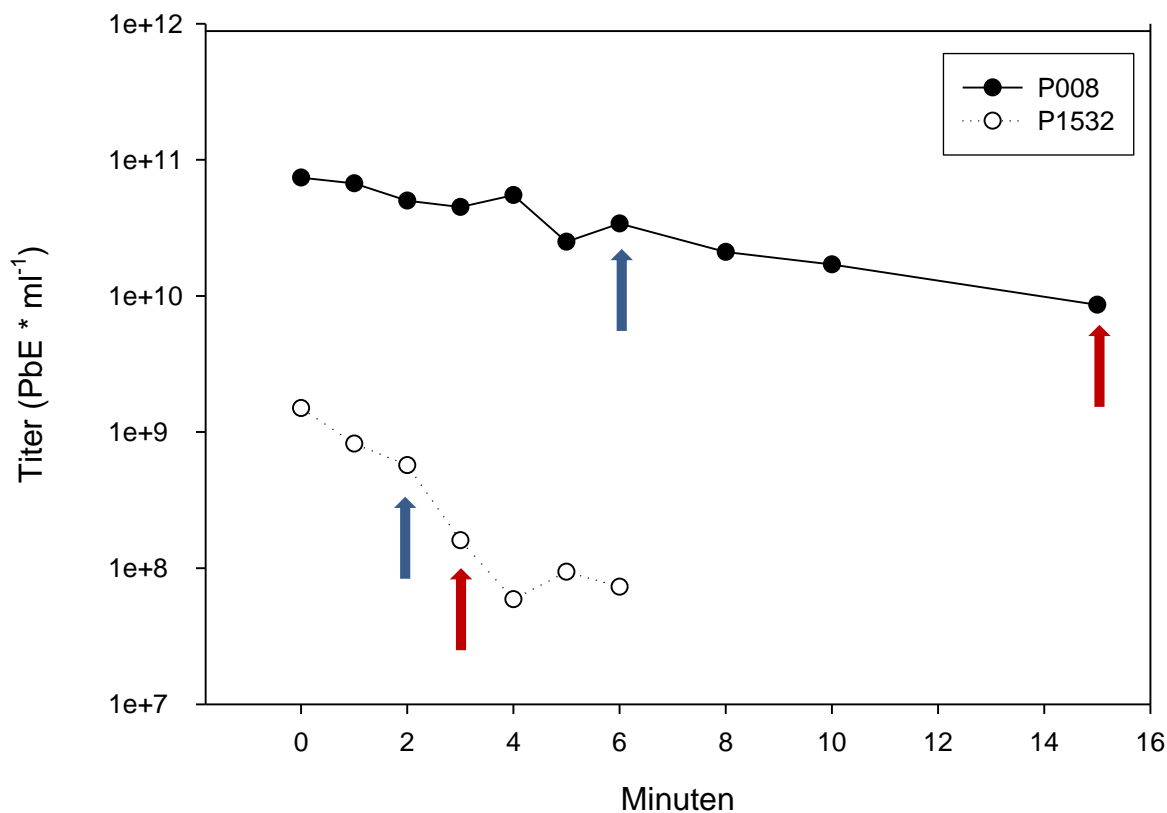


Abbildung 52 Inaktivierung der Phagen P008 und P1532 in ddH₂O bei unterschiedlichen Inaktivierungstemperaturen (P008: 65 °C; P1532: 75 °C). Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der 50 % Inaktivierung (blau) und der 90 % Inaktivierung (rot)

Die erhitzten Proben wurden anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 und 54 dargestellt. Die Phagenpartikel des hitzeresistenten Phagen P1532 scheinen bei allen Proben die gleiche Morphologie aufzuweisen (Abb. 53 A – C). Es sind überwiegend intakte Phagenpartikel zu erkennen. Der hitzesensitive Phage P008 zeigt dagegen deutliche morphologische Veränderungen während der Erhitzung. Die Schwänze der Phagen brechen ab und die DNA tritt aus den Köpfen aus. Bei 50 % Inaktivierung liegen bereits viele leere Köpfe vor (Abb. 54 E-1 und E-2). Bei einer Inaktivierung von 90 % sind hauptsächlich nur noch leere Köpfe zu erkennen (Abb. 54 F-1 und F-2). Die Schwänze sind bei 90 % Inaktivierung elektronenmikroskopisch kaum mehr nachweisbar (Abb. 54 F-1).

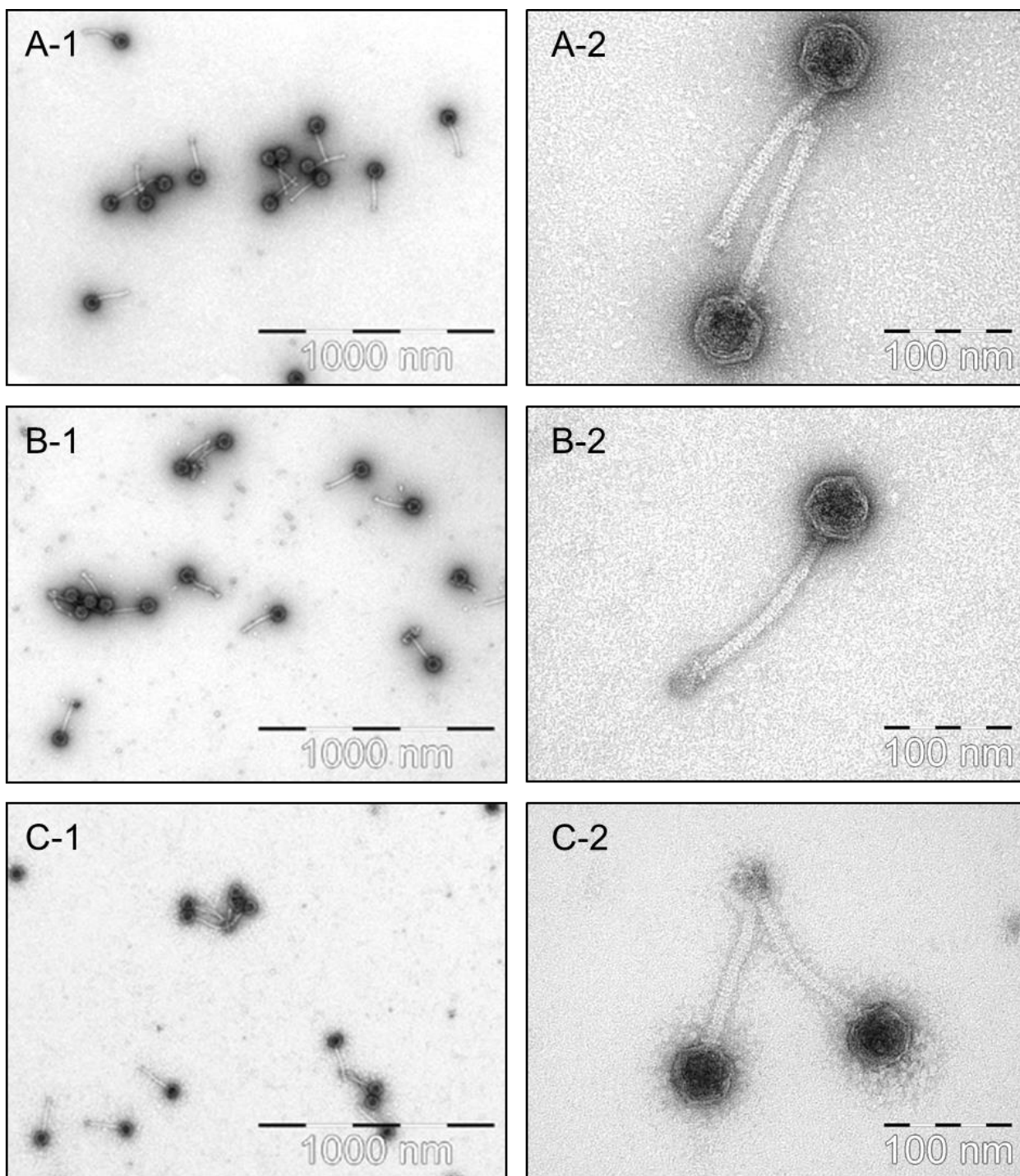


Abbildung 53 TEM Bilder der thermischen Inaktivierung des hitzeresistenten Phagen P1532: Ausgangslysate aus CsCl (A-1 und A-2), 50 % Inaktivierung (B-1 und B-2), 90 % Inaktivierung (C-1 und C-2).

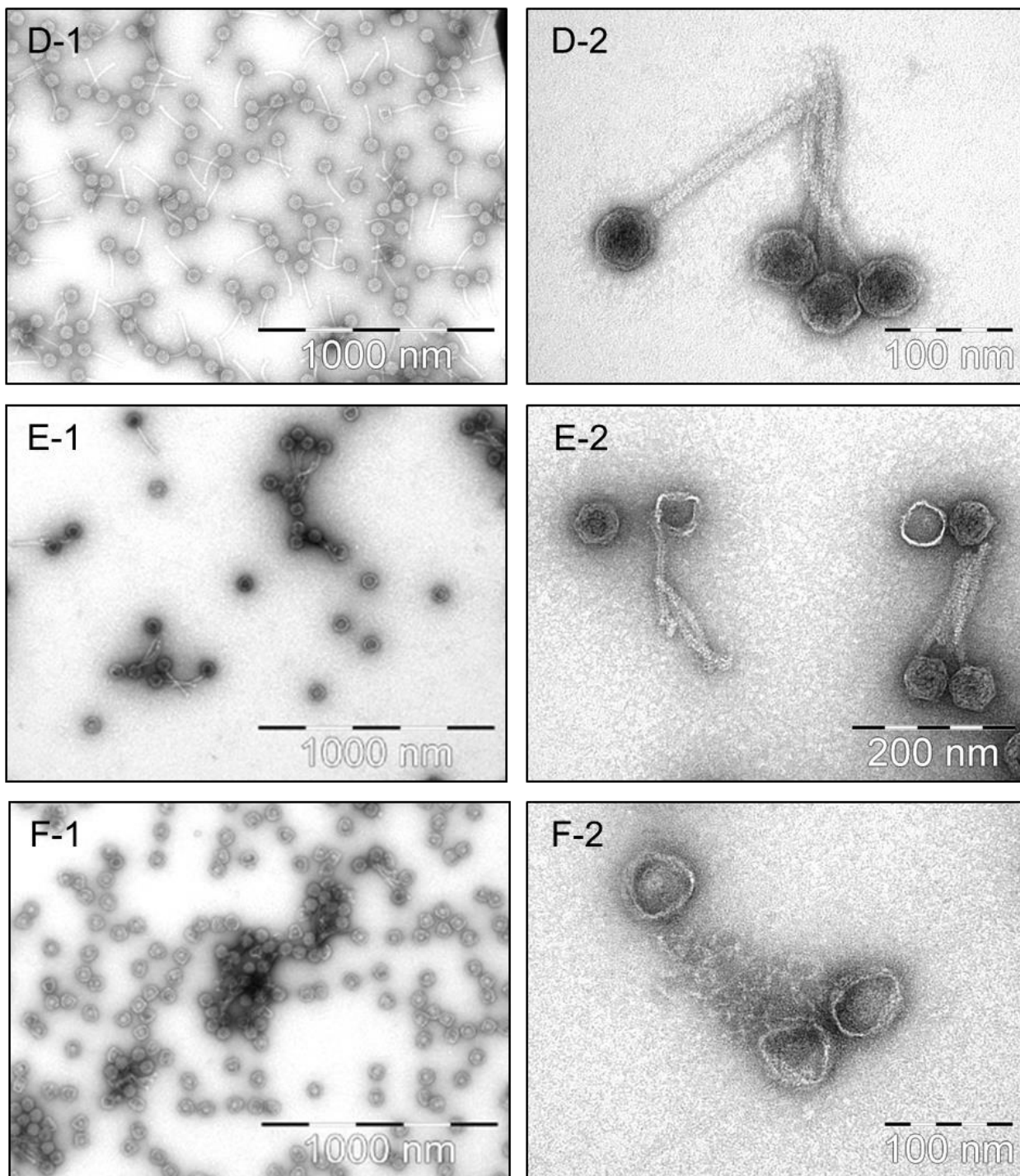


Abbildung 54 TEM Bilder der thermischen Inaktivierung des hitzesensitiven Phagen P008: Ausgangslysat aus CsCl (D-1 und D-2), 50 % Inaktivierung (E-1 und E-2), 90 % Inaktivierung (F-1 und F-2).

4.3.4.2 Vergleich der Mutanten des hitzesensitiven Phagen P008

Für den Phagen P008 liegen verschiedene Mutanten vor. Diese haben entweder eine Punktmutation (P008-M2) oder eine Deletion von 240 bp (P008-M2) im *tmp* Gen (Bebeacqua *et al.*, 2013a). Letztere Deletion spiegelt sich auch morphotypisch wieder (Abb. 55 und Tabelle 16): Die Mutante P008-M2 hat eine kürzere Schwanzlänge im Vergleich zu den Mutante P008-M1 ohne Deletion.

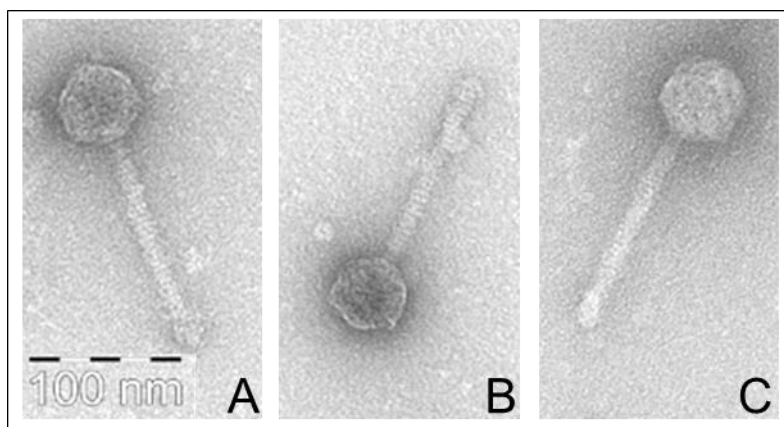


Abbildung 55
Elektronenmikroskopische
Aufnahmen der Phagen
P008wt (A), P008-M2 (B)
und P008-M1 (C)

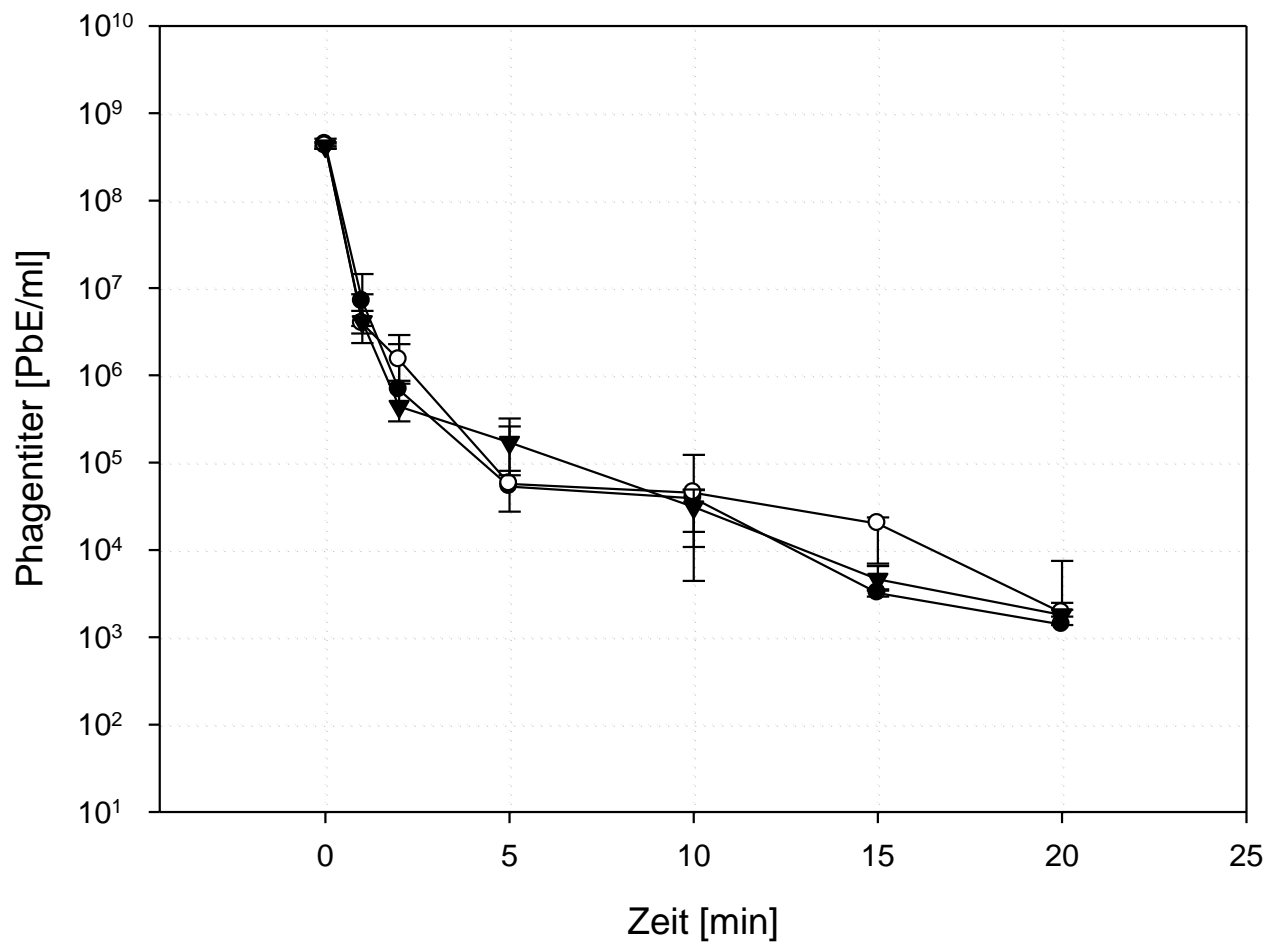
Um zu untersuchen ob diese Mutationen einen Einfluss auf die hitzeresistenz dieser Phagen hat, wurden der Wildtypphage (P008wt), die Mutante mit der Deletion (P008-M2)

Abbildung 56 Phagenreduktion von P008 (●, Wildtyp) und zwei Mutanten P008-M1 (▼, Punktmutation im TMP) und P008-M2 (○, Deletion im TMP).

und die Mutante mit einer Punktmutation (P008-M1) bei einer Temperatur von 70 °C erhitzt. Dabei wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und der Titer bestimmt (Abb. 56). Alle drei Phagen zeigten einen sehr ähnlichen Inaktivierungsverlauf und resultieren nach 20 Minuten Heißhaltezeit in nahezu identischen Phagentitern.

Tabelle 16 Kopfdurchmesser, Schwanzlänge und -breite der eingesetzten P008 Phagen.

Phage	Kopfdurchmesser (nm)	Schwanzlänge (nm)	Schwanzbreite (nm)
P008wt	53,8	142,7	12,7
P008-M2	55,6	131,8	12,7
P008-M1	56,5	142,3	15



4.4 Molekularer Phagennachweises basierend auf der LAMP-Methode

Mithilfe der LAMP-Methode sollten die vier hitzeresistenten Phagen P680, P1532, P4565 und P656 spezifisch nachgewiesen werden. Dazu wurde im ersten Schritt getestet ob die

Methode zum Nachweis von Phagen in Molke geeignet ist. Darüber hinaus wurde untersucht ob der Nachweis das Potential hat, Phagen sensitiv und robust nachzuweisen und dabei sensitiver als das bestehende PCR Nachweissystem zu sein (Deveau *et al.*, 2006). Anschließend sollte ein LAMP-Primerset für den spezifischen Nachweis der vier hitzeresistenten Phagen entwickelt und etabliert werden.

4.4.1 Etablierung der LAMP-Methode anhand des Phagen P680

Zur Etablierung des LAMP-Nachweises für Phagen in Molke wurde das *mtp*- (*major tail protein*) Gen des *L. lactis* Phagen P680 als Zielregion für das LAMP-Primerset ausgesucht. Für das Primerdesign wurde die Nukleotidsequenz des *mtp*-Gens mit dem Programm PrimerExplorer V4 (Tabelle 3) analysiert und ein LAMP-Primerset für den Phagen P680 generiert (Tabelle 17). Neben den vier notwendigen Primern gelang es zudem, einen optionalen Loop Primer (LB) zu generieren.

Tabelle 17: LAMP-Primerset zum Nachweis des *L. lactis* Phagen P680. Rot markiert ist eine Thymidin-Brücke als Verbindung der beiden Bestandteile der „Inner Primer“ (Abb. 8).

Primer	5' → 3' Sequenz	Länge
F3 (forward outer)	AATTAAGGGCGCAAACG	18
B3 (backward outer)	GGTACTTTTTTATCGCCATTCA	22
FIP (forward inner)	CGTTGGTTCTGCTGTAGGTTTCA- TTTT - GAATTTATTGACGGTTATCGTGT	50
BIP (backward inner)	TCAGAAACAGATTTCAGTAGACGGT- TTTT - CTGATTCAGTCGCTTGTACT	48
LB (loop backward)	GTAGACCCTATCCAATGGACTTTG	24

Das entwickelte Primerset (Tabelle 17) wurde mit genomischer DNA des Phagen P680 getestet. Die DNA wurde aus einer in CsCl gereinigten Phagensuspension extrahiert. Die Extraktion und Reinigung der DNA wurde mit der Phenol/Chloroform Methode durchgeführt, so dass die gereinigte, isolierte DNA in TE-Puffer verwendet werden konnte. Für den Test der Methode mit den entwickelten Primern wurden dezimale Verdünnungsstufen des Phagen P680 in die LAMP-Reaktionen eingesetzt und mit der

Gelelektrophorese überprüft (Abb. 57 A). Parallel dazu wurde für dieselben Verdünnungsstufen die etablierte PCR (Deveau *et al.*, 2006) durchgeführt (Abb. 57 B). Die Nachweisgrenze lag dabei bei der LAMP-Methode bei 10^2 PbE ml⁻¹ und bei der PCR bei 10^4 PbE ml⁻¹.

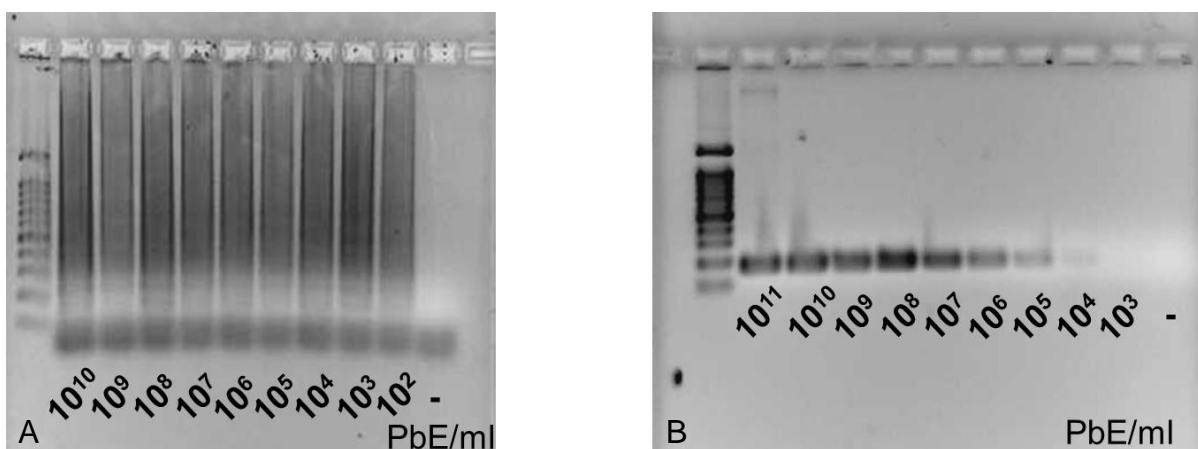


Abbildung 57 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate für den Phagen P680 im LAMP-Assay (A) und in der klassischen PCR-Detektion (B). Die Phagentiter der seriellen Verdünnungsreihen sind angegeben. Statt eines 179-bp Amplifikats der Standard-PCR (B) erscheinen im LAMP-Assay (A) komplexe Bandenmuster der Amplifikate. Als Negativkontrolle wurde Wasser ohne DNA eingesetzt.

4.4.2 Visuelle Auswertung positiver LAMP-Reaktion für den Phagen P680

Für die in Kapitel 1.8 vorgestellte visuelle Differenzierung von positiven und negativen LAMP-Proben wurde unter anderem der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Safe (Invitrogen™) und der kolorimetrischen Indikatorstoff Hydroxynaphtholblau (HNB) getestet (Tabelle 9).

Der DNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Safe wurde in ersten Versuchen am Ende der Reaktion durch Öffnen der Reaktionsgefäße zugegeben (1 µl SYBR® Safe unverdünnt zu einem 25 µl Ansatz).

Im Ergebnis leuchten positive Proben unter einer UV-Licht Quelle gelblich, wohingegen negative Proben keinen Farbumschlag zeigen und stattdessen rötlich und nicht leuchtend bleiben (Abb. 58 A).

In Abb. 58 B ist derselbe Ansatz zu sehen ohne eine UV-Lichtquelle. Positive Proben erscheinen hier klar, während negative Proben trüb wirken. Bei beiden Bildern ist der positive Nachweis von bis zu 10^3 PbE ml⁻¹ von den negativen Proben differenzierbar.

Neben der Zugabe von SYBR® Safe wurde auch der Einsatz des kolorimetrischen Indikatorstoffes HNB getestet (Tabelle 9) und zeitgleich mit einem Ansatz mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Safe verglichen. HNB wurde direkt zum Reaktionsansatz pipetiert, ein späteres Öffnen der Reaktionsgefäße war nicht notwendig. Bei beiden Ansätzen lag die Nachweisgrenze bei 10^3 PbE ml⁻¹ (Abb. 59). In Abb. 59 A sind die Ergebnisse bei Zugabe von HNB vor Reaktionsbeginn zu sehen. Positive Reaktionen zeigen einen Farbumschlag zu blau, während negative Proben ohne Farbumschlag lila-blau bleiben.

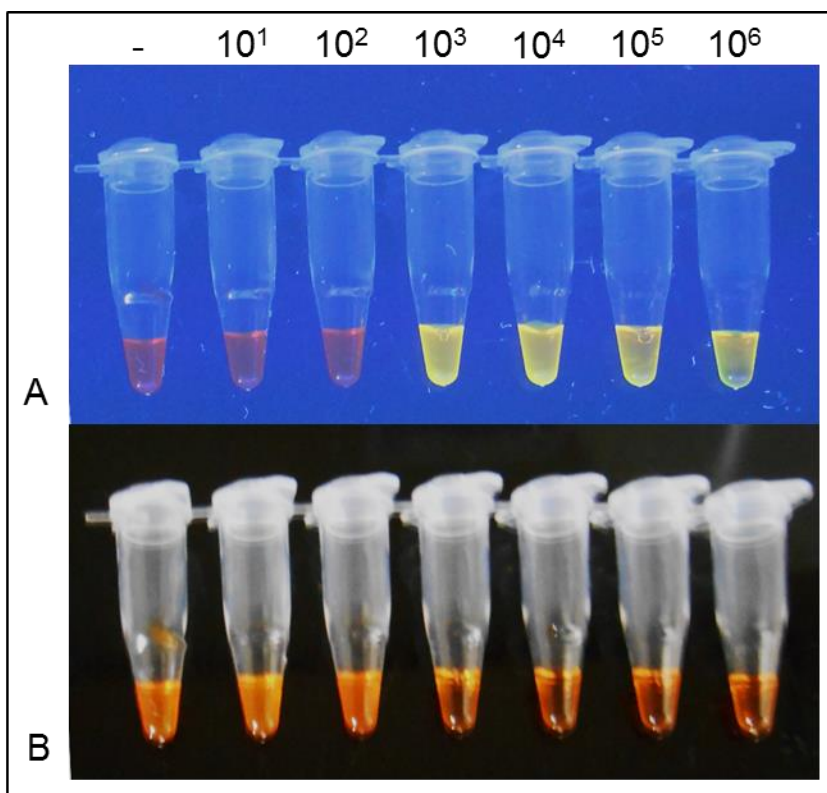


Abbildung 58 Visualisierung der LAMP-Reaktion des *L. lactis* Phagen P680 nach Zugabe von SYBR® Safe unter UV-Licht (A) bzw. ohne extra Lichtquelle (B). Eingesetzt wurden Verdünnungsstufen des Phagen P680 von 10^6 bis 10^1 PbE ml⁻¹. Bei der Negativkontrolle wurde ddH₂O eingesetzt.

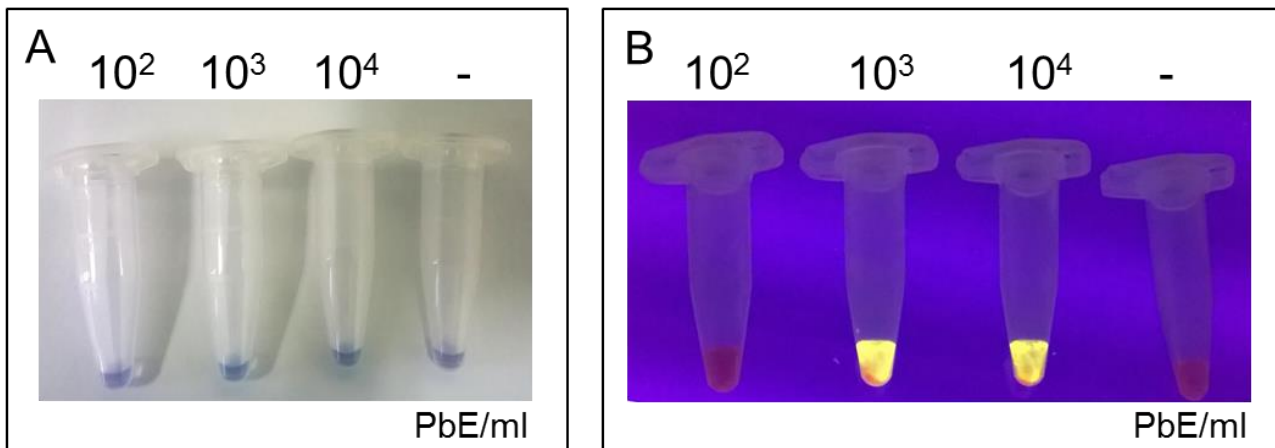


Abbildung 59 Vergleich des kolorimetrischen Indikatorstoffs HNB mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Safe. Eingesetzt wurden Verdünnungsstufen des Phagen P680 von 10^4 bis 10^2 PbE ml⁻¹.

Bereits in Tabelle 1 wurde auf den Nachteil des Endpunktnachweises durch SYBR® Safe eingegangen, denn das Öffnen der Reaktionsgefäße am Ende der Reaktion birgt ein hohes Kontaminationsrisiko. Daher wurde eine Möglichkeit untersucht, SYBR® Safe zum Ende der Reaktion zuzugeben ohne den Deckel der Reaktionsgefäße öffnen zu müssen. Dazu wurde 1 µl SYBR® Safe (unverdünnt) vor Reaktionsbeginn in die Innenseite des Deckels der Reaktionsgefäße pipettiert (Abb. 60 A, orange/rote Tropfen). Nach

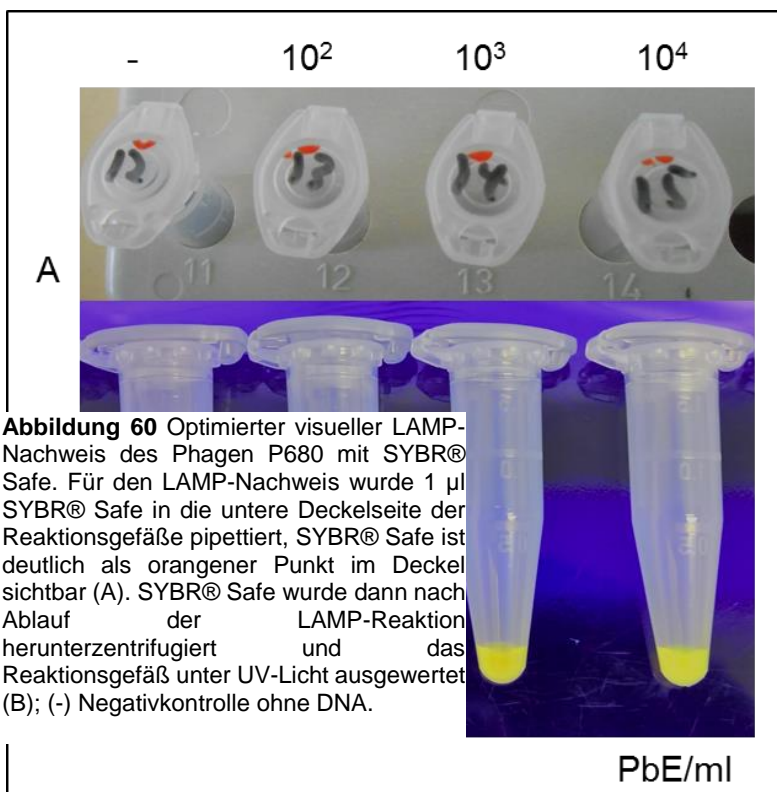


Abbildung 60 Optimierter visueller LAMP-Nachweis des Phagen P680 mit SYBR® Safe. Für den LAMP-Nachweis wurde 1 µl SYBR® Safe in die untere Deckelseite der Reaktionsgefäße pipettiert, SYBR® Safe ist deutlich als orangener Punkt im Deckel sichtbar (A). SYBR® Safe wurde dann nach Ablauf der LAMP-Reaktion herunterzentrifugiert und das Reaktionsgefäß unter UV-Licht ausgewertet (B); (-) Negativkontrolle ohne DNA.

Reaktionsende wurde der Tropfen durch kurzes Zentrifugieren dem Reaktionsgemisch zugefügt und unter einer UV-Licht Quelle analysiert (Abb. 60 B).

4.4.3 Untersuchungen zur Nachweisgrenze der LAMP-Methode

Im nächsten Schritt wurde von der extrahierten DNA (Kapitel 4.4.1) die Konzentration mit dem Nanodrop 2000c (Thermo Scientific™) bestimmt und anschließend von einer Ausgangskonzentration von $18 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ in einer Verdünnungsreihe mit Reinstwasser bis auf eine berechnete DNA Konzentration von $0,35 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ verdünnt. Diese Verdünnungsstufe entspricht theoretisch 10 DNA Molekülen. Verdünnungen mit berechneten Konzentrationen von 10^1 bis 10^3 Moleküle pro μl wurden anschließend als Template in einen LAMP-Nachweis eingesetzt. Dabei konnten Konzentrationen von bis zu 2×10^1 DNA Moleküle pro Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 61).

Beim Einsatz von dezimalen Verdünnungsreihen der Phagen aus denen die DNA für die Reaktion extrahiert wurde, schwankte die in Kapitel 4.4.1 beschriebene Nachweisgrenze zwischen 10^2 und 10^3 PbE ml^{-1} (Abb. 57 A, 59 B und 60 B). Daher wurde untersucht wie sich die Nachweisgrenze bei vielen Wiederholungen verhält.

Dazu wurden serielle Verdünnungen des Phagen in 10^4 (für die zuverlässig nachweisbaren Titer 10^3 und 10^4 PbE ml^{-1}) bzw. 24 (für den sporadisch positiven Titer 10^2 PbE ml^{-1} und den Zwischenschritt von $5 \times 10^2 \text{ PbE ml}^{-1}$) Replikaten getestet. Während 100 % der Titer 10^3 und 10^4 PbE ml^{-1} positiv waren, lag der Wert bei $5 \times 10^2 \text{ PbE ml}^{-1}$ bei etwa 45 % und bei 10^2 PbE ml^{-1} bei etwa 17 % (Tabelle 18).

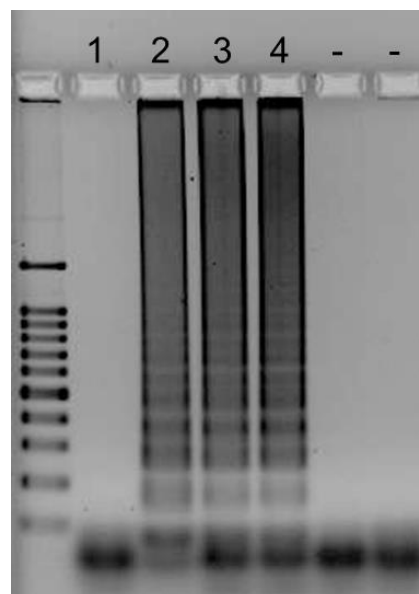


Abbildung 61 Gelelektrophorese des LAMP-Nachweises von DNA in ddH₂O. Verdünnungsstufen 1: 10^1 , 2: 2×10^1 , 3: 10^2 , 4: 10^3 , - Negativkontrolle (keine DNA).

Tabelle 18 LAMP-Reaktionen mit extrahierter DNA des Phagen P680 aus seriellen Verdünnungen in ddH₂O.

Phagentiter (PbE ml ⁻¹)	Anzahl der Replikate	Absolute Anzahl und relativer Anteil (%) positiver Reaktionen
10^4	10	10 (100)
10^3	10	10 (100)
5×10^2	24	11 (45)
10^2	24	4 (17)
10^1	10	0 (0)

4.4.4 Validierung der LAMP-Methode für den Phagen P680 in Sauermolke

Für eine Überprüfung der Wirksamkeit der LAMP-Methode in Molke wurde der Phage P680 in dezimalen Verdünnungsstufen in Sauermolke pipettiert und daraus die Phagen-DNAs extrahiert. Die so gewonnenen Phagen-DNA-Proben wurden mit der LAMP-Methode getestet.

Dabei konnten mit der LAMP-Methode nur Phagen bis zu einem Titer von 10^6 PbE ml⁻¹ nachgewiesen werden (Abb. 62 A und B).

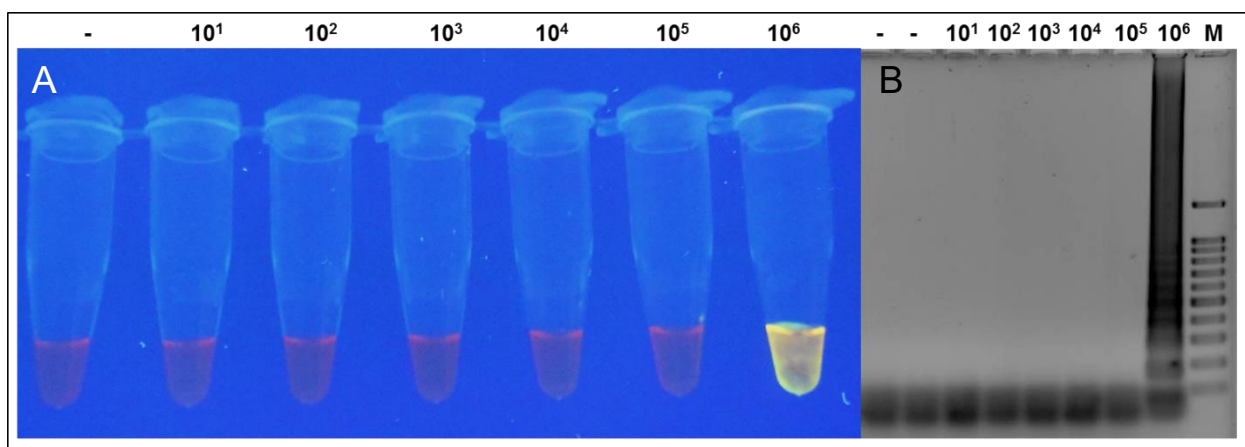


Abbildung 62 Ergebnis der LAMP-Reaktionen in Sauermolke. A: visueller Nachweis durch den Einsatz von SYBR® Safe; B: Agarose-Gelelektrophorese der Reaktionen.

Zur Optimierung der Nachweisgrenze in Sauermolke wurde die DNA-Extraktion mit der Chelex-100 Methode (Kapitel 3.3.1.3) getestet. Es wurde dabei besonders darauf geachtet, dass kein Chelex-100 mit überführt wurde. Die Ergebnisse derselben Ausgangsverdünnungen sind in Abb. 63 dargestellt. Es konnten bei den eingesetzten Verdünnungen Phagen bis zu einer Nachweisgrenze von 10^1 PbE ml⁻¹ nachgewiesen werden. Durch die parallel durchgeführte PCR mit den etablierten Primern (Deveau *et al.*, 2006) wurde die Chelex-100 (Kapitel 3.3.1.3) Extraktion mit der „Boiling“ Methode“ (Kapitel 3.3.1.2) verglichen. Dabei zeigte die PCR bei den eingesetzten Proben ebenfalls eine Nachweisgrenze von 10^1 PbE ml⁻¹. Die Standard Extraktion über die „Boiling“ Methode dagegen, wies die bekannte Nachweisgrenze von 10^4 PbE ml⁻¹ auf.

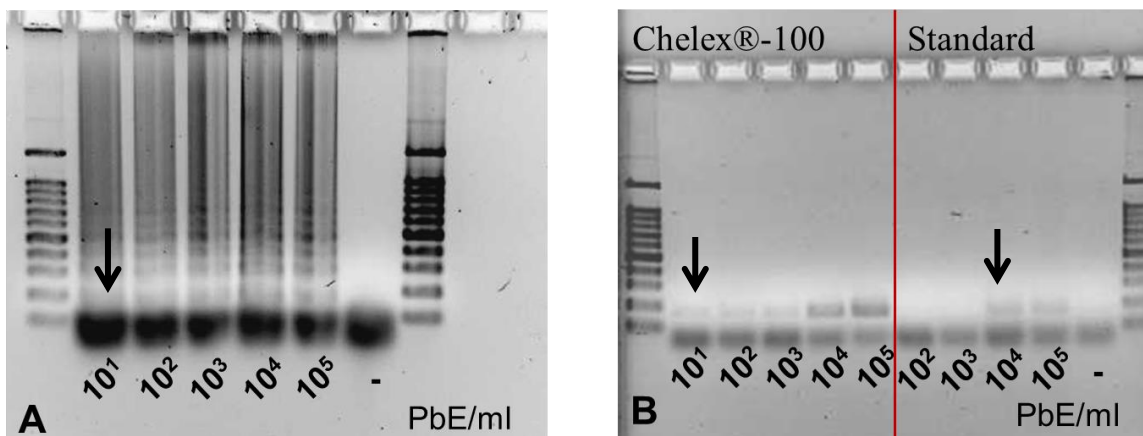


Abbildung 63 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate für den in Sauermolke resuspendierten Phagen P680 im LAMP-Ansatz (A) und in der klassischen PCR-Detektion (B) mit (linke Gelseite, Bild 34B) und ohne (rechte Gelseite, Bild 34B) Zugabe von Chelex®-100. Die Phagentiter der seriellen Verdünnungsreihen sind angegeben. Die unterschiedlichen Nachweisgrenzen sind auf den Gelen mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.4.5 Ergebnisse des LAMP-Primersets für die hitzeresistenten Phagen

Die DNA-Sequenz im Bereich des *methylase*-Gens, welches bei allen vier hitzeresistenten Phagen vorkommt, aber darüber hinaus nur bei wenigen anderen Phagen (4.3.1, Abb. 40), wurde miteinander verglichen (Abb. 64). Das Alignment ergab, dass gerade im 5' Ende des *methylase*-Gens ein konservierter Bereich mit nur wenigen Variationen zwischen den Sequenzen liegt (Abb. 64). Für diesen Bereich wurden im Anschluss verschiedene Primersets mit dem Programm PrimerExplorer V4 (Tabelle 3, Abb. 16) generiert. Die Primersets wurden mit der extrahierten DNA der vier hitzeresistenten Phagen getestet. Dazu wurde ebenso vorgegangen wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben. Zunächst wurden die Primersets mit der DNA des Phagen P680 getestet und die positiven Sets wurden anschließend mit allen vier Phagen getestet. Dabei gelang es mit dem Primerset in Tabelle 19 alle vier Phagen in einer Reaktion nachzuweisen (Abb. 65). Die Positionen der Zielsequenzen der Primer im Bereich des Ziel-Gens sind in Abb. 64 dargestellt. Sie liegen alle nahe des 5' Ende des Ziel-Gens.

Mit dem Primerset aus Tabelle 19 wurden dann hitzesensitive Phagen der 936 Gruppe getestet von denen die Phagenisolate vorlagen. Zudem wurden noch die drei hitzeresistenten Phagen P956, P959 und P983 (Wagner *et al.*, 2017), für die im Laufe der Arbeit die Genome sequenziert wurden, getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass keiner der

getesteten hitzesensitiven Phagen und lediglich einer der neu isolierten hitzeresistenten Phagen durch die Primer nachweisbar waren (Tabelle 20). Die Primer wurden dann *in silico* mit allen verfügbaren Genomsequenzen der 936 Phagen auf ihre Fähigkeit in den Genomen zu binden getestet. Das Alignment in Abb. 66 stellt einen repräsentativen Ausschnitt dieses Alignments im Bereich der Zielsequenzen der Primer dar. Es wurden beim Primervergleich keine Mismatches zugelassen, so dass nur Primer gezeigt wurden die zu 100 % an diese Region binden können. Der Phage P956, positiv mit dem Primerset nachweisbar (Tabelle 20), zeigt nur bei vier der sechs Primerregionen 100 % Übereinstimmung (Abb. 66, blauer Kasten). Neben den vier hitzeresistenten Phagen zeigten zudem drei Phagen 100 % Übereinstimmung zu allen sechs Primerregionen. Einer der Phagen ist im Ausschnitt des Alignments dargestellt, der Phage KP793102 - PhiA.16 (Abb. 66, unterer roter Kasten). Die anderen beiden Phagen sind die Phagen KP793128 - PhiM.16 und der Phage KP793133 - PhiLj. Zudem gibt es weitere Primer bei denen 4 oder 5 der Zielregionen 100 % übereinstimmen.

Tabelle 19 LAMP-Primer für den Nachweis hitzeresistenter Phagen.

Primer	5' → 3' Sequenz	Länge
F3_Methyl (forward outer)	G Y AAGAAR A AGATAAGCAAGA A R A	24
B3_Methyl (backward outer)	AAGAACTC M TC W C K TGAA A Y	20
FIP_Methyl (forward inner)	TGTAATTGCTCC R CCACCTC- T T T T - TCAAACAGAACTTTGG Y ACA	44
BIP_Methyl (backward inner)	AGGATATAAC M AACGC W TTTGAACG- T T T T - AAT W AG S GT Y TT W ATCC A Y T C A C	54
LF_Methyl (loop backward)	CGAAR A TR R TCGTATATCG G Y	20



Abbildung 64 Alignment des in Abbildung 19 markierten Genbereiches der vier hitzeresistenten Phagen P680, P4565, P1532 und P656. Die Primer aus Tabelle 19 sind an den entsprechenden Zielsequenzen eingefügt.

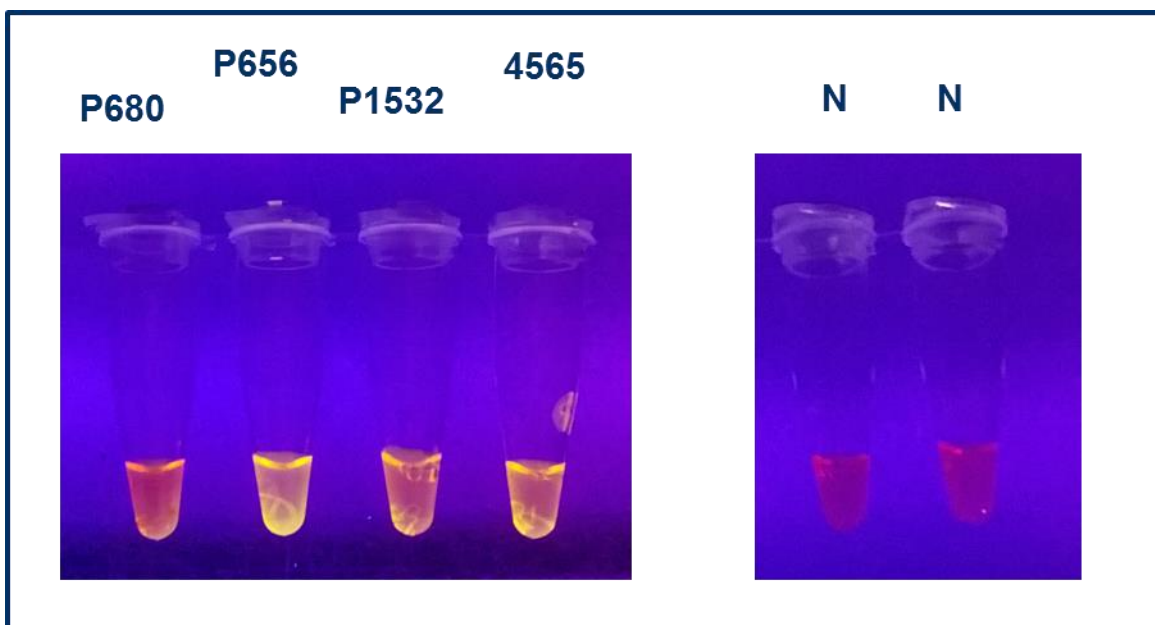


Abbildung 65 LAMP-Nachweis von vier hitzeresistenten 936 Phagen unter einer UV-Licht Quelle.

Tabelle 20 Test des Phagennachweises mit dem Primerset für hitzeresistente Phagen verschiedener 936 Phagen.

Phage	Hitzeresistenz	Referenz zur Hitzeresistenz	Nachweis
P656	+	(Atamer <i>et al.</i> , 2009a)	+
P680	+	(Atamer <i>et al.</i> , 2009a)	+
P1532	+	(Atamer <i>et al.</i> , 2009a)	+
P4565	+	(Atamer <i>et al.</i> , 2009a)	+
P008	-		-
P637	-	(Atamer <i>et al.</i> , 2009a)	-
P623	-	(Atamer <i>et al.</i> , 2009a)	-
P956	+	(Wagner <i>et al.</i> , 2017)	+
P959	+	(Wagner <i>et al.</i> , 2017a)	-
P983	+	(Wagner <i>et al.</i> , 2017a)	-

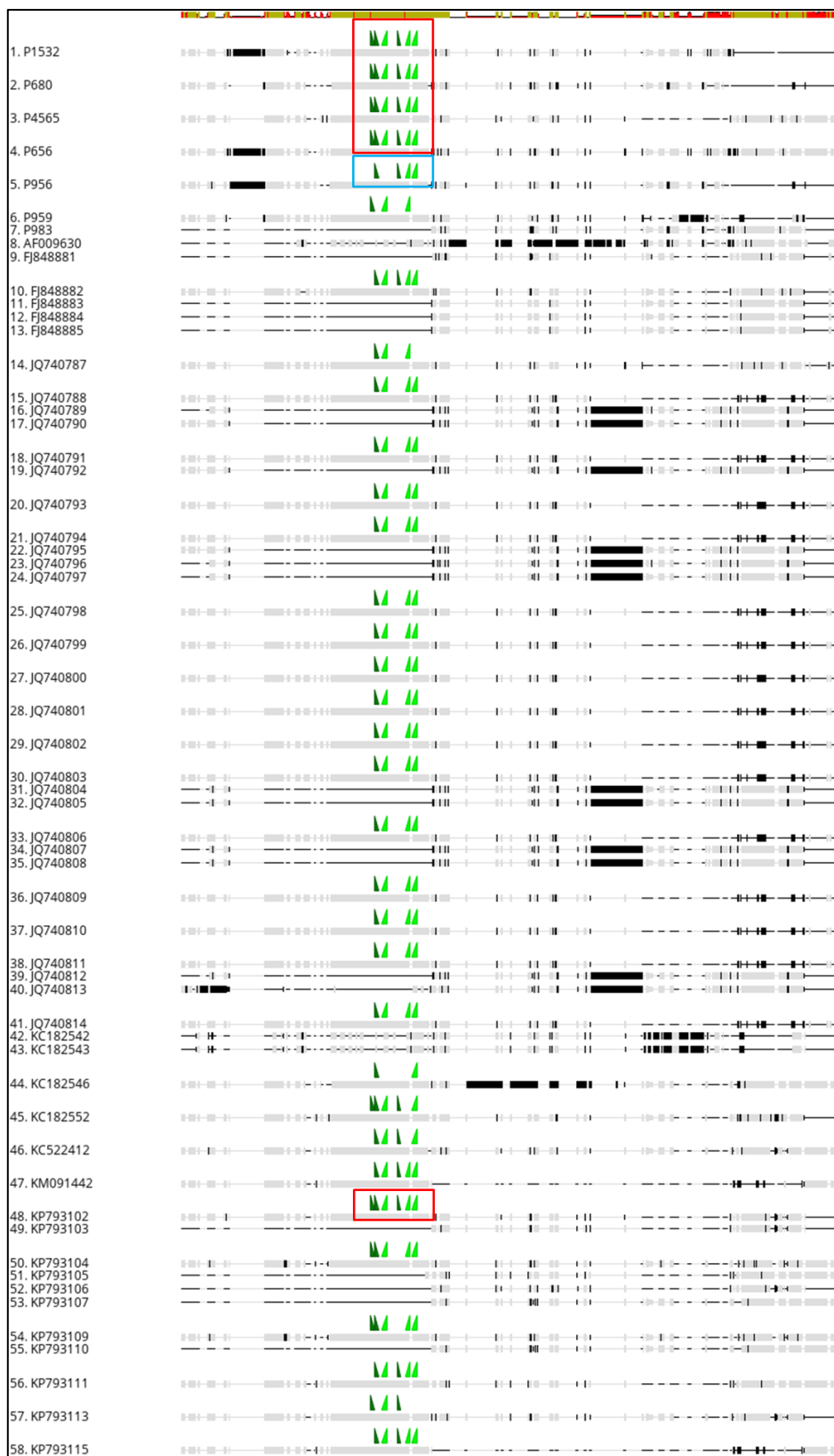


Abbildung 66 Ausschnitt eines Alignments von insgesamt 112 Phagengenomenen. Dargestellt sind 58 Genome. Die grünen Dreiecke markieren Regionen an denen die Primer mit einer Übereinstimmung von 100% binden können.

4.5 PCR Nachweis für *Leuconostoc* spp. Phagen

Der *Leuconostoc* Phage P965 (Abb. 17 G) konnte nicht durch das bestehende PCR Nachweissystem für *Leuconostoc* Phagen (Ali *et al.*, 2013) nachgewiesen werden. Gleiches galt für zwei weitere Phagen (Abb. 67 A, blaue Pfeile). Darüber hinaus konnten zwei Phagen nur schlecht nachgewiesen werden (Abb. 67 A, rote Pfeile).

Die Zielsequenz des PCR Systems wurde daher für die Sequenzen der beiden sequenzierten *Leuconostoc* Phagen (P965 und P974 (Abb. 17 G und 17 H)) und dem bereits publizierten und mit dem Nachweissystem gut detektierbaren Phagen LNTR2 (Accession Nr. NC_024389) verglichen. Dem Alignment (Abb. 68) ist zu entnehmen, dass sowohl im Bereich des forward Primers, als auch im Bereich des reverse Primers Unterschiede bei einzelnen Basen vorliegen (Abb. 68, graue Pfeile). Für den Primer bilden diese Stellen sogenannte *mismatches*. Diese sind bei den ursprünglichen Primern für den forward Primer (LnP-F) in Form von 2 Wobblebasen bereits berücksichtigt (Tabelle 7 und 21), beim reversen Primer (LnP-R) jedoch nicht.

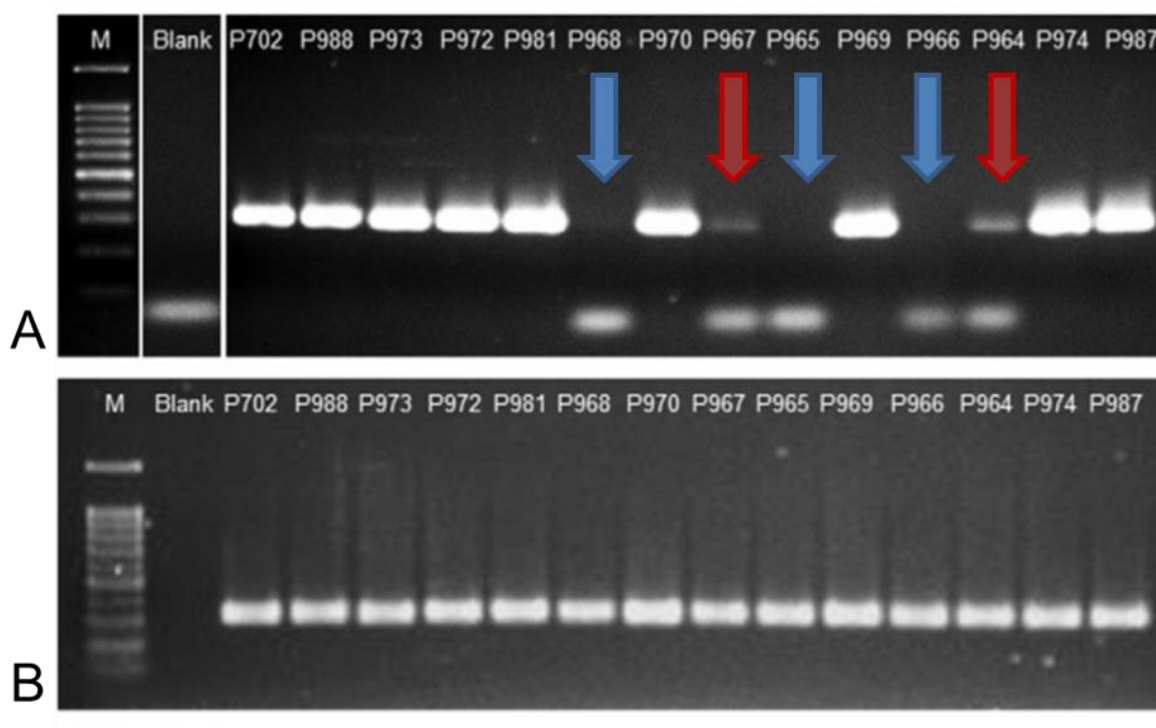


Abbildung 67 Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte von 14 *Leuconostoc* Phagen, mit den unmodifizierten Primern nach Ali *et al.* (2013) (A) und mit den modifizierten reversen Primer (B). Abbildung modifiziert nach Wagner, Brinks *et al.* (2017).

Tabelle 21 Primer für den *Leuconostoc* spp. Phagen PCR Nachweis. Wobble innerhalb der Sequenz sind hervorgehoben.

Primer	5' → 3' Sequenz	Quelle
LnP-F	TCAACNGGTGTNCAAAAAGTTT	Ali <i>et al.</i> (2013)
LnP-R	CTTCGTCTTCATCGTCACTTTC	Ali <i>et al.</i> (2013)
LnP-r-A	CYTCRTCTTCRTCRCTTTC	Wagner, Brinks <i>et al.</i> (2017)

Für den reversen Primer wurde ein modifizierter Primer generiert, welcher an den Stellen der *mismatches* über Wobble verfügt (Tabelle 21, LnP-r-A). In Abb. 67 sind die Ergebnisse einer PCR mit diesem modifizierten Primer dargestellt. Im oberen Teil der Abb. (67 A) ist das Primerpaar nach Ali *et al.* (2013) eingesetzt worden. Beim unteren Teil (67 B) ist der reverse Primer LnP-R durch den Primer LnP-r-A (Tabelle 21) ersetzt worden. Beim Einsatz des Primers LnP-R erzeugten drei der 14 getesteten *Leuconostoc* Phagen gar kein Signal (Abb. 67 A, blaue Pfeile) und zwei Phagen konnten nur sehr schwach nachgewiesen werden (Abb. 67 A, rote Pfeile). Nach dem Austausch des reversen Primers zeigten alle Phagen ein vergleichbar starkes Signal in der Gelelektrophorese (Abb. 67 B).

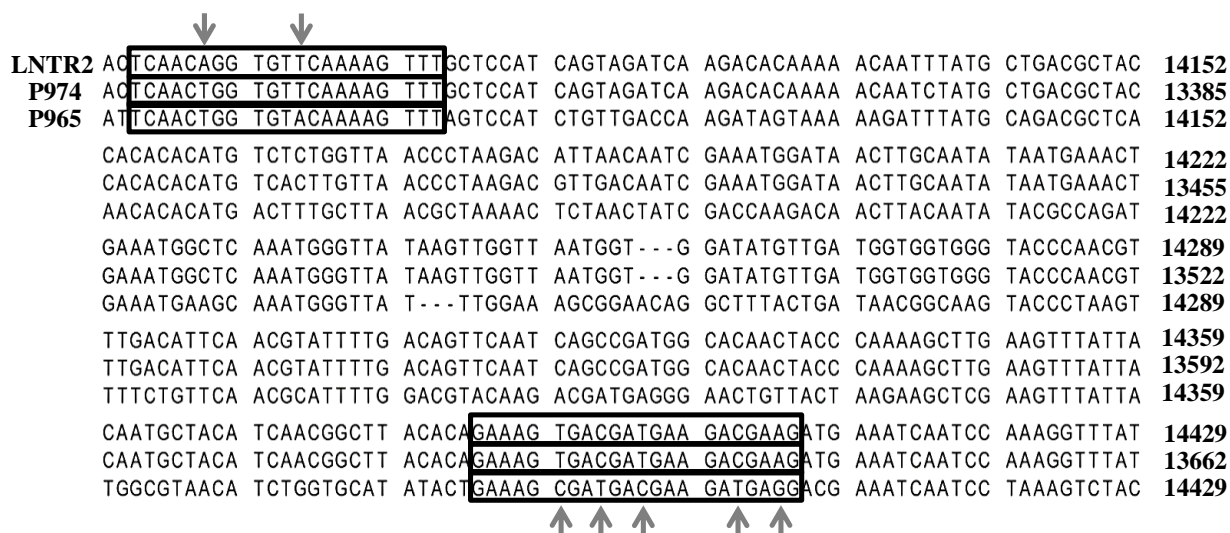


Abbildung 68 Alignment eines Bereiches des „major tail proteins“-Gens (*mtp*-Gen) von drei *Leuconostoc* Phagen. Die Umrandungen markieren die Zielregionen der Primer der PCR zum Nachweis der *Leuconostoc* Phagen (Ali *et al.*, 2013), die grauen Pfeile markieren die Basen an denen es zu *mismatches* innerhalb des Alignments der Primerregionen gekommen ist. Abbildung aus Wagner, Brinks *et al.* (2017)

5. Diskussion

5.1 Phagenmorphologie und Vorbereitung für die Sequenzierung

Die Überprüfung der Phagenmorphologie diente der Kontrolle um zum einen gereinigte, in hohem Maße intakte Phagenlysate für die Sequenzierung bereitzustellen und zum anderen, um auszuschließen, dass es während der Anzucht zu Kontaminationen gekommen sein könnte. Bei allen Phagen zeigte sich die bereits bekannte und daher erwartete Morphologie. Da in der genetisch homologen 936 Phagengruppe (Murphy *et al.*, 2016) die einzelnen Phagen morphologisch kaum voneinander zu unterscheiden waren (Abb. 17 A, B und C), wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Die unterschiedlichen Bandenmuster in Abb. 18 bestätigten, dass die drei Phagen, wenn auch morphologisch sehr ähnlich, genetisch unterschiedlich sind.

Um zu gewährleisten, dass während der Vorbereitung der Sequenzierung (*library preparation*) alle Proben ungefähr gleich verteilt werden können, muss der DNA Gehalt bekannt sein. Die ungefähre Größenangabe der Genome spielte ebenfalls eine wichtige Rolle. Aus den Werten von Genomgröße und DNA Konzentration ließ sich schließlich die Stoffmenge ermitteln um so annähernd äquimolare Verdünnungen der Proben für die *library preparation* herstellen zu können.

Zur Abschätzung der Genomgrößen wurde die PFGE verwendet. Diese Methode erlaubt durch sehr große Gele und die Impulsspannungen, die periodisch aus verschiedenen Richtungen kommen, eine sehr feine Auftrennung selbst großer DNA-Fragmente bis in den Megabasen Bereich. Diese Methode zählt zu den Fingerprinting Methoden und wird normalerweise verwendet, um Restriktionsmuster von Bakterien zu erstellen und anhand dieser die Bakterien einzuordnen (Birren und Lai, 1994). Die PFGE galt bei pathogenen Bakterien als „Goldstandard“ der Differenzierung von Stämmen einer Spezies (Heller *et al.*, 2013).

Für die Bestimmung der verhältnismäßig kleinen Phagen Genome wurden die intakten Genome aufgetragen und die Möglichkeit der feinen Auftrennung durch die Impulsspannung genutzt. Die Auftrennung lieferte eine realistische Größeneinschätzung der Genomgrößen (Abb. 19, Tabelle 11 und 12), was die tatsächlichen Genomgrößen von

7 sequenzierten Phagen bestätigten (Tabelle 12). Die beiden größten aufgetragenen Genome ließen sich jedoch nicht über die PFGE auftrennen. Obwohl die Überprüfung über die Gelelektrophorese ergab, dass es sich um intakte DNA handelte, war keine distinkte Bande auf dem Gel zu identifizieren, sondern nur ein „Schmier“ im unteren Bereich des Gels (Abb. 19, Spuren 1,5 und 8). Für Bakterien ist dieses eher ungewöhnliche Phänomen bekannt und Stämme die einen solchen „Schmier“ zeigen werden als *untypeable strains*, also unbestimmbare Stämme bezeichnet. Es wird vermutet, dass bei der Elektrophorese nukleolytische Peressigsäure-Derivate des im TBE Puffer enthaltenen Tris entstehen, auf die bestimmte DNA-Moleküle empfindlich reagieren (Ray *et al.*, 1995, Corkill *et al.*, 2000, Koort *et al.*, 2002, Khan und Kuzminov, 2017). Ob dies auch auf die beiden Phagen P596 und P1048 zutrifft ließe sich überprüfen indem man Thioharnstoff zu dem Gel gibt, was empfindliche DNA schützt (Corkill *et al.*, 2000, Romling und Tummler, 2000). Da die DNA der Phagen jedoch bereits sequenziert und das Abschätzen der Genomgröße unter Berücksichtigung der nächsten bekannten Phagen in diesem Fall erfolgreich war, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen hierzu durchgeführt.

5.2 Sequenzanalysen

Die Phagengenome wurden durch das „Danish National High-Throughput DNA Sequencing Centre“ (Universität Kopenhagen) nahezu vollständig sequenziert und zusammengesetzt. Im Laufe der Analysen zeigte sich, dass beim Phagen P1046 ein Stück des Phagengenoms fehlte (siehe Kapitel 4.2.3 und 5.2.1.2). Diese konnte über eine PCR erfolgreich amplifiziert werden und mittels Sanger Sequenzierung sequenziert werden. Dennoch konnten alle Phagengenome mit dem Programm myRAST erfolgreich annotiert werden, was die Überprüfung der Annotationen durch ein Alignment mit den jeweils nächsten verwandten Phagen zeigte. Durch die manuelle Überprüfung konnten auch einzelne nicht durch die Software erkannte, jedoch beim nächsten Verwandten beschriebene, orfs hinzugefügt werden.

5.2.1 Genetische Charakterisierung seltener *Lactococcus lactis* Phagen

Über die seltenen *L. lactis* Phagen liegen nur unzureichende Informationen vor. Zu Beginn dieser Arbeit lagen für die Phagengruppen P087 und 949 für jeweils nur ein Mitglied dieser Gruppen Genomsequenzen vor.

Im Laufe der Arbeit wuchs jedoch die Anzahl der publizierten Sequenzen der seltenen Phagen. Aktuell liegen bereits 8 Sequenzen für die Phagengruppe P087 (Abb. 20) und sogar 14 Sequenzen für die Phagengruppe 949 (Abb. 23) vor. Dieses vermehrte Auftreten von Isolaten seltener Phagen bestätigen die Notwendigkeit auch diese genauer zu betrachten.

5.2.1.1 Die seltenen *L. lactis* Phagengruppen P087 und 949

Die Ergebnisse für den Phagen P087 zeigen, dass die bisher isolierten Mitglieder dieser Gruppe eine sehr homogene Gruppe darstellen. Lediglich der Phage LW4 clustert deutlich von den anderen Phagen entfernt (Abb. 20). Auch der direkte Vergleich zwischen dem Phagen P596 und dem nächsten Verwandten, dem Phagen P087, zeigt eine hohe Übereinstimmung der Genome. Sie unterscheiden sich im Vorhandensein bzw. Fehlen von 12 orfs. Der Phage P087 verfügt über das größere Genom und damit über neun orfs die nicht beim Phagen P596 vorkommen. Von diesen 12 orfs ist zum jetzigen Zeitpunkt nur von zwei eine Funktion bekannt.

Betrachtet man darüber hinaus die Rezeptor-Binde-Proteine der Phagengruppe so ist auffällig, dass es kaum Unterschiede innerhalb der Phagengruppe gibt (Abb. 22).

Das Rezeptor-Binde-Protein (RBP) ist an der Basisplatte lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Infektion der Wirtszelle (Dupont *et al.*, 2004, Bebeacua *et al.*, 2013b). Gerade im C-terminalen Bereich führen Unterschiede zu unterschiedlichen Wirtsspektren. Da es für diese Phagengruppe nur minimale Unterschiede gibt, kann davon ausgegangen werden, dass sie in ihrem Wirtsspektrum sehr ähnlich sind.

Das ein solcher Schluß aus der *in silico* Analyse in der Realität nicht unbedingt zutrifft, zeigen Mahony *et al.* (2017). In Ihrer Arbeit wurden, abgesehen von den Phagen LW1 und dem Phagen P596 aus dieser Arbeit, alle anderen Phagen hinsichtlich ihres Wirtsspektrums analysiert (Abb. 69). Trotz eines sehr ähnlichen RBP, mit 99 % Sequenzähnlichkeit, zeigten die Phagen LW31, LW32 und LW33 ein anderes Wirtsspektrum als die Phagen AM6 und AM7 (Abb. 69, orangener Kasten). Diese Phagen bilden jeweils ein Cluster in Abb. 20, zeigen jedoch bei der Analyse des RBP nahezu keine Abweichungen. Lediglich der Phage AM6 hat eine unterschiedliche Base im C-terminalen Bereich (Abb.22).

Phage	Phage Titre on Lactococcal Strains (pfu·mL ⁻¹)															
	CWPS A Strains			CWPS B Strains					CWPS C Strains							
	SMQ-86	SMQ-562	WMI	275	UC77	IL1403	223	3107	KH	NZ9000	R1k10	W34	FD13	JM3	1196	158
R31 ^a	4 × 10 ⁸							6 × 10 ⁸								
R3.4 ^a	3 × 10 ⁷							2 × 10 ⁸								
LW31 ^b	2 × 10 ⁷	3 × 10 ⁶			2 × 10 ²			4 × 10 ⁷								
LW32 ^b	2 × 10 ⁷	4 × 10 ⁶			1 × 10 ²	4 × 10 ⁴		3 × 10 ⁷								
LW33 ^b	4 × 10 ⁷	3 × 10 ⁶			1 × 10 ²	3 × 10 ⁴		4 × 10 ⁷								
LW4 ^b	3 × 10 ⁷	2 × 10 ⁶			3 × 10 ²	7 × 10 ³		5 × 10 ⁷								
AM6 ^b	4 × 10 ⁷															
AM7 ^b	2 × 10 ⁶								2 × 10 ³							
LW81 ^c	4 × 10 ⁷	5 × 10 ⁵			3 × 10 ⁶	4 × 10 ⁶	6 × 10 ⁸				2 × 10 ⁵					
AM1 ^c	8 × 10 ⁵		2 × 10 ⁵				4 × 10 ⁷	1 × 10 ⁴	1 × 10 ³			2 × 10 ³				
AM2 ^c	7 × 10 ⁵		7 × 10 ⁴				8 × 10 ⁷					5 × 10 ³	1 × 10 ⁵			
AM3 ^c	3 × 10 ⁵		9 × 10 ⁴				5 × 10 ⁷	3 × 10 ⁵				1 × 10 ³	1 × 10 ⁴			8 × 10 ²
AM4 ^c							2 × 10 ⁷									
AM5 ^c							3 × 10 ⁷					3 × 10 ⁴				
AM8 ^c	5 × 10 ⁷		3 × 10 ⁵	1 × 10 ³			4 × 10 ⁶	1 × 10 ⁵				4 × 10 ⁴	9 × 10 ⁴			
AM9 ^c	9 × 10 ⁷		8 × 10 ⁵				1 × 10 ⁷	2 × 10 ⁶	1 × 10 ³			1 × 10 ³	2 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	7 × 10 ²	9 × 10 ⁴
AM11 ^c			3 × 10 ⁵				7 × 10 ⁷					5 × 10 ⁴				
AM12 ^c					5 × 10 ⁵		9 × 10 ⁷									

Das unterschiedliche Wirtsspektrum lässt sich bei der P087 Gruppe demnach nicht alleine mit dem RBP erklären. Es wird daher vermutet, dass wirtseigene Phagenresistenzsysteme wie DNA Modifikationen, Restriktionssysteme oder „*abortive infection systems*“, welche durch den gezielten Zelltod eine Ausbreitung bestimmter Phagen in der Population verhindern kann, vorliegen könnten. Diese Systeme könnten die Infektion der Wirtsstämme durch bestimmte Phagen verhindern. (Mahony *et al.*, 2017). Bei den Phagen der Phagengruppe 949 sind die Unterschiede zwischen den Genomsequenzen der Phagen größer. Im Stammbaum in Abb. 23 zeigt sich bereits eine größere Diversität. Der Stammbaum beinhaltet jedoch auch 14 Genomsequenzen im

Vergleich zu 8 Genomsequenzen beim Phagen P087. Es ist also denkbar, dass auch innerhalb der Phagengruppe P087 die Heterogenität mit weiteren Sequenzdaten steigt.

Vergleicht man den Phagen P1048 mit seinem nächsten Verwandten, dem Typphagen 949, sind die Unterschiede ebenfalls deutlich größer als bei der P087 Phagengruppe.

Im Bereich der Strukturproteine zeigen sich wenige Unterschiede zwischen den beiden Phagen (Abb. 24). Insgesamt fehlen dem Phagen 949 allerdings 46 orfs, die beim Phagen P1048 auftreten umgekehrt sind es 27 orfs (Anhang 3).

Zudem sind in Abb. 26 gerade im Bereich des C-terminalen Bereiches des RBP Unterschiede zu erkennen. Wie auch bei der Phagengruppe P087, sind die AS-Sequenzen einiger RBP der 949 Phagengruppe identisch (Kapitel 4.2.2, Abb. 25). Obwohl die Sequenz identisch ist, haben auch diese Phagen ein unterschiedliches Wirtsspektrum (Abb. 69, blauer Kasten). Anhand des Phagen LW81 bestätigt sich hier allerdings, dass Phagen mit stark abweichender RBP AS-Sequenz auch ein anderes Wirtsspektrum haben. Auch die Phagen AM4 und AM5 weichen von den anderen Phagen ab, haben allerdings kein identisches Wirtsspektrum, trotz 100 %iger Sequenzübereinstimmung. Besonders deutlich wird dies beim Phagen AM12 im Vergleich zum Phagen AM1, beide haben eine identische AS-Sequenz, dabei aber ein sehr unterschiedliches Wirtsspektrum (Abb. 25 und Abb. 69, blauer Kasten). Auch hier diskutieren Mahoney *et al.* (2017) über wirtseigene Phagenresistenzsysteme.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die in dieser Arbeit sequenzierten Phagen P596 und P1048 große Ähnlichkeit mit den Namensgebern ihrer jeweiligen Phagengruppen aufweisen. Zudem sind mit mehr bekannten Vertretern auch mehr Varianzen innerhalb der Gruppen festzustellen, was der Vergleich der P087 Phagengruppe mit der 949 Phagengruppe zeigt.

Das schnelle Wachstum der Anzahl neuer Sequenzen dieser Gruppe lässt vermuten, dass die Anzahl der Vertreter beider seltener Phagengruppen zukünftig noch weiter ansteigen wird, was weitere Einblicke in diese Phagengruppen zulässt. Dabei helfen auch die beiden in dieser Arbeit generierten Genomsequenzen.

5.2.1.2 Zwei Phagen freigesetzt aus einem Wirt (P1045 und P1046)

Die beiden Phagen P1045 und P1046 wurden, nach Induktion mit Mitomycin C, im Überstand des *L. lactis* Stamms MBT75 elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Um herauszufinden wie zwei sowohl morphologisch-, als auch genetisch unterschiedliche Phagen aus einem Wirstamm freigesetzt werden, wurde zunächst die Genomsequenz der Phagen analysiert.

Das Genom des Phagen P1046 verfügt über Reste eines Lysogeniemoduls, welches auf einen lysogenen Lebenszyklus hindeutet. Dieser Rest eines Lysogeniemoduls beschränkt sich jedoch auf ein potentiell Antirepressor-Gen beim nächsten Verwandten - dem Phagen 1706. Im Phagen P1046 selber ist dieser Bereich zwar sehr eng mit dem beim Phagen 1706 verwandt, codiert jedoch durch eine Punktmutation zwei Gene (Abb. 27).

Für den Phagen P1045 ließen sich keine Gene finden, die für den lysogenen Lebenszyklus notwendig sind. Das lässt vermuten, es handelt sich bei dem Phagen P1045 um einen virulenten Phagen, welcher nicht aus dem Stamm freigesetzt wurde, sondern bereits in der Kultur vorhanden war und sich dort lytisch vermehrt hat. Dies scheint er jedoch nur sehr langsam oder ineffizient zu tun, da die Kultur ohne Phagen-Induktion durch Mytomycin C wachsen konnte.

Bei Hybridisierungsversuchen wurde die verdaute DNA des potentiell lytischen Phagen P1045 als Sonde eingesetzt. Die Sonde hybridisierte nicht mit der DNA des Ursprungstamms, was die Vermutung bekräftigt, es handle sich um einen lytischen Phagen. Der Einsatz der verdauten DNA des Phagen P1046 als Sonde, lieferte dabei ein überraschendes Bild. Die DNA hybridisierte, wie erwartet, mit der DNA des Ursprungstamms MBT75, jedoch auch mit einer Bande der extra aufgetragenen Plasmid-Fraktion des Ursprungstamms (Abb. 29).

Das positive Signal der Plasmid-Fraktion könnte auf einen alternativen Vermehrungsmechanismus der Phagen hindeuten. Der Prophage könnte als sog. Plasmid-Prophage vorliegen, also ein Prophage der nicht im Genom des Wirts integriert war, sondern als Plasmid im Wirt vorlag (Abb. 70). Dieser Vermehrungszyklus wird in der Literatur oft als eine Art der Pseudolysogenie bezeichnet (Abedon, 2009), auch der Begriff *carrier state* wird im Zusammenhang mit dem Zustand der Plasmid-Prophagen verwendet (Ackermann und DuBow, 1987, Siringan *et al.*, 2014).

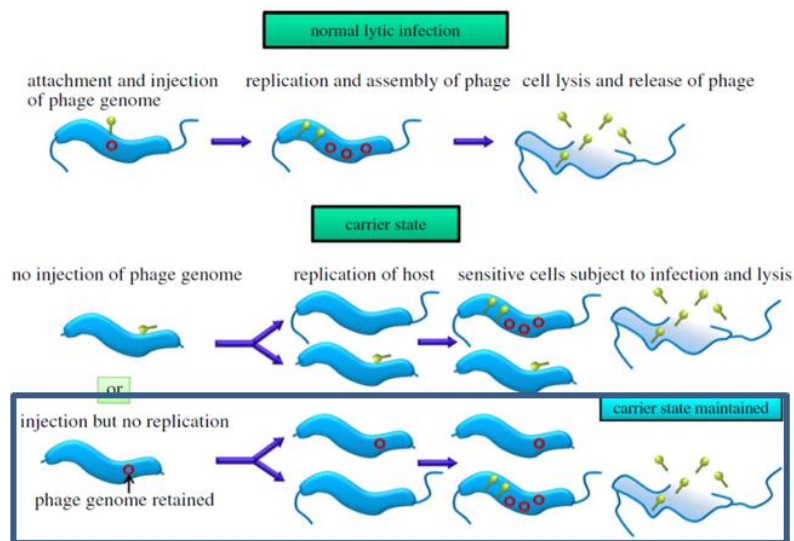


Abbildung 70 Alternative Lebenszyklen von Bakteriophagen. Blau markiert ist der Lebenszyklus eines Plasmid-Prophagen. Mod. nach Siringan *et al.* 2014.

Die Sequenzierung des Ursprungstamms MBT75 erhärtete dabei die Theorie eines Plasmid-Prophagen. Bei der Sequenzierung wurde ein einzelnes Contig als Prophage identifiziert (Abb. 30, 31 und 32). Dieses Contig zeigte keine Überlappungen mit anderen Bereichen des Genoms des Ursprungstamms MBT75 und die Annotation zeigte ausschließlich phagenassoziierte Gene auf dem Contig. Zudem hatte das Contig eine um mehr als das 10fache erhöhte Coverage im Vergleich zu den anderen Contigs (Tabelle 13), was einen weiteren Hinweis auf ein Plasmid lieferte. Bei der Illumina Sequenzierung liegt die Coverage der einzelnen Contigs von einer chromosomalen Ausgangs-DNA in der Regel in einem sehr engen Bereich und schwankt selten über 10 % des Mittelwertes. Weicht die Coverage jedoch stark von diesem Mittelwert ab, dann kann dies auf ein Plasmid hindeuten (Antipov *et al.*, 2016).

Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei dem Phagen P1046 nicht um einen klassischen temperenten Phagen handelt ist das Fehlen einer *attachment site* (Abb. 31). Eine *attachment site* wird von einer Integrase benötigt um Phagen-DNA in die Wirts-DNA

einzubauen (Madigan *et al.*, 2006). Eine solche Integrase fehlt darüber hinaus sowohl beim Phagen als auch im Prophagen.

Wie bereits erwähnt liegt beim Phagen P1046 ein potentielles Antirepressor-Gen in zwei orfs vor. Ein Alignment mit dem contig 11 des Wirtsstamm MBT75 in diesem Bereich zeigte jedoch, dass das Gen im potentiellen Plasmid-Prophagen als einzelner orf vorliegt und eine Punktmutation in der Phagensequenz für ein entstehendes Stopcodon sorgt (Abb. 33). Das heißt aber auch, dass dem Prophagen das potentielle Antirepressor-Gen zur Verfügung steht. In der Literatur lassen sich Hinweise finden, dass die Antirepressor-Gene zur Induktion eines Plasmid-Prophagen notwendig sind (Mardanov und Ravin, 2007). Bei dieser bisher beschriebenen Prophagen Genregulation handelt es sich um einen *E. coli* Plasmid-Prophagen.

Für *L. lactis* Stämme sind, soweit bekannt, keine Daten zu Plasmid-Prophagen vorhanden, so dass der hier vorliegende Phage P1046 den ersten beschriebenen *L. lactis* Plasmid-Prophagen darstellt.

5.2.2 Hitzeresistenz der 936 Phagengruppe

Die *in silico* Untersuchungen der Genomsequenzen der drei hitzeresistenten Phagen (P1532, P656, P4565) auf der Suche nach einer Ursache für die extreme Hitzeresistenz dieser Phagen, zeigten das Fehlen von für den Phagen nicht essentieller Gene bzw. zusätzliche nicht essentielle Gene. Dem Phagen P656 fehlt zum Beispiel das NPS-Gen (Abb. 38, grüne Kästen markieren das vorhandenen NPS-Gen bei den anderen Phagen; Abb. 39). Beim Phagen P4564 liegt dagegen ein Gen doppelt vor (Abb. 38, roter Kasten zusätzlich zum blauen). Diese Abweichungen konnten die schwankenden Genomgrößen der untersuchten, hitzeresistenten Phagen erklären, lieferten jedoch keinen Hinweis auf eine erhöhte Hitzeresistenz. Bei der Betrachtung der Genomgrößen musste berücksichtigt werden, dass es sich bei der 936 Phagengruppe um *cos*-Phagen handelt. Bei *cos*-Phagen wird das bei der Replikation entstehende Phagengenom DNA-Concatamer immer an derselben Erkennungssequenz, der „*cos-site*“, geschnitten. Dabei schneidet das dafür zuständige Terminase Protein die Einzelstränge der doppelsträngigen DNA leicht versetzt, so dass die geschnittene DNA kohäsive Enden (engl. cohesive ends, kurz „*cos*“) aufweisen. Bei diesen Phagen wird demnach also immer

exakt ein Genom-Äquivalent in das Kapsid gepackt. Anders als beim sogenannten *full head* Mechanismus, bei dem solange DNA in das Kapsid geschleust wird, bis das Kapsid „voll“ ist, wobei mehr als 100 % des Phagengenoms im Kapsid vorliegen können.

Bei den hier vorliegenden *cos*-Phagen lag die Vermutung nahe, dass bei gleicher Kapsidgröße bei Phagen mit einem größeren Genom ein höherer Druck im Inneren des Kapsids vorherrscht. Dieser Druckunterschied könnte daher zu unterschiedlichen Reaktionen bei Hitze führen. Der Vergleich der Genomgrößen zeigte jedoch, dass die Genome der hitzeresistenten Phagen (Tabelle 12) genau in der Spannweite der Genomgrößen der übrigen, nicht-hitzeresistenten Vertretern der 936 Phagengruppe lagen. Die Genomgröße der Phagen lässt demnach keinen direkten Schluss über die Hitzeresistenz der Phagen zu.

Die genaueren Untersuchungen wichtiger Strukturproteine der Phagen hinsichtlich ihrer *in silico* kalkulierten isoelektrischen Punkte für eine Auswahl an Phagen der 936 Gruppe (Kapitel 4.3.2), und der damit verbundenen Oberflächenladungen der Proteine, lieferten ebenfalls keinen direkten Hinweis auf die Hitzeresistenz einzelner Phagen. Für die isoelektrischen Punkte der 936 Phagengruppe ließen sich Varianzen sowohl bei den hitzeresistenten als auch anderen Vertretern identifizieren, was deutlich in Abb. 41 für die verglichenen Strukturproteine, wie das *portal protein*-Gen zu erkennen ist.

Die phylogenetischen Analysen der Strukturproteine zeigten für drei der vier Strukturproteine, dem *mcp*, dem *RBP* und dem *Tmp*, dass diese Proteine der hitzeresistenten Phagen nicht in einem Cluster liegen. Somit standen sie in keinem eindeutigen Zusammenhang innerhalb der hitzeresistenten Phagen und ließen keinen Schluss auf ihre Hitzeresistenz zu.

So liegen die hitzeresistenten Phagen in der phylogenetischen Analyse des *Mcp* in den beiden großen Clustern verteilt (Abb. 43). Beim *RBP* liegt nur der Phage P4565 in einem anderen großen Cluster, die übrigen hitzeresistenten Phagen liegen in einem großen Cluster, dort jedoch verteilt (Abb. 46).

Beim *tmp* liegt der extrem hitzeresistente Phage P1532 mit dem etwas weniger hitzeresistenten Phagen P656 in einem anderen Cluster als die extrem hitzeresistenten Phagen P680 und P956, die mit dem Phagen P959 nah beieinander clustern. Der Phage P4565 liegt wiederum in einem weiteren Cluster (Abb. 45).

Es konnte daher für alle drei Proteine gefolgert werden, dass sie keine Besonderheiten aufweisen, die ausschließlich bei hitzeresistenten Phagen gefunden werden.

Dennoch wird dem Tmp-Protein in der Literatur eine Funktion bei der Hitzeresistenz der Phagen zugesprochen (Geagea *et al.*, 2018). In der entsprechenden Arbeit wurde ein Vertreter der 936 Phagengruppe, der Phage CB14, ausgewählt um zu untersuchen, ob hitzeresistente Mutanten dieses Phagen gefunden werden können.

Der ausgewählte Phage CB14 lag bei einer Analyse der konkatenierten Strukturproteine der Phagengruppe allerdings nicht in einem Cluster mit den nächsten Verwandten des hitzeresistenten Phagen P1532 (Abb. 71). Er hatte lediglich denselben Wirt wie die Phagen CB13, SL4, CB19 und CB20, die alle eine höhere Verwandtschaft zum Phagen P1532 zeigten (Abb. 71, lila Kreis). Zudem zeigte er die stärkste Reduktion bei den durchgeführten Erhitzungsversuchen (Abb. 72). Aus Phagenlysaten, die nach einer Erhitzung für 5 min bei 100 °C noch aktiv Plaques bildeten, konnten hitzeresistentere Phagen selektiert werden. Abb.

73 zeigt die Ergebnisse der Hitzeinaktivierung dieser gering hitzeresistenten Phagen: Die Mutante CB14a wurde bei gleichen Bedingungen bei 70 °C für 5 min um ca. eine log Stufe weniger inaktiviert als der Wildtyp CB14 Phage - die Mutante CB14b sogar um mehr als eine log Stufe.

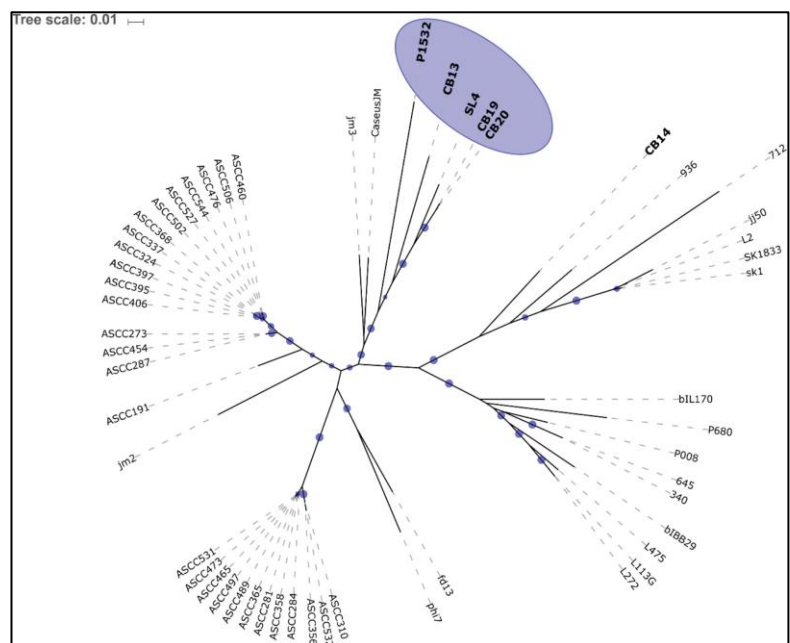


Abbildung 71 Stammbaum der konkatenierten Strukturproteine von 54 Phagen der 936 Phagengruppe, fett gedruckt sind die Phagen der Studie (Geagea *et al.*, 2018).

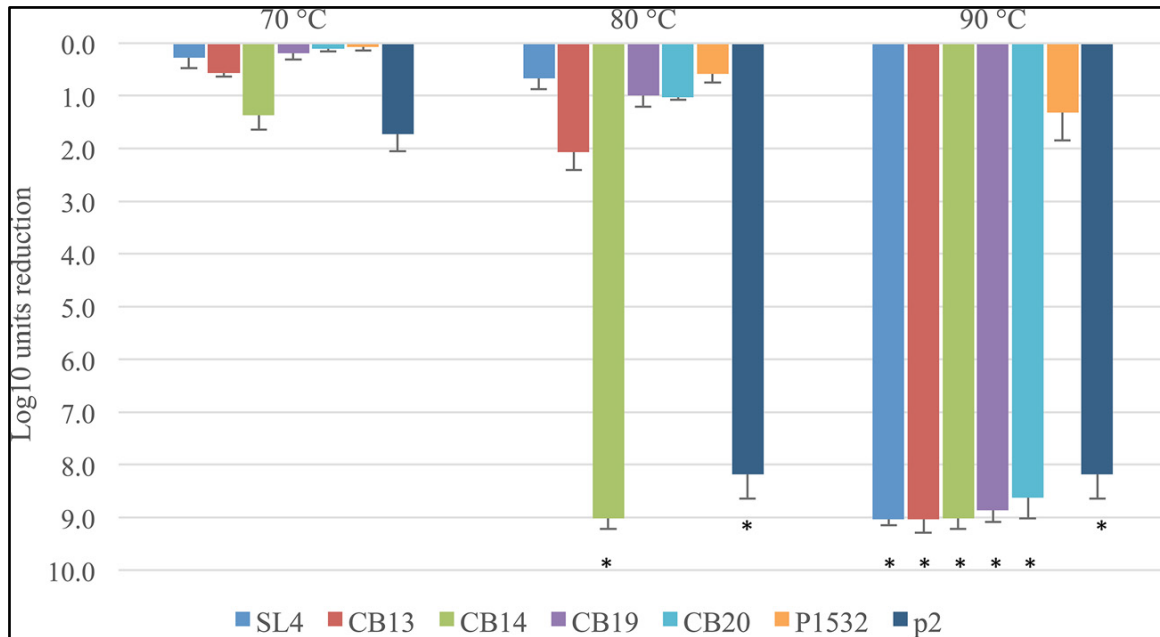


Abbildung 72 Log-Stufen-Inaktivierung der untersuchten Phagen bei 70 °C, 80 °C und 90 °C (Geagea *et al.*, 2018)

Bei 75 °C war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Alle Phagen wurden um mehr als 6 log-Stufen reduziert. Bei weiteren Erhitzungsversuchen auf 80 °C für 5 min wurden alle Phagen gänzlich (um mehr als 8 log-Stufen) inaktiviert (nicht dargestellt in Abb. 73). In den Analysen der Strukturproteine konnten Geagea *et al.* (2018) für beide Mutanten jeweils eine Deletion von 120 bp im *tmp*-Gen an den Positionen 13807 (CB14a) und 13792 (CB 14b) identifizieren. Diese lagen bei den Mutanten nicht an derselben Stelle, waren jedoch beide gleich lang. Aufgrund der leicht erhöhten Hitzeresistenz der Mutanten und der auffälligen Deletion schlossen Geagea *et al.* (2018), dass dem TMP eine wichtige Rolle bei der Hitzeresistenz der Phagen der 936 Phagengruppe zukommt.

Durch eigene Untersuchungen mit Mutanten des Phagen P008 in Kapitel 4.3.4.2, von denen eine Mutante ebenfalls eine Deletion im *tmp*-Gen

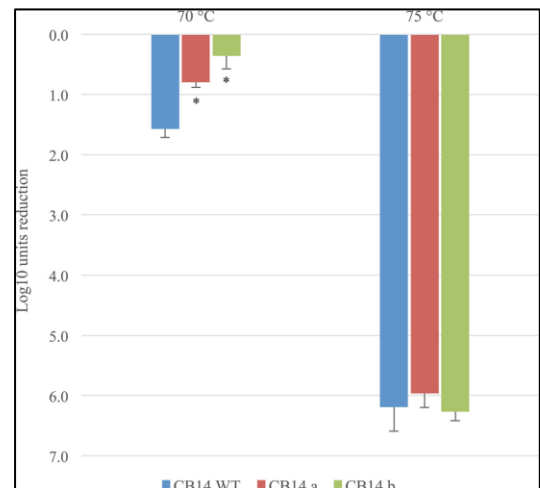


Abbildung 73 Inaktivierung der Phagen CB14 WT (blau), CB14 a (rot) und CB14 b (grün) bei 70 °C und bei 75 °C (Geagea *et al.*, 2018).

aufwies, konnte diese Funktion im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In Abb. 56 sind die Ergebnisse von Erhitzungsversuchen des Phagen P008 und von zwei

Mutanten (P008-M1 und P008-M2) zu sehen. Beide Mutanten wiesen eine Punktmutation im *tmp*-Gen an Position 10529 des Genoms des Phagen P008 auf. Zudem hat eine Mutante (P008-M2) eine Deletion von 240 bp (Tabelle 15 und Abb. 51) an Position 11070 des Genoms des Phagen P008 (Bebeacqua *et al.*, 2013a).

In den mit diesen Phagen durchgeführten Erhitzungsversuchen zeigte keine der Mutanten einen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz. Zudem konnten wir *in silico*, durch ein Alignment aller zur Verfügung stehender *tmp*-Gen Sequenzen zeigen, dass Deletionen nicht bei allen bekannten hitzeresistenten Phagen vorkommen, sondern auch bei hitzesensitiven Phagen, wie den P008 Mutanten, zu finden sind.

Weitere *in silico* Untersuchungen der Strukturproteine auf AS- und Nukleotid-Sequenzebene zeigten allerdings auffällige Varianzen beim Portal Protein. In Abb. 50 ist ein phylogentisches Dendogramm der Portal Protein AS-Sequenzen aller zur Verfügung stehenden Vertreter der 936 Phagen dargestellt. Die hitzeresistenten Vertreter bilden ein Cluster, in dem neben den Portal Proteinen der vier besonders hitzeresistenten Phagen (P680, 1532, P4565, P656) auch die der neu isolierten hitzeresistenten Vertreter (P956, P983, P959, (Wagner *et al.*, 2017)) liegen.

In diesem Cluster sind zudem die Portal Proteine einiger weiterer Phagen (Tabelle 15) zu finden, unter anderem auch die der Phagen SL4, CB19 und CB20 (Abb. 50). Für diese Phagen wurden in Geagea *et al.* (2018) Daten zur thermischen Inaktivierung publiziert (Abb. 74). Neben dem extrem hitzeresistenten Phagen P1532 zeigen sie die geringste Inaktivierung bei 80 °C für 5 Minuten, womit sie zu den hitzeresistenten Phagen gezählt werden (Atamer *et al.*, 2009a).

In Abb. 49 sind die prozentualen Ähnlichkeiten der Portal Proteine einer Auswahl von Phagen verglichen worden. Die beiden gerade erwähnten Phagen CB19 und CB20 haben demnach eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den

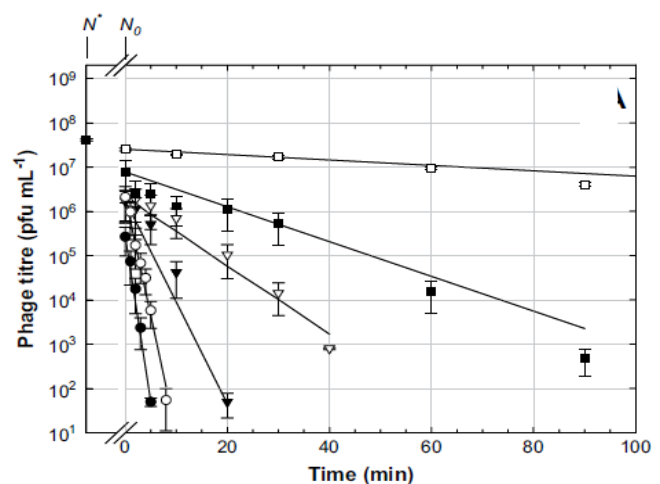


Abbildung 74 Thermische Inaktivierung des Phagen P1532 in Magermilch bei 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 95 °C und 97 °C. Nach Atamer *et al.*, 2009a.

hitzeresistenten Phagen und bestätigen die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen (Abb. 50).

Das Portal Protein ist für die Verbindung von Phagenkopf und Phagenschwanz verantwortlich, zudem spielt es eine Rolle bei der Injektion der DNA in die Wirtszelle. Der morphologische Vergleich eines hitzesensitiven (P008) und eines hitzeresistenten Phagen (P1532) während einer thermischen Inaktivierung, zeigte bei gleicher prozentualer Inaktivierung der Phagen in ddH₂O einen Unterschied in der Morphologie der Phagen, beim hitzensensitiven Phagen (P008) liegen defekte leer Köpfe vor, während der hitzeresistente Phagen überwiegend intakte Phagenpartikel vorliegen (Abb. 53 und Abb. 54).

Bei dem Versuch wurde der Phage P1532 stärker inaktiviert als erwartet. Dies lässt sich vor allem durch das Medium in welchem die Versuche durchgeführt wurden erklären. Die Versuche wurden in ddH₂O durchgeführt, wogegen die Literaturwerte auf

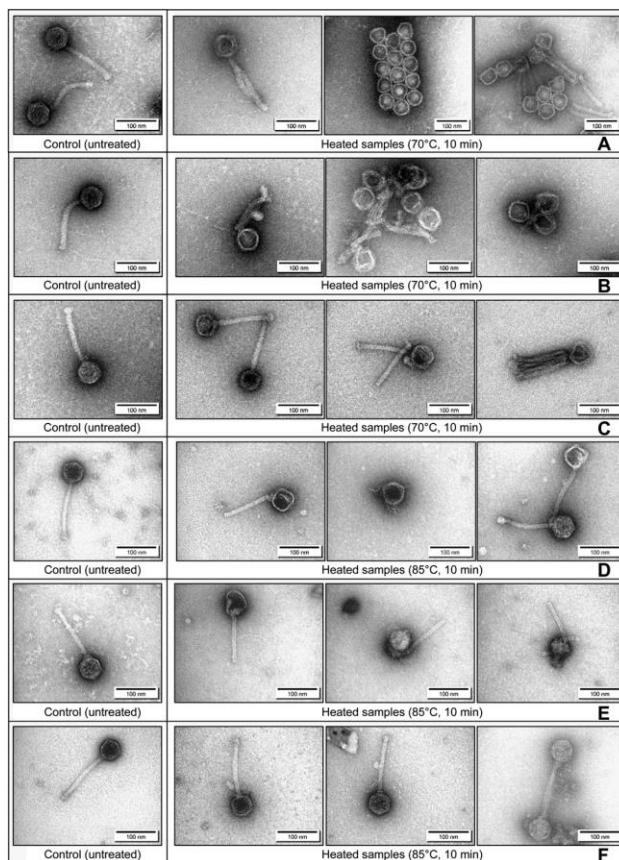


Abbildung 75 TEM Bilder der Phagen P008 (A-C) und P680 (D-F); unbehandelt (Control) und nach 10 min Erhitzung bei 70 °C (P008) und 85 °C (P680) in 1 M NaCl (A und D), in 3,5 M NaCl (B und E) und in nanofiltrierter Magermilch (C und F), (Atamer *et al.*, 2010).

Untersuchungen in unterschiedlichen Medien beruhen. Die thermische Inaktivierung des hitzeresistenten Phagen P1532 wurde von Atamer *et al.* (2009) in Magermilch untersucht. Während der thermischen Inaktivierung, scheinen die Milchproteine einen Schutzeffekt auf den Phagen zu haben (Muller-Merbach *et al.*, 2005, Atamer *et al.*, 2009a, Atamer *et al.*, 2010). Abb. 74 zeigt die Inaktivierung des Phagen P1532 in Magermilch bei Temperaturen von 70 °C bis 97 °C (Atamer *et al.*, 2009a). Bei 80 °C weist der Phage nach 20 Minuten eine Inaktivierung von einer log-Stufe und damit 90 % auf. Dieser Inaktivierungsverlauf passt zu dem hier durchgeführten Versuch. Da jedoch die Schutzwirkung der Milchproteine bekannt war, wurde für den in

Reinstwasser durchgeführten Versuch bereits eine geringere Temperatur von 75 °C gewählt.

Die Inaktivierung des Phagen verlief bei der niedrigeren Temperatur dennoch stärker als angenommen. Es konnten jedoch distinkte Zeitpunkte identifiziert werden, bei denen 90 % bzw. 50 % des Phagen inaktiviert wurden. Diese wurden dann mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen des hitzesensitiven Phagen P008 verglichen.

Abb. 53 ist zu entnehmen, dass der hitzeresistente Phage P1532 auch bei einer Inaktivierung von 90 % (Abb. 53 C) noch überwiegend intakte Phagenpartikel mit DNA in den Kapsiden aufwies. Beim hitzesensitiven Phagen P008 dagegen waren bei 90 % Inaktivierung überwiegend leere Köpfe zu erkennen: Die Schwänze schienen abgebrochen und vollständig desintegriert zu sein und die DNA schien aus den Köpfen ausgetreten zu sein (Abb. 54 F).

Auch bei niedrigeren Inaktivierungen war zu erkennen, dass beim hitzesensitiven Phagen die Schwänze von den Köpfen abbrachen. Diese Beobachtung wird durch weitere Studien bestätigt. Der ebenfalls hitzeresistente Vertreter P680 der *L. lactis* Phagengruppe 936 wurde mit dem, auch in dieser Arbeit eingesetzten, hitzesensitiven Phagen P008 verglichen. Die Phagen wurden dabei jeweils für zehn Minuten bei unterschiedlichen Temperaturen (P680: 85 °C; P008: 70 °C) in verschiedenen Medien (1 M NaCl, 3,5 M NaCl und nanofiltrierter Magermilch) erhitzt (Abb. 75, (Atamer *et al.*, 2010)). Die Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.4.1 überein. Während beim hitzesensitiven Phagen P008 überwiegend leere Köpfe nachweisbar waren, sind beim hitzeresistenten Phagen P680 überwiegend intakte Phagenartikel identifizierbar (Abb. 75).

Eine Studie über Temperaturveränderungen des *E. coli* Phagen T7 stellen ebenfalls vergleichbare morphologische Änderungen bei der Erhitzung des Phagen fest. Diese sind in Abb. 76 schematisch dargestellt und zeigen wie die Morphologie des Phagen T7 durch unterschiedliche Temperaturen beeinflusst wird. Zu erkennen ist der Bruch des

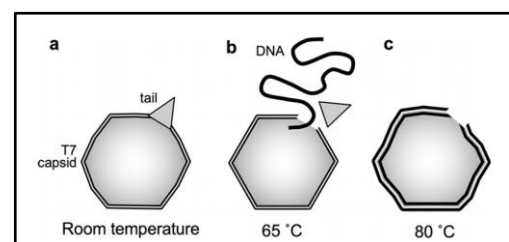


Abbildung 76 schematische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Temperaturen auf die Struktur des T7 Phagenpartikels (Vörös *et al.*, 2018)

Schwanzes (*tail*) vom Kapsid und dem darauf folgend Austreten der DNA bei 65 °C (Abb.

76 b). Bei 80 °C verliert das Kapsid die Struktur und der Phagenschwanz ist nicht mehr nachzuweisen (Abb. 76 c, (Vörös *et al.*, 2018)).

Die Beobachtungen dieser Arbeit zum Einfluss der Temperatur auf die Phagenmorphologie und die Ergebnisse der Untersuchungen von Atamer *et al.* (2010) und Vörös *et al.* (2018) lassen, unter Berücksichtigung der *in silico* Untersuchungen, die Vermutung zu, dass das Portal Protein eine entscheidende Rolle für die Hitzeresistenz der Phagen der *L. lactis* 936 Phagengruppe spielt. Da das Portal Protein für die Verbindung zwischen Kapsid und Phagenschwanz verantwortlich ist, könnte ein hitzestabileres Portal Protein demnach dazu führen, dass die Phagenschwänze, wie in Abb. 53 A-C deutlich zu sehen ist, trotz Erhitzung nicht abbrechen.

Um diese Theorie zu untersuchen, bietet es sich an, die Morphologie aller bekannten hitzeresistenten Phagen nach ihrer thermischen Inaktivierung zu betrachten. Zudem sollten auch jene Phagen auf ihre Hitzeresistenz hin untersucht werden, deren Portal Protein in dem Cluster der hitzeresistenten Phagen liegen (Abb. 50, Tabelle 15). Für diese lagen zum Zeitpunkt der Arbeit jedoch nur wenige Informationen bezüglich ihrer Hitzeresistenz vor.

Darüber hinaus wurden in Atamer *et al.* (2009) neben den hier sequenzierten Phagen, P656, P1532 und P4565, sowie des Phagen P680, noch weitere Phagen als „*thermo-resistant*“ beschrieben (Abb. 77). Diese Phagen konnten, ebenso wie die Phagen SL4, CB19 und CB20 in Abb. 72, eine Erhitzung auf 80 °C für 5 Minuten überstehen.

Diese zur 936 Phagengruppe gehörenden und von Atamer *et al.* (2009a) als *thermo-resistant*,

also hitzeresistent, definierten Phagen sind bisher nicht sequenziert, so dass die Sequenzen der Portal Proteine bisher nicht vorliegen.

	Phage isolates ^a	Phage species	Max. titre (pfu mL ⁻¹)	Sample with max. titre
L-1	P620^F , P622^W	936	5 × 10 ⁶	Fresh cheese
L-2	P653 ^B , P654 ^B , P655 ^B	c2	6 × 10 ⁶	Brine
L-3	P637 ^W , P645 ^W , P646^W , P647^W , P648^W , P649 ^W , P650 ^B , P651 ^B , P652^B P635 ^W , P636 ^W , P638 ^W	936 936 c2	3 × 10 ⁸ 1 × 10 ⁸	Whey Whey
L-4	P618 ^Q	936	2 × 10 ⁸	Quarg
S-1	P680^Q , P623 ^B , P685^B P684 ^B	936 c2	1 × 10 ⁶ 8 × 10 ⁵	Brine Brine
S-2	P624 ^F , P625 ^F	c2	8 × 10 ⁸	Fresh cheese
S-3	P626 ^W , P627 ^W , P628 ^C , P681 ^B	936	2 × 10 ⁷	Brine
S-4	P629 ^Q , P630 ^W , P682^B , P683 ^B	936	7 × 10 ⁵	Quarg
S-5	P632^W , P633^W , P634^W	936	2 × 10 ⁷	Whey
S-6	P639 ^B , P640 ^W , P641^C	936	2 × 10 ⁹	Cheese
S-7	P642^W , P656^B , P657^B , P659 ^B , P671^B	936	2 × 10 ⁶	Whey
S-8	P643^Q , P644 ^Q	P335	1 × 10 ⁹	Quarg
PC-1	P896, P1341 , P1531, P1532 , P1548, P1559, P1569 , P4565 P1279 P1147 , P1547	936 936 P335 c2	n/a n/a n/a n/a	n/a n/a n/a n/a

Abbildung 77 Liste der auf Hitzeresistenz getesteten Phagen. Hervorgehoben sind Phagen die eine Temperatur von 80 °C für 5 Minuten überstehen, zusätzlich unterschrieben sind Phagen, die selbst nach einer Erhitzung auf 90 °C für 5 min noch nachweisbar waren (Atamer *et al.*, 2009a).

Mit einer Sequenzierung dieser Phagen und dem Einlesen der Sequenzen der Portal Proteine in den Stammbaum, kann die hier beschriebene entscheidene Bedeutung des Portal Proteins bei der Hitzeresistenz bei Phagen bestätigt werden.

5.3 LAMP-Nachweis

Zur Entwicklung einer LAMP-basierten Nachweismethode für Bakteriophagen der Milchsäurebakterien wurde als Modellphage der hitzeresistente Bakteriophage P680 (AiF 14339 N; Atamer *et al.*, 2009) mit publizierter Genomsequenz (Mahony *et al.*, 2013a) ausgewählt. Mit diesem Phagen sollte gezeigt werden, ob die Methode geeignet ist, Phagen in einem komplexen Medium wie Molke nachzuweisen. Bis zu diesem Zeitpunkt, gab es keine Untersuchungen, ob LAMP-Nachweise an das Medium Molke adaptiert werden können. Für den Phagen P680 wurde bereits gezeigt, dass er sich erfolgreich mit einer Multiplex-PCR (Deveau *et al.* 2006), für den Nachweis der 936 Phagengruppe, mit einer Detektionsgrenze von ca. 10^4 Phagen pro ml Molke, nachweisen ließ (Atamer *et al.*, 2009).

Für das Primerdesign wurde das Hauptschwanzprotein codierende *mtp*-Gen als Zielregion ausgewählt. Dieses Gen ist ein sehr konservierter Bereich der Phagen der 936 Phagengruppe und wurde gewählt, da dieses auch den Zielbereich für den bereits etablierten PCR-Nachweis darstellt (Labrie und Moineau, 2000).

Zum Nachweis positiver Reaktionen kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Beim Einsatz der Gelelektrophorese (Kapitel 3.3) zur visuellen Darstellung von LAMP-Reaktionen werden die in der Einleitung beschriebenen Fragmente unterschiedlicher Länge (Kapitel 1.8) in einem für LAMP-typischen leiterähnlichen Bild sichtbar (Abb. 57 A, 61 B und 62 A). Diese Methode ermöglicht einen sensitiven Nachweis der LAMP-Reaktion, benötigt jedoch ca. 60 Minuten und neben einer Gelelektrophorese-Apparatur auch eine Geldokumentation. Der größte Nachteil der Gelelektrophorese liegt jedoch in der Notwendigkeit die Reaktionsgefäße am Ende einer Reaktion zu öffnen. Dies stellt ein hohes Kontaminationsrisiko dar (Zhang *et al.*, 2014) und wurde daher nur mit äußerster Vorsicht und räumlicher Trennung durchgeführt. Dennoch kam es vereinzelt zu Kontaminationen, sodass diese Methode lediglich zur Bestätigung der korrekt amplifizierten Zielregion und der Bestimmung der Amplifikatgrößen bei neuen Primersets

verwendet wurde. Für einen innerbetrieblichen Nachweis von Phagen ist die Gelelektrophorese zum LAMP-Nachweis gänzlich ungeeignet. Für einen direkten visuellen Nachweis einer positiven Reaktion wurden in dieser Arbeit SYBR® Safe und Hydroxynaphtholblau (HNB) miteinander verglichen. SYBR® Safe wurde dem oft eingesetzten SYBR® Green (Goto *et al.*, 2009, Tao *et al.*, 2011, Hong *et al.*, 2012) vorgezogen, da es bei vergleichbarer Sensitivität weniger toxisch ist (Haines *et al.*, 2015). HNB wurde, als kolorimetrischer Metallindikator, dem ebenfalls an Metallionen bindenden Fluoreszenzfarbstoff Calcein vorgezogen, da dieser eine höhere Sensitivität aufweist als Calcein (Goto *et al.*, 2009). HNB wirkt dabei als Indikator für Mg^{2+} Ionen, die im Verlauf einer LAMP-Reaktion abnehmen, indem sie mit den beim Einbau der dNTP`s abgespaltenen Pyrophosphat-Ionen eine unlösliche Bindung zu Magnesiumpyrophosphat eingehen. Werden die Mg^{2+} Ionen gebunden, kommt es zu einem Farbumschlag von Violett zu Blau (Goto *et al.*, 2009). Abb. 78 zeigt den von Goto *et al.* (2009) durchgeführten Vergleich verschiedener Indikatorstoffe für den LAMP-Nachweis. In Abb. 78 A.c und B.c ist die 10-mal geringere Sensitivität von Calcein im Vergleich zu HNB (A.a) und SYBR® Green (A.b und B.b) zu sehen (die orangenen Pfeile markieren die Nachweisgrenze). Die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.2 bestätigen die Sensitivität von HNB und zeigen, dass SYBR® Safe ein gleichwertiger Ersatz für SYBR® Green ist. Der Nachweis mit SYBR® Safe zeigte immer wieder eine Nachweisgrenze von 10^2 PbE ml⁻¹ (Tabelle 18), welche bei HNB nicht beobachtet werden konnte. Es wurde gezeigt, dass bei wiederholtem Untersuchen derselben Probe mit einem Titer unterhalb der Nachweisgrenze, eine bestimmte Anzahl

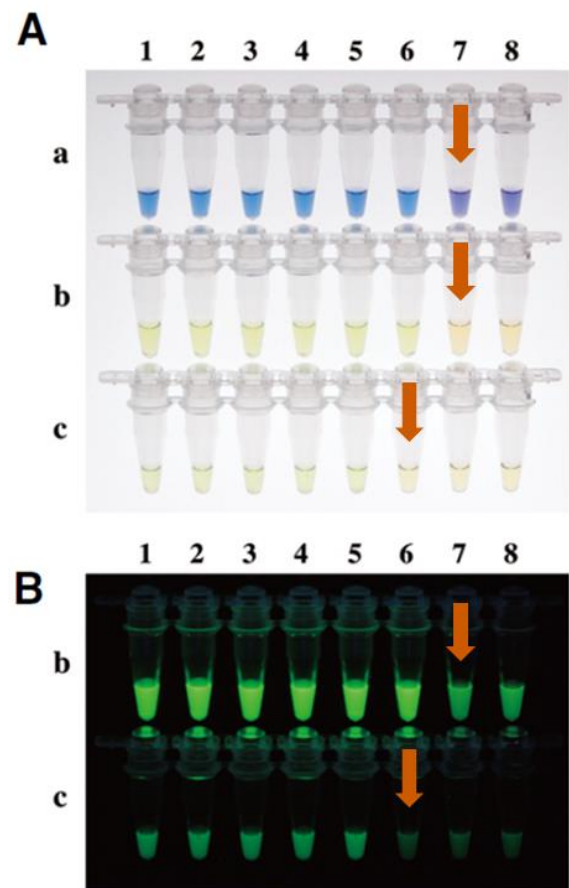


Abbildung 78 Vergleich von HNB (a), SYBR® Green (b) und Calcein (c) zum DNA-Nachweis. A zeigt alle drei Indikatorstoffe bei normalem Licht, B zeigt die beiden Fluoreszenzfarbstoffe SYBR® Green (b) und Calcein (c) unter einer UV – Licht Quelle modifiziert nach Goto *et al.*, (2009).

positiv war. Dies lässt sich rein statistisch erklären. Bei einer Nachweisgrenze von 10^3 PbE ml⁻¹ und einem in die Reaktion eingesetzten Probenvolumen von 1 µl sind 10^3 PbE ml⁻¹ auch das theoretische Minimum (Brinks *et al.*, 2018), da 10^3 PbE ml⁻¹ 1 PbE µl⁻¹ entsprechen. Wird diese eine PbE wieder um einen Faktor 10 verdünnt so sollte, wenn diese Verdünnungsstufe 10-mal beprobt wird, eine der 10 Reaktionen positiv sein. Die Ergebnisse in Tabelle 18 entsprachen den zu erwartenden Werten. Bei 10^2 PbE ml⁻¹ sollte jeder zehnte Versuch positiv sein (in Tabelle 18 lag der Wert bei 17 %) und bei 5×10^2 PbE ml⁻¹ sollte jeder zweite Versuch zu positiven Ergebnissen führen (45 % in Tabelle 18). Beim Einsatz von HNB konnte keine Reaktion unter 10^3 PbE ml⁻¹ als positiv identifiziert werden, was die Entscheidung in diesem Nachweissystem SYBR® Safe einzusetzen bestärkte. Zudem erwies es sich als schwierig, gerade im Bereich der Nachweisgrenze eine Probe mit Sicherheit als positiv oder negativ zu deklarieren (Abb. 59 A).

Um das bestehende Kontaminationsrisiko, beim Einsatz von SYBR® Safe durch das Öffnen der Reaktionsgefäße zu vermeiden, wurden bereits zwei Varianten in der Literatur beschrieben. So wurde versucht den Farbstoff in einem Wachsplättchen zu fixieren, welches am Ende der Reaktion durch Erhitzen schmilzt und so den Farbstoff dem Reaktionsgemisch zufügt (Tao *et al.*, 2011). Ein zweiter und etwas weniger aufwändigerer Ansatz bestand darin kleine Alufolienkegel in die Reaktionsgefäße zu geben, die als Barriere und als Reservoir für den Farbstoff dienten. Durch kurzes Zentrifugieren kann der Farbstoff so nach Reaktionsende dem Reaktionsgemisch zugefügt werden (Hong *et al.*, 2012). Der Ansatz mit den Alufolienkegeln wurde getestet, erwies sich aber als sehr aufwendig. Also wurde in einem weiteren Versuch überprüft, wie sich der Farbstoff verhält, wenn er zu Beginn der Reaktion in die Unterseite des Deckels pipettiert wird. Dies erwies sich als praktikabel, da der Tropfen Farbstoff während der Reaktion im Deckel blieb (Abb. 60 A) und auch nicht durch die bei der Reaktion entstehende geringe Kondensationsfeuchte abgelöst wurde. Dieser Tropfen des Fluoreszenzfarbstoffs wurde dann im Anschluss an die Inkubationszeit durch kurzes Zentrifugieren der Gefäße in das Reaktionsgemisch befördert. Unter UV-Licht konnte dann sehr zuverlässig zwischen positiven und negativen Reaktionen differenziert werden (Abb. 60 B).

Auch mit dem bloßen Auge war es möglich zwischen positiven und negativen Proben zu unterscheiden (Abb. 58 B), eindeutig wurde der Unterschied aber erst bei Anregung des Farbstoffes durch eine UV-Lichtquelle (Abb. 58 A).

Durch das Pipettieren von SYBR® Safe in den Deckel, wurde auch der Vorteil von HNB, welches direkt in den Reaktionsansatz pipettiert werden kann, ausgeglichen. Aus diesem Grund wurde die Zugabe von SYBR® Safe in den Deckel fortan bevorzugt. Diese Methode benötigt ebenfalls kein weiteres Öffnen der Reaktionsgefäße und liefert ein eindeutiges Signal bei positiven Reaktionen (Abb. 58, 59 B und 60 B).

Zur weiteren Optimierung der Methodik wurde die DNA unter Zugabe des Kationen-Austauscherharzes Chelex®-100 (Biorad™) extrahiert, um hemmende Inhaltsstoffe (Salzionen u.a.) aus den Molkeproben zu entfernen. Dieser Schritt war notwendig, da der LAMP-Nachweis der P680-Phagen-DNA in Sauermolke ohne den Kationenaustauscher inhibiert wurde (Abb. 62). Mit dem Chelex®-100 Optimierungsschritt war es zudem auch möglich, in der klassischen PCR-Detektion die Nachweisgrenze von 10^4 auf 10^3 PbE ml⁻¹ zu senken (Abb. 63).

Mit dem LAMP-Nachweis für den Phagen P680 konnte früh das Potential der Methode demonstriert werden. Mit geringen Optimierungsschritten gelang die Reduktion der Nachweisgrenze für diesen Phagen um eine log-Stufe im komplexen Medium Molke. Zudem werden für ein komplettes Assay inklusive Probenaufarbeitung nur ca. 90 min benötigt. Damit ist der Nachweis mittels eines LAMP-Assays zur Zeit die schnellste Methode zum Phagen-Nachweis (Brinks *et al.*, 2018).

Der Nachweis des Phagen P680 zeigte auch die hohe Spezifität der LAMP-Methode aufgrund der 4 verschiedenen Zielsequenzen. Anders als mit dem von Labrie *et al.* (2000) etablierten PCR Nachweissystems für die Phagengruppe 936, gelang es mit der LAMP-Methode lediglich etwa jeden zweiten der getesteten Phagen dieser Phagengruppe nachzuweisen, obwohl die Zielregion das hoch konservierte *mtp* Gen ist. Diese Erkenntnis bestätigte das Potential der Methode, auch spezifisch bestimmte Phagen innerhalb dieser Gruppe nachzuweisen, sofern eine spezifische Genregion für den Nachweis zu finden ist. Die Suche nach einer spezifischen Genregion, die ausschließlich bei den hitzestabilen Phagen vorkommt, verlief leider erfolglos. Jedoch konnten ein *orf* identifiziert werden, der zum Zeitpunkt der Untersuchungen nur bei wenigen anderen Vertretern der 936 Phagengruppe vorkam. Diese Region (Abb. 40, blauer Kreis) wurde für den spezifischen LAMP-Nachweis ausgewählt. Das von diesem Bereich codierte Gen stellte sich im Laufe der Untersuchungen als ein Methyltransferase-Gen heraus (Murphy *et al.*, 2014). Eine Methyltransferase schützt die Phagen-DNA innerhalb der Wirtszelle vor wirtseigenen

Endonukleasen, die Fremd-DNA erkennen und abbauen. Dafür methyliert sie die Phagen-DNA wodurch sie nicht mehr als Fremd-DNA erkannt wird (Murphy *et al.*, 2014). Sie hat also keinen direkten Einfluss auf die Hitzeresistenz der Phagen, allerdings liegt die Vermutung nahe, dass die hitzeresistenten Phagen einem gewissen Selektionsdruck ausgesetzt waren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Phagen über weitere Schutzvorrichtungen verfügen.

Im Laufe der Untersuchungen wuchs die Datenbank sequenzierter Phagengenome der 936 Phagengruppe stetig. Betrachtet man alle aktuell publizierten Genome der 936 Phagengruppe, so ist das Gen bei 48 von mittlerweile über 110 publizierten Genomen zu finden (Abb. 66, ausschnittsweise). Die Methyltransferase kommt, im Vergleich zu den anderen recht konservierten Genen der 936 Phagengruppe, somit immer noch seltener vor, und bleibt daher im Genom als Zielsequenz molekularer Nachweissysteme für spezifische Phagen weiterhin attraktiv.

Der gewählte LAMP-Nachweis ist wie beschrieben sehr spezifisch und bereits wenige *mismatches* in einer Zielregion können ausreichen damit der Nachweis fehlschlägt. So zeigt der neu isolierte extrem hitzeresistente Phage P959 (Wagner *et al.*, 2017) in drei Primerzielregionen *mismatches*. Pro Zielregion hat er nur zwei *mismatches*, dennoch reicht dies aus damit der Nachweis fehlschlägt. Der Phage P956 konnte dagegen trotz *mismatches* in zwei der Zielregionen nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit ist daher hoch, andere Phagen, die ebenfalls über die Zielregion verfügen, durch gezieltes Primerdesign von dem Nachweis auszuschließen. Die generierten Primer (Tabelle 19) binden ohne *mismatches*, neben den vier hitzeresistenten Phagen, nur bei 3 weiteren Phagen (Kapitel 4.4.5, Abb 65). Diese drei Phagen KP793102 - PhiA.16 (Abb. 66, unterer roter Kasten), KP793128 - PhiM.16 und KP793133 - PhiLj (Kapitel 4.4.5) liegen alle im Cluster der hitzeresistenten Phagen bei Betrachtung des Portal Proteins (Abb. 50, Tabelle 15). Für diese Phagen liegen bislang jedoch keine Daten zur Hitzeresistenz vor (Murphy *et al.*, 2016).

Das hier gezeigte Primersystem (Tabelle 19) funktioniert für die vier zu Beginn der Arbeit bekannten extrem hitzeresistenten Phagen (Abb. 65). Dennoch zeigten die Versuche mit weiteren hitzeresistenten Phagen (Tabelle 20), dass dieses Primersystem nicht geeignet ist um beispielweise in einem käseproduzierenden Betrieb als Frühwarnsystem für hitzeresistente Phagen der Laktokokken Starterkulturen zu fungieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass man Primersysteme stetig aktualisieren und weiterentwickeln muss, um den bestmöglichen Nachweis und im Bereich der hitzeresistenten Phagen, auch einen Schutz gegen phageninduzierte Probleme zu haben. Zukünftig sollte zudem ein universelles LAMP-Primersystem für die gesamte 936 Phagengruppe, vergleichbar mit dem PCR Nachweissystem (Deveau *et al.*, 2006), entwickelt werden.

Es wurden bereits erfolgreich Methoden untersucht, die Phagenanzahl in Molke zu reduzieren, beispielsweise durch eine Membranfiltration der Molke. Dabei ist es gelungen, Phagenreduktionen bis zu vier log-Stufen zu erreichen (Samtlebe *et al.*, 2015). Hier können LAMP-Nachweissysteme als Kontrolle dienen, mit der man die restliche Phagenkonzentration überprüfen und dadurch Fermentationstörungen ausschließen könnte. Ist der Phage nach der Durchführung der Membranfiltration noch nachweisbar, so kann der Nachweis eine Entscheidungshilfe darstellen. Solche stark belasteten Molken könnten weiter behandelt werden oder einer ganz anderen Verwendung zugeführt werden. Beispielsweise als Bestandteil von Molkeprodukten, die nicht fermentiert werden (z.B. Fitnessdrinks oder Molkedrinks).

5.4 Optimierung des PCR Nachweises für *Leuonostoc* spp. Phagen

Durch den Einbau von 5 Wobblebasen im reversen Primer konnte der PCR Nachweis für *Leuonostoc* spp. Phagen so optimiert werden, dass alle bisher getesteten Phagen sehr deutliche Signale in der Agarose-Gelelektrophorese zeigten (Abb. 68). Der Einbau von Wobblebasen bedeutet, dass am Ende der Primersynthese ein möglichst äquimolares Gemisch aus unterschiedlichen Primer Sequenzen vorliegt. Dabei stellen Wobblebasen einen Code für ein Gemisch von 2-4 unterschiedlichen Basen an derselben Stelle dar - entsprechend des „IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ambiguity code“. Problematisch beim Einbau kann die Anzahl der Wobbles werden. Beim Primer LnP-F werden die *mismatches* als N codiert. Ein N steht dabei für ein Gemisch aller vier möglichen Basen (C, T, A, G). Das bedeutet jedoch auch, dass bereits in dem Gemisch 16 unterschiedliche Primer vorliegen. Würde man bei den 5 *mismatches* des reversen Primers diese durch N's ersetzen, würde dies 4⁵ bzw. 1024 mögliche Kombinationen bedeuten. Dies bedeutet auch eine hohe Chance, dass ein Großteil dieser Primer nicht

bindet. Daher wurde im Primerdesign darauf geachtet, dass nur Wobbles, die für die 2 gefundenen unterschiedlichen Basen codieren, eingesetzt wurden. Der so generierte Primer LnP-r-A enthält daher die Wobblebasen Y (codiert für T und C) und R (codiert für G und A) (Tabelle 21). So ergeben sich 32 mögliche Kombinationen.

Abb. 68 B bestätigt, dass durch die Optimierung des reversen Primer alle bisher nicht nachweisbaren *Leuconostoc* spp. Phagen detektiert werden konnten.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genome von insgesamt neun Phagen sequenziert und *in silico* charakterisiert.

Über zwei Vertreter der selten gefundenen *L. lactis* Phagengruppen P087 (P596) und 949 (P1048) konnten verwandschaftliche Beziehungen vertieft werden. Diese seltenen Phagen wurden in jüngster Zeit häufiger isoliert. Das Wissen über diese Gruppen ist jedoch sehr begrenzt, so dass die hier sequenzierten Phagengenome zu einem besseren Verständnis dieser Gruppen beitragen.

Ebenfalls selten isolierte Phagen der *L. lactis* Phagengruppen 1706 (P1046) und Q33 / BM13 (P1045) wurden aus einem Wirtsstamm freigesetzt. Die *in silico*-Untersuchungen dieser beiden Phagen führte zu der Theorie, es handle sich um einen virulenten und einen ungewöhnlichen, temperenten Phagen. Die Sequenzierung und anschließende *in silico*-Analyse des Wirtsstammes, in Kombination mit Daten von DNA-DNA-Hybridisierungen ergab, dass es sich bei dem ungewöhnlichen temperenten Phagen um einen sog. Plasmid-Prophagen handelt. Dieser stellt den ersten beschriebenen Plasmid-Prophagen für *L. lactis* Phagen dar.

Drei extrem hitzeresistente Vertreter der als problematisch bekannten *L. lactis* Phagengruppe 936 wurden ebenfalls sequenziert und *in silico* analysiert. Ziel war zum einen ein molekularbiologisches Nachweissystem der extrem hitzeresistenten Phagen zu entwickeln. Zum anderen wurde die extreme Hitzeresistenz dieser Phagen untersucht.

Für den molekularbiologischen Nachweis konnte die Loop mediated Amplification (LAMP)-Methode adaptiert werden. Anhand des hitzeresistenten Phagen P680 konnte das Potential der Methode demonstriert werden. Die Nachweisgrenze für diesen Phagen wurde im Vergleich zu einem etablierten PCR-Nachweis, bei einer Versuchszeit von unter 90 Minuten, um eine log Stufe reduziert.

Bei der Suche nach einer Erklärung für die Hitzeresistenz der sequenzierten 936 Phagen, fiel der Fokus auf das Portal Protein. Dieses Protein ist für die Verbindung zwischen Kapsid und Schwanz der Phagen verantwortlich. Erhitzungsversuche zeigten, dass einem hitzeresistenten Vertreter der 936 Gruppe, dem Phagen P1532, die Schwänze und Köpfe selbst bei einer Inaktivierung von 90 % überwiegend als intakte Einheit vorlagen. Im Gegensatz dazu liegen beim hitzesensitiven Vertreter derselben Phagengruppe 936, der

Phage P008, bei gleicher Inaktivierung überwiegend leere Köpfe vor, die Schwänze scheinen desintegriert zu sein.

Die Sequenzierungen von zwei *Leuconostoc* spp. Phagen dienten vorrangig dem molekularbiologischen Nachweis dieser beiden Phagen, da mit dem herkömmlichen PCR-Nachweis nicht alle *Leuconostoc* spp. Phagen detektiert werden konnten. Durch kleine Modifikationen des etablierten Primerpaares gelang es den PCR-Nachweis zu optimieren.

7. Summary

In this study, the genomes of a total of nine phages were sequenced and characterized *in silico*.

The sequence information of two representatives rare phage groups *L. lactis* phage groups P087 (P596) and 949 (P1048) were used to analyze their phylogenetic relationships. Recently members of rare phage groups have been isolated more frequently. However, the knowledge of these groups is very limited, the phage genomes sequenced here help to better understand these rare phage groups.

Also rarely isolated phages of groups 1706 (P1046) and Q33 / BM13 (P1045) were released from the same host strain. The *in silico* studies of these two phages led to the theory that one phage is a virulent (P1045) and one phage an unusual temperate phage (P1046). Sequencing and subsequent *in silico* analysis of the host strain, in combination with data from DNA-DNA hybridizations, revealed that the unusual temperate phage is a so-called plasmid prophage. This is the first time a plasmid prophage is described for *L. lactis* strains.

Three extremely heat-resistant representatives of the problematic *L. lactis* phage group 936 were also sequenced and analyzed *in silico*. On the one hand the aim was to develop a molecular detection system for extremely heat-resistant phages. On the other hand, the extreme heat resistance of phages was studied.

For molecular detection the loop mediated amplification (LAMP)-method could be adapted. The potential of the method could be demonstrated using the heat resistant phage P680. The detection limit for this phage was reduced by one log level compared to the established PCR, with an assay time of less than 90 minutes.

While searching for an explanation for the heat resistance of the sequenced 936 phages, the portal protein got into focus. The portal protein is responsible for the connection between capsid and tail of the phage. Heating experiments showed that in the case of a heat-resistant representative of the 936 group, the phage P1532, the tails and heads were predominantly intact even at a 90% inactivation level. In contrast, in a heat-sensitive phage of the same phage group, the phage P008, the tails disintegrate at the same inactivation level leaving predominantly empty heads.

The sequencing of two *Leuconostoc* spp. phages served primarily the molecular detection of these two phages, as with the conventional PCR detection some phages could not be detected, by small modifications of the established primer pair, it was possible to optimize the used PCR detection system.

8. Anhang

Anhang 1 Geräte

Gerät/Material	Model/Typ	Hersteller
Brutschränke (30 °C)	B12	Hereaus Instruments, Hanau
Deckelflasche	25 ml – 2 l	Schott AG, Mainz
Eismaschine	AF 100 AS, 230/50/1	Scotsman® Frimont S.p.A. Pogliano MIL
Erlenmeyerkolben	Erlenmeyerkolben	Erlenmeyerkolben
Falkon-Röhrchen	Cellstar® Tubes, 50 ml	Greiner Bio One
Gasbrenner	Gasprofi 1 SCS	WLD-Tec GmbH, Göttingen
Geldokumentationskammer	Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glaspipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand GmbH & CO KG, Wertheim
Herdplatte	Ceran	Schott, Jena
Kühltruhe (- 20 °C)	Comfort Plus	Siemens AG, München
Kühlzentrifuge	J2-21	Beckmann Coulter GmbH
	5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	MR3002C	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Messbecher	25 ml – 500 ml	Schott AG, Mainz
Messzylinder	10 ml – 1 l	Schott AG, Mainz
NanoDrop	2000c	Peqlab GmbH, VWR, Darmstadt
Nitril-Handschuhe	rotiprotect	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Parafilm		Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Petrischale		Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH-Metter	Delta 340	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen

Photometer	Nanocolor® 500 D	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PCR-Tubes		Eppendorf AG, Hamburg
Pipette	Reference Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Research 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (steril)	Dualfilter 10, 100, 1000 µl PCR Clean	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfen	Accu-jet pro	Brand GmbH, Wertheim
Power-Supply	Mini Power Pack P20	Biometra GmbH, Göttingen
Reinstwasseranlage	arium® pro	Sartorius AG, Göttingen
Seitenarmkolben	100 ml, 300 ml, 500 ml	Schott AG, Mainz
Sicherheitswerkbank	Claire	Berner International GmbH, Elmshorn
Spritze	Syringe, 10 ml	Terumo, Eschborn
Spritzenfilter (0,2/0,45 µm)	Whatman®	Schleicher und Schüll, Dassel
Thermoblock	CHB-202	BIOER
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Tisch	UV-Transilluminator	UVP, INC.
Vortex Mixer	Vortex Genie 2TM Vortex Mixer	Scientific Industries Inc., Boheia neo Lab, Heidelberg
Waage	AX2202	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	MC	Julabo, Seelbach
Zellmühle	FastPrep FP120	Bio 101 Savant Instruments Inc., Farmingdale (USA)
Zentrifuge	- Beckman Coulter J2-21 - Ultrazentrifuge Coulter Optima™ L90K - 5417R, 5415C & 5415D - Labofuge M	Beckman Coulter GmbH, Krefeld Beckman Coulter GmbH, Krefeld Eppendorf GmbH, Engelsdorf Heraeus Sepatech

Zentrifugenröhrchen	Polyallomer Tubes,	Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugenbecher	500 ml, Thermo Scientific Nalgene®		Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Anhang 2 Liste der offenen Leseraster des Phagen P596 im Vergleich zum Phagen P087. „Open reading frames“ die nur bei einem Phagen vorkommen sind hervorgehoben.

orf	Start	Größe (AS)	Name	P087	Start	Größe (AS)
1	509	967	hypothetical protein CDS	x	509	966
2	3419	509	DNA helicase, phage-associated CDS	x	3416	509
3	5012	170	HNH homing endonuclease			
4	5632	214	hypothetical protein CDS	x	5053	199
5	6299	656	DNA polymerase B region CDS	x	5675	656
6	8366	246	Phage protein CDS	x	7742	246
7	9103	232	Phage protein CDS	x	8479	232
8	9818	86	Phage protein CDS	x	9194	86
9	10087	138	Protein gp63 [Bacteriophage A118] CDS	x	9463	138
10	10497	52	Phage protein CDS	x	9873	52
11	10755	68	Phage protein CDS	x	10134	68
12	10970	108	Phage protein CDS	x	10350	108
13	11293	49	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit (EC 1.17.4.2) CDS	x	10673	49
			hypothetical protein CDS	x	10816	93
14	11436	104	Phage protein CDS	x	11091	104
			putative DNA methylase CDS		11474	213
15	11817	76	hypothetical protein CDS			
16	12041	69	Phage protein CDS	x	12206	69
17	12326	212	Phage protein CDS	x	12491	212
18	12963	118	hypothetical protein CDS	x	13128	120
19	13320	79	Glutaredoxin-like protein NrdH	x	13484	79
20	13546	108	Phage protein CDS	x	13710	108
21	13871	99	Phage protein CDS	x	14035	99
22	14133	83	Phage lysozyme CDS	x	14294	84
23	14488	349	Phage protein CDS	x	14652	349
24	15528	92	Phage protein CDS	x	15692	88
25	15800	49	Phage protein CDS	x	15964	49
26	15960	240	PE-PGRS virulence associated protein	x	16121	242
27	16773	77	Phage protein CDS	x	16940	77
28	16982	63	hypothetical protein CDS	x	17149	63
29	17171	98	Phage protein CDS	x	17334	98
30	17457	51	Phage protein CDS	x	17614	53
31	17606	313	Cysteine synthase	x	17772	312

32	18555	98	Phage protein CDS	x	18718	98
33	18838	110	Phage protein CDS	x	19001	110
34	19187	146	Phage protein CDS	x	19350	146
35	19626	133	Phage protein CDS	x	19789	133
36	19999	46	hypothetical protein CDS			
37	20150	105	Phage protein CDS	x	20313	105
			hypothetical protein CDS	x	21041	79
38	21192	64	Phage protein CDS	x	21355	64
			hypothetical protein CDS	x	21543	34
			hypothetical protein CDS	x	21842	43
39	21617	80	hypothetical protein CDS	x	21983	62
40	22021	358	Phage tail length tape-measure protein CDS	x	22330	370
41	23174	86	Phage protein CDS	x	23484	87
			hypothetical protein CDS	x	24003	30
42	23747	321	Phage protein CDS	x	24178	321
			hypothetical protein CDS	x	25396	66
			hypothetical protein CDS	x	25559	54
			hypothetical protein CDS	x	26300	164
43	25874	81	Phage protein CDS	x	26793	92
44	26127	94	Phage protein CDS	x	27380	94
45	26408	114	Phage protein CDS	x	27661	114
46	26827	415	Phage protein CDS	x	28080	415
47	28071	175	ParB-like nuclease domain containing protein CDS	x	29324	175
48	28595	220	Phage protein CDS	x	29848	220
49	29324	579	type I secretion C-terminal target domain protein CDS	x	30577	579
50	31057	493	structural protein CDS	x	32310	493
51	32638	178	Phage protein CDS	x	33891	178
52	33187	171	Phage major tail protein CDS	x	34440	171
53	33722	70	Phage protein CDS	x	34975	70
54	33921	105	Phage protein CDS	x	35174	105
55	34235	339	Prophage Clp protease-like protein CDS	x	35488	347
56	35265	379	Phage protein CDS	x	36543	379
57	36414	241	Phage protein CDS	x	37692	241
58	37133	86	hypothetical protein CDS	x	38411	86
59	37350	152	Phage protein CDS	x	38628	152
60	37802	126	Phage protein CDS	x	39059	133

61	38176	185	Phage protein CDS	x	39454	185
62	38745	78	Phage protein CDS	x	40023	78
63	38978	447	structural protein CDS	x	40256	447
64	40429	209	hypothetical protein CDS	x	41708	209
65	41100	97	Phage protein CDS	x	42379	97
66	41395	1310	tail tape measure protein CDS	x	42674	1310
67	45328	377	Phage protein CDS	x	46607	377
68	46458	411	endolysin CDS	x	47737	411
69	47690	275	Phage protein CDS	x	48969	275
70	48489	162	hypothetical protein CDS	x	49768	162
71	48964	218	Phage protein CDS	x	50243	218
72	49629	258	Phage protein CDS	x	50908	258
73	50415	272	hypothetical protein CDS	x	53234	272
74	51241	129	hypothetical protein CDS	x	52520	129
75	51632	107	Phage protein CDS	x	53550	107
76	51955	113	Phage protein CDS	x	53234	113
77	52298	93	Phage protein CDS	x	53550	102
78	52576	250	endolysin CDS	x	53855	238
79	53380	709	hypothetical protein CDS	x	54663	942
80	55515	278	Phage capsid and scaffold CDS	x	57497	278
81	56363	310	Phage protein CDS	x	58345	310

Anhang 3 Liste der offenen Leseraster des Phagen P1048 im Vergleich zum Phagen 949. „Open reading frames“ die nur bei einem Phagen vorkommen sind hervorgehoben.

orf	Start	Größe (AS)	Name	949	Start	Größe (AS)
1	145	1020	integrase CDS	x	148	1020
2	1173	2325	exodeoxyribonuclease CDS	x	1176	2325
3	3590	609	hypothetical protein CDS	x	3593	615
4	4258	588	transglycosylase CDS	x	4264	696
5	5107	600	HNH endonuclease CDS			
6	5699	120	transglycosylase CDS			
7	5942	384	hypothetical protein CDS	x	5083	384
8	6341	366	hypothetical protein CDS	x	5482	348
9	6709	336	hypothetical protein CDS	x	5852	336
10	7041	225	hypothetical protein CDS	x	6184	225
11	7265	252	hypothetical protein CDS	x	6408	258
12	7532	339	hypothetical protein CDS	x	6796	219
13	7946	597	Thymidine kinase CDS	x	7089	597
14	8523	345	hypothetical protein CDS	x	7666	345
15	8986	234	hypothetical protein CDS	x	8136	234
16	9203	246	hypothetical protein CDS	x	8353	246
17	9445	225	hypothetical protein CDS	x	8595	453
18	9670	225	hypothetical protein CDS	x	9048	225
19	9896	210	hypothetical protein CDS	x	9274	210
20	10095	90	hypothetical protein CDS	x	9473	90
21	10185	174	hypothetical protein CDS	x	9563	162
22	10355	228	hypothetical protein CDS	x	9802	99
			hypothetical protein CDS	x	9893	510
23	10599	378	Putative chromosome segregation protein (ACLAME 485) CDS			
			hypothetical protein CDS	x	10399	246
			hypothetical protein CDS	x	10728	126
			hypothetical protein CDS	x	11037	720
24	10987	249	hypothetical protein CDS			
			hypothetical protein CDS	x	11725	372
			hypothetical protein CDS	x	12098	216
25	11232	327	hypothetical protein CDS	x	12310	324
26	11561	321	hypothetical protein CDS	x	12636	321
			hypothetical protein CDS	x	14017	111

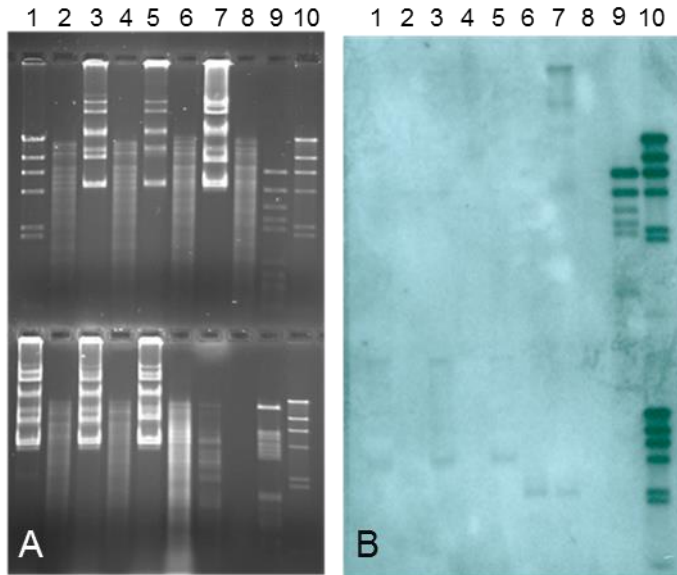
27	13483	525	hypothetical protein CDS	x	14526	522
			hypothetical protein CDS	x	15411	399
28	14395	489	hypothetical protein CDS	x	15953	384
			hypothetical protein CDS	x	16346	162
			hypothetical protein CDS	x	16568	201
			hypothetical protein CDS	x	16796	99
			hypothetical protein CDS	x	16976	150
			hypothetical protein CDS	x	17566	147
			hypothetical protein CDS	x	17725	117
			hypothetical protein CDS	x	18023	321
29	15350	492	HNH homing endonuclease # Phage intron CDS	x	18522	492
30	16584	225	hypothetical protein CDS			
31	16835	138	hypothetical protein CDS			
32	16975	108	hypothetical protein CDS			
33	17093	192	hypothetical protein CDS	x	20073	192
34	17277	108	hypothetical protein CDS			
35	17381	144	hypothetical protein CDS			
36	17521	165	hypothetical protein CDS			
			hypothetical protein CDS	x	20313	204
37	17859	234	hypothetical protein CDS			
38	18098	591	hypothetical protein CDS	x	20737	387
			hypothetical protein CDS	x	21116	255
			hypothetical protein CDS	x	21403	147
			hypothetical protein CDS	x	21569	201
39	18796	204	hypothetical protein CDS			
			hypothetical protein CDS	x	21949	381
			hypothetical protein CDS	x	22407	141
40	19071	363	hypothetical protein CDS	x	22557	363
41	19427	198	hypothetical protein CDS	x	22913	198
42	19645	243	hypothetical protein CDS	x	23131	243
43	19966	600	putative nucleotidase CDS	x	23452	609
44	20552	396	hypothetical protein CDS	x	24038	396
45	20944	759	hypothetical protein CDS	x	24430	759
46	21808	1047	putative endolysin CDS	x	25294	1032
47	23055	225	hypothetical protein CDS	x	23055	225
48	23379	1206	hypothetical protein CDS	x	26849	1203
49	24633	1086	hypothetical protein CDS	x	28101	2094

50	25824	618	hypothetical protein CDS	x	30301	618
51	26451	1545	putative replicative DNA helicase CDS	x	30928	1545
52	28006	1050	putative DNA primase CDS	x	32483	993
53	29059	1782	putative single-stranded DNA exonuclease CDS	x	33540	1782
54	30846	540	Phage protein CDS			
55	31394	288	hypothetical protein CDS	x	35323	288
56	31692	231	hypothetical protein CDS		35621	231
57	32055	300	hypothetical protein CDS		35985	300
58	32354	234	hypothetical protein CDS		36284	234
59	32589	183	hypothetical protein CDS			
			hypothetical protein CDS	x	36545	321
60	32768	144	hypothetical protein CDS			
61	33170	159	hypothetical protein CDS			
62	33325	174	Phage protein CDS	x	37027	174
63	33513	390	Phage protein (ACLAME 1465) CDS			
			hypothetical protein CDS	x	37197	129
64	33899	840	Adenine-specific methyltransferase (EC 2.1.1.72) CDS			
			hypothetical protein CDS	x	37372	216
65	34791	294	hypothetical protein CDS			
			hypothetical protein CDS	x	37588	210
			hypothetical protein CDS	x	37794	207
66	35133	141	hypothetical protein CDS			
67	35270	153	hypothetical protein CDS			
68	35448	279	hypothetical protein CDS			
69	35713	306	hypothetical protein CDS			
70	36011	336	hypothetical protein CDS	x	37993	336
71	36580	240	hypothetical protein CDS	x	38411	258
72	36809	237	hypothetical protein CDS	x	38658	237
73	37045	294	hypothetical protein CDS	x	38894	294
74	37349	297	hypothetical protein CDS	x	39198	297
75	37710	453	hypothetical protein CDS	x	39559	444
76	38166	222	hypothetical protein CDS	x	40006	222
77	38648	264	hypothetical protein CDS	x	40483	264
78	38962	399	hypothetical protein CDS	x	40798	399
79	39461	1077	Phage protein CDS	x	41297	1077
80	40686	231	hypothetical protein CDS	x	42524	231

81	40919	369	hypothetical protein CDS	x	42757	372
82	41336	195	hypothetical protein CDS	x	43177	195
83	41594	426	hypothetical protein CDS			
			hypothetical protein CDS	x	43435	213
			hypothetical protein CDS	x	43662	246
84	42115	600	hypothetical protein CDS			
			putative HNH endonuclease CDS	x	44131	489
85	44475	516	hypothetical protein CDS	x	45937	516
			hypothetical protein CDS	x	47107	213
			putative transposase CDS	x	47780	1119
86	46281	114	hypothetical protein CDS	x	49112	108
87	46408	657	hypothetical protein CDS	x	49234	657
88	47568	1764	putative DNA gyrase subunit B-topoisomerase CDS	x	50368	1968
89	49621	216	hypothetical protein CDS			
90	49838	2115	DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3) CDS	x	52337	2115
			putative adenine methyltransferase CDS	x	54470	843
91	51956	297	hypothetical protein CDS	x	55338	297
92	52245	357	hypothetical protein CDS	x	55627	354
93	52601	150	hypothetical protein CDS			
94	52747	312	hypothetical protein CDS			
95	53055	519	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase CDS	x	55983	519
96	53566	660	putative nicotinamide mononucleotide transporter CDS	x	56494	660
97	54304	759	putative anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase CDS	x	57257	1254
98	55191	933	hypothetical protein CDS			
99	56268	2760	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit (EC 1.17.4.2) CDS	x	58825	2250
100	59027	597	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), activating protein (EC 1.97.1.4) CDS	x	61074	597
101	59703	537	hypothetical group I intron protein CDS	x	61746	729
102	60297	198	hypothetical protein CDS	x	62528	198
103	60513	252	hypothetical protein CDS	x	62746	252
104	60828	240	putative ribonucleotide diphosphate reductase glutaredoxin subunit CDS	x	63061	240

105	61060	372	putative ribonucleotide reductase stimulatory protein CDS	x	63293	372
106	61445	1164	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic), alpha subunit (EC 1.17.4.1) CDS	x	63678	1500
107	62950	267	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic), alpha subunit (EC 1.17.4.1) CDS			
108	63409	573	HNH homing endonuclease CDS			
109	64062	780	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic), alpha subunit (EC 1.17.4.1) CDS			
110	64936	1323	hypothetical protein CDS			
111	66271	411	hypothetical protein CDS			
112	66788	744	hypothetical protein CDS			
113	67736	147	hypothetical protein CDS			
114	67879	222	hypothetical protein CDS			
115	68102	396	hypothetical protein CDS			
116	68508	357	hypothetical protein CDS			
117	68944	168	hypothetical protein CDS			
118	69128	768	hypothetical protein CDS			
119	69882	591	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic), beta subunit (EC 1.17.4.1) CDS			
120	71003	279	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic), beta subunit (EC 1.17.4.1) CDS			
121	71360	570	hypothetical protein CDS			
122	71935	294	hypothetical protein CDS			
123	72230	276	hypothetical protein CDS			
124	72495	921	hypothetical protein CDS			
125	73494	681	guanylate kinase CDS	x	65256	681
126	74152	744	putative deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase CDS	x	65914	744
127	74991	765	putative protease CDS	x	66754	762
128	75742	522	hypothetical protein CDS	x	67505	522
129	76307	633	FIG00755911: hypothetical protein CDS	x	68067	633
130	76929	336	hypothetical protein CDS	x	68689	336
131	77360	4290	putative DNA polymerase III alpha subunit CDS	x	69121	4290
132	81734	171	hypothetical protein CDS	x	73491	273
133	81906	333	hypothetical protein CDS	x	73776	333
134	82241	348	hypothetical protein CDS	x	74111	297

			hypothetical protein CDS	x	74407	213
			hypothetical protein CDS	x	74629	258
135	82726	243	hypothetical protein CDS	x	74997	246
136	82984	681	putative Holliday junction resolvase CDS	x	75258	681
137	83718	408	putative phage holin CDS	x	75992	408
138	84125	174	hypothetical protein CDS	x	76399	174
139	84302	291	hypothetical protein CDS	x	76578	291
140	84608	1836	putative tail protein CDS	x	76887	1836
141	86443	6282	Phage capsid and scaffold CDS	x	78722	5727
142	92833	765	putative phage tail component CDS	x	84556	765
143	93649	9834	putative tail tape measure protein CDS	x	85372	9831
144	103500	993	putative site specific recombinase CDS	x	95220	993
145	104489	483	putative phage structural protein CDS	x	96209	483
146	105066	618	hypothetical protein CDS	x	96785	618
147	105752	378	hypothetical protein CDS	x	97471	378
148	106116	420	hypothetical protein CDS	x	97835	420
149	106606	705	putative phage structural protein CDS	x	98334	705
150	107330	762	hypothetical protein CDS	x	99059	762
151	108075	606	putative phage structural protein CDS	x	99804	606
152	108680	753	putative phage structural protein CDS	x	100409	753
153	109434	309	hypothetical protein CDS	x	101163	309
154	109729	441	putative phage structural protein CDS	x	101458	441
155	110190	663	hypothetical protein CDS	x	101919	663
156	110915	1020	putative phage structural protein CDS	x	102644	1020
157	111973	522	putative phage structural protein CDS	x	103702	522
158	112523	1260	putative phage structural protein CDS	x	104252	1254
159	113794	1542	putative phage structural protein CDS	x	105517	1542
160	115359	1698	putative terminase family protein CDS	x	107082	1698
161	117059	1029	hypothetical protein CDS	x	108782	1029
162	118189	1248	putative DNA polymerase CDS	x	109909	1248
163	119445	1314	putative phosphate starvation-inducible protein PhoH/ATPase CDS	x	111165	1314
164	120742	369	hypothetical protein CDS	x	112462	369
165	121107	264	hypothetical protein CDS	x	112827	111
166	121367	333	hypothetical protein CDS	x	113087	333
167	121680	468	hypothetical protein CDS	x	113400	459



Anhang 4 Agarosegelelektrophorese (links) und DNA/DNA Hybridisierung (rechts). Für die Hybridisierung wurde DIG markierte DNA des Phagen P1045 als Sonde eingesetzt. Aufgetragen ist mit HindIII verdaute chromosomale DNA, unverdaute Plasmid-DNA und unverdaute Phagen-DNA, **oben**: 1: Phage Lambda, 2: MBT75-1, 3: MBT75, Plasmid-DNA, 4: MBT75-2, 5: MBT75, Plasmid-DNA, 6: MBT60, 7: MBT60, Plasmid-DNA, 8: MBT13, 9: Phage P1045, 10: Phage Lambda; **unten**: 1: MBT13, Plasmid-DNA, 2: 1306, 3: 1306, Plasmid-DNA, 4: 1478, 5: 1478, Plasmid-DNA. 6: CsCl Aufreinigung Phage aus MBT75-1 obere Bande, 7: CsCl Aufreinigung Phage aus MBT75-1 untere Bande, 8: leer, 9: Phage P1046, 10: Phage Lambda

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Einteilung der Phagen.	2
Abbildung 2 Klassifizierung der <i>L. lactis</i> Phagen.....	7
Abbildung 3 Vergleich des gesamten <i>in silico</i> Proteoms der <i>L. lactis</i> Phagen.	8
Abbildung 4 Stand der Taxonomie der Milchsäurebakterien.	9
Abbildung 5 Inaktivierung des Phagen P680 in Molke.	10
Abbildung 6 Linien gleichen Effekts.....	11
Abbildung 7 Preisentwicklung der durchschnittlichen Sequenzierkosten	13
Abbildung 8 Schematischer Genomaufbau für Vertreter der 936 Phagengruppe	15
Abbildung 9 LAMP-Methode: Bildung der Ausgangsfragmente für die Amplifikation.	18
Abbildung 10 LAMP-Methode: Schematische Übersicht der notwendigen Primer und deren Zielregionen.	18
Abbildung 11 LAMP-Methode: Exponentielle Amplifikation der Ausgangsfragmente.....	19
Abbildung 12 CsCl Gradient nach der Zentrifugation.	31
Abbildung 13 Edelstahlröhrchen zur Phagenerhitzung.....	32
Abbildung 14 Low Range PFG Marker (NEB).	37
Abbildung 15 Schematische Darstellung eines <i>de novo</i> Assembly.	40
Abbildung 16 Benutzeroberfläche der online-Software PrimerExplorer.....	44
Abbildung 17 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 7 aufgereinigten <i>L. lactis</i> und 2 <i>Leuconostoc</i> spp. Phagen. <i>L. lactis</i> Phagen.....	48
Abbildung 18 Gelelektrophorese der mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA der aufgereinigten Phagen.	49
Abbildung 19 Pulsfeldgelelektrophorese der intakten genomischen DNA der zur Sequenzierung vorbereiteten Phagen.	50
Abbildung 20 Stammbaum aller konkatenierten AS-Sequenzen der P087 Phagengruppe.	55
Abbildung 21 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P596 mit dem Typphagen P087.....	55
Abbildung 22 Alignment der Aminosäuresequenz der Rezeptor-Binde-Proteine der P087 Phagengruppe.....	56

Abbildung 23 Stammbaum aller konkatenierten AS-Sequenzen der 949 Phagengruppe.	57
Abbildung 24 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P1048 mit dem Typphagen 949 und den beiden weiteren 949 Phagen phiL47 und WRP3.	58
Abbildung 25 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des RBP der Vertreter der 949 Phagegruppe.....	59
Abbildung 26 Alignment der Aminosäuresequenz der Rezeptor-Binde-Proteine der 949 Phagengruppe.....	60
Abbildung 27 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P1046 mit dem nächsten Verwandten nach BLAST Phage 1706.....	61
Abbildung 28 Vergleichende Sequenzanalyse des Phagen P1045 mit den Mitgliedern der nach BLAST am nächsten verwandte Phagengruppe P335, Untergruppe BM13.	62
Abbildung 29 Agarosegelelektrophorese (links) und DNA/DNA Hybridisierung (rechts). Für die Hybridisierung wurde DIG markierte DNA des Phagen P1046 als Sonde eingesetzt.....	63
Abbildung 30 Ausschnitt des Alignments der Phagen P1045 und P1046 mit den aneinandergereihten <i>contigs</i> der beiden <i>L. lactis</i> Stämmen MBT75 und MBT60.....	64
Abbildung 31 Ausschnitt des Ergebnisses für das Contig 11 des <i>L. lactis</i> Stamms MBT75 durch das Programm PHASTER.....	65
Abbildung 32 Alignment des Phagen P1046 mit dem vollständigen contig 11 des Assemblys des <i>L. lactis</i> Stamms MBT75.....	65
Abbildung 33 Alignment des Contig 11 des Stamms MBT75 und des Phagen P1046...66	66
Abbildung 34 Gelelektrophorese des PCR Produktes mit den Primern P1046-F und P1046-R.....	66
Abbildung 35 Teil 1 des phylogenetischen Stammbaumes der konkatenierten Proteinsequenzen von 112 bekannten Genomsequenzen der Phagengruppe 936.	69
Abbildung 36 Teil 2 des phylogenetischen Stammbaumes der konkatenierten Proteinsequenzen von 112 bekannten Genomsequenzen der Phagengruppe 936.	70
Abbildung 37 Prozentuale Ähnlichkeiten der konkatenierten AS-Sequenz aller hitze-resistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen.	71
Abbildung 38 Schematische Übersicht der Genome der hitze-resistenten <i>L. lactis</i> Phagen im Vergleich mit einer schematischen Darstellung eines typischen 936-Phagen.....	71

Abbildung 39 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der hitzeresistenten <i>L. lactis</i> Phagen.....	72
Abbildung 40 Vergleich von ausgewählten Mitgliedern der <i>Lactococcus lactis</i> 936 Phagengruppe.....	73
Abbildung 41 IEP von 13 ausgewählten Vertretern der 936 Phagengruppe für vier Strukturproteine.....	74
Abbildung 42 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des „mcp“ aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen	76
Abbildung 43 Phylogenetischer Stammbaum des <i>mcp</i> -Gens von 112 <i>L. lactis</i> Phagen.....	77
Abbildung 44 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des TMP aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen	78
Abbildung 45 Phylogenetischer Stammbaum des <i>tmp</i> -Gens von 111 AS-Sequenzen... ..	79
Abbildung 46 Teil 1 des phylogenetischen Stammbaumes der RBP AS-Sequenzen von 111 <i>L. lactis</i> Phagen der 936 Phagengruppe.	81
Abbildung 47 Teil 2 des phylogenetischen Stammbaumes der RBP AS-Sequenzen von 111 <i>L. lactis</i> Phagen der 936 Phagengruppe.. ..	82
Abbildung 48 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des RBP aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen.	83
Abbildung 49 Prozentuale Ähnlichkeiten der AS-Sequenz des „portal proteins“ aller hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen	83
Abbildung 50 Stammbaum des Portal Proteins von 111 AS-sequenzen der 936 Phagen.	85
Abbildung 51 Alignment der AS-Sequenzen der Portal Proteine der hitzeresistenten Phagen und der in Tabelle 11 gelisteten Vergleichsphagen.	88
Abbildung 52 Inaktivierung der Phagen P008 und P1532 in ddH ₂ O bei unterschiedlichen Inaktivierungstemperaturen.....	90
Abbildung 53 TEM Bilder der thermischen Inaktivierung des hitzeresistenten Phagen P1532.....	91
Abbildung 54 TEM Bilder der thermischen Inaktivierung des hitzesensitiven Phagen P008.	92
Abbildung 55 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagen P008wt (A), P008-M2 (B) und P008-M1 (C)	93

Abbildung 56 Phagenreduktion von P008 (●, Wildtyp) und zwei Mutanten P008-M1 (▼, Punktmutation im TMP) und P008-M2 (○, Deletion im TMP).....	93
Abbildung 57 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate für den Phagen P680 im LAMP-Assay (A) und in der klassischen PCR-Detektion (B).....	96
Abbildung 58 Visualisierung der LAMP-Reaktion des <i>L. lactis</i> Phagen P680 nach Zugabe von SYBR® Safe unter UV-Licht (A) bzw. ohne extra Lichtquelle (B).	97
Abbildung 59 Vergleich des kolorimetrischen Indikatorstoffs HNB mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Safe.	98
Abbildung 60 Optimierter visueller LAMP-Nachweis des Phagen P680 mit SYBR® Safe.	98
Abbildung 61 Gelelektrophorese des LAMP-Nachweises von DNA in ddH ₂ O.....	99
Abbildung 62 Ergebnis der LAMP-Reaktionen in Sauermolke. A: visueller Nachweis durch den Einsatz von SYBR® Safe; B: Agarose-Gelelektrophorese der Reaktionen.....	100
Abbildung 63 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate für den in Sauermolke resuspendierten Phagen P680 im LAMP-Ansatz (A) und in der klassischen PCR-Detektion (B) mit (linke Gelseite, Bild 34B) und ohne (rechte Gelseite, Bild 34B) Zugabe von Chelex®-100.....	101
Abbildung 64 Alignment des in Abbildung 19 markierten Genbereiches der vier hitzeresistenten Phagen P680, P4565, P1532 und P656.....	103
Abbildung 65 LAMP-Nachweis von vier hitzeresistenten 936 Phagen unter einer UV-Licht Quelle.....	104
Abbildung 66 Ausschnitt eines Alignments von insgesamt 112 Phagengenomen. Dargestellt sind 58 Genome.....	105
Abbildung 67 Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte von 14 <i>Leuconostoc</i> Phagen, mit den unmodifizierten Primern nach Ali <i>et al.</i> (2013) (A) und mit den modifizierten reversen Primer (B).....	106
Abbildung 68 Alignment eines Bereiches des „major tail proteins“-Gens (<i>mtp</i> -Gen) von drei <i>Leuconostoc</i> Phagen.....	107
Abbildung 69 Wirtsspektrum Analyse von Vertretern der <i>L. lactis</i> 936 Phagen (a), - P087 Phagen (b, orangener Kasten), - 949 Phagen (c, blauer Kasten).....	110
Abbildung 70 Alternative Lebenszyklen von Bakteriophagen.....	114

Abbildung 71 Stammbaum der konkatenierten Strukturproteine von 54 Phagen der 936 Phagengruppe.....	117
Abbildung 72 Log-Stufen-Inaktivierung der untersuchten Phagen bei 70 °C, 80 °C und 90 °C	118
Abbildung 73 Inaktivierung der Phagen CB14 WT (blau), CB14 a (rot) und CB14 b (grün) bei 70 °C und bei 75 °C.....	118
Abbildung 74 Thermische Inaktivierung des Phagen P1532 in Magermilch bei 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 95 °C und 97 °C.	119
Abbildung 75 TEM Bilder der Phagen P008 (A-C) und P680 (D-F).....	120
Abbildung 76 schematische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Temperaturen auf die Struktur des T7 Phagenpartikels	121
Abbildung 77 Liste der auf Hitzeresistenz getesteten Phagen.	122
Abbildung 78 Vergleich von HNB (a), SYBR® Green (b) und Clacein (c) zum DNA-Nachweis.....	124

Literaturverzeichnis

- Abedon, S. T. 2009. Disambiguating bacteriophage pseudolysogeny: an historical analysis of lysogeny, pseudolysogeny, and the phage carrier state. *Contemporary trends in bacteriophage research*, 285-307.
- Ackermann, H.-W. 2012. Chapter 1 - Bacteriophage Electron Microscopy. In: ŁOBOCKA, M. & SZYBALSKI, W. T. (eds.) *Advances in Virus Research*. Academic Press.
- Ackermann, H. W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol*, 146, 843-57.
- Ackermann, H. W. & Dubow, M. S. 1987. *Viruses of Prokaryotes: General properties of bacteriophages*, CRC Press.
- Ackermann, H. W. & Eisenstark, A. 1974. The present state of phage taxonomy. *Intervirology*, 3, 201-19.
- Adams, M. H. 1959. *Bacteriophages*, Interscience Publishers, New York 1.
- Ali, Y. 2009. Molecular Studies on Bacteriophages of the Food Starter Culture *Streptococcus thermophilus*. Kiel: Max Rubner-Institut.
- Ali, Y., Kot, W., Atamer, Z., Hinrichs, J., Vogensen, F. K., Heller, K. J. & Neve, H. 2013. Classification of Lytic Bacteriophages Attacking Dairy *Leuconostoc* Starter Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3628-3636.
- Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., Raiko, M., Lapidus, A. & Pevzner, P. A. 2016. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, 32, 3380-3387.
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y. & Wishart, D. S. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44, W16-W21.
- Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K. J. & Hinrichs, J. 2011. Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*, 21, 327-334.
- Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J. & Hinrichs, J. 2009a. Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*, 19, 228-235.
- Atamer, Z., Dietrich, J., Neve, H., Heller, K. J. & Hinrichs, J. 2010. Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages. *International Dairy Journal*, 20, 408-414.
- Atamer, Z. & Hinrichs, J. 2010. Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *International Dairy Journal*, 20, 163-168.
- Atamer, Z., Neve, H., Heller, K. J. & Hinrichs, J. 2009b. Hitzeresistente Bakteriophagen - Thermische Inaktivierung in verschiedenen Stoffströmen der Käserei. *Deutsche Milchwirtschaft*, 60, 84-88.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., Dejongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., Mcneil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9, 75.

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. & Pevzner, P. A. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19, 455-477.
- Bebeacua, C., Lorenzo Fajardo, J. C., Blangy, S., Spinelli, S., Bollmann, S., Neve, H., Cambillau, C. & Heller, K. J. 2013a. X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target. *Mol Microbiol*, 89, 152-65.
- Bebeacua, C., Tremblay, D., Farenc, C., Chapot-Chartier, M.-P., Sadovskaya, I., Van Heel, M., Veessler, D., Moineau, S. & Cambillau, C. 2013b. Structure, Adsorption to Host, and Infection Mechanism of Virulent Lactococcal Phage p2. *Journal of Virology*, 87, 12302-12312.
- Birren, B. & Lai, E. 1994. Rapid pulsed field separation of DNA molecules up to 250 kb. *Nucleic Acids Res*, 22, 5366-70.
- Björkroth, J. & Holzapfel, W. 2006. Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella. In: DWORKIN M., F. S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K., STACKEBRANDT E. (ed.) *The Prokaryotes, 3rd Edn*. New York, NY: Springer Science + Business Media.
- Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31, 230-314.
- Brinks, E., Wagner, N., Neve, H., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Franz, C. M. a. P. & Heller, K. J. 2018. Detection of Lactococcus lactis phage P680, a heat resistant member of the 936 group of phages, by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *International Dairy Journal*, 82, 1-3.
- Bylund, G. 2003. *Dairy processing handbook*, Lund, Sweden, Tetra Pak Processing Systems AB.
- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J. & Mcquillan, J. A. 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28, 464-469.
- Castro-Nallar, E., Chen, H., Gladman, S., Moore, S. C., Seemann, T., Powell, I. B., Hillier, A., Crandall, K. A. & Chandry, P. S. 2012. Population genomics and phylogeography of an Australian dairy factory derived lytic bacteriophage. *Genome Biol Evol*, 4, 382-93.
- Cavanagh, D., Guinane, C. M., Neve, H., Coffey, A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & McAuliffe, O. 2014. Phages of non-dairy lactococci: isolation and characterization of PhiL47, a phage infecting the grass isolate Lactococcus lactis ssp. cremoris DPC6860. *Front Microbiol*, 4, 417.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Cogan, T. M. & Jordan, K. N. 1994. Metabolism of Leuconostoc Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77, 2704-2717.
- Corkill, J. E., Graham, R., Hart, C. A. & Stubbs, S. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from Clostridium difficile PCR ribotype 1 strains. *Journal of clinical microbiology*, 38, 2791-2792.
- D'herelle, F. 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol*, 158, 553-4.

- Daly, C., Fitzgerald, G. F. & Davis, R. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 99-110.
- Darling, A. E., Mau, B. & Perna, N. T. 2010. progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. *PLOS ONE*, 5, e11147.
- Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M. C. & Moineau, S. 2006. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4338-4346.
- Dupont, K., Vogensen, F. K., Neve, H., Bresciani, J. & Josephsen, J. 2004. Identification of the Receptor-Binding Protein in 936-Species Lactococcal Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5818-5824.
- Farley, M. M., Tu, J., Kearns, D. B., Molineux, I. J. & Liu, J. 2017. Ultrastructural analysis of bacteriophage Φ 29 during infection of *Bacillus subtilis*. *Journal of structural biology*, 197, 163-171.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van Den Berghe, A., Volckaert, G. & Ysebaert, M. 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260, 500-7.
- Fox, P. F. 2004. *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. 3 ed., Amsterdam, Elsevier Academic.
- Geagea, H., Labrie, S. J., Subirade, M. & Moineau, S. 2018. The Tape Measure Protein Is Involved in the Heat Stability of *Lactococcus lactis* Phages. *Appl Environ Microbiol*, 84.
- Geller, B. L., Ngo, H. T., Mooney, D. T., Su, P. & Dunn, N. 2005. Lactococcal 936-species phage attachment to surface of *Lactococcus lactis*. *J Dairy Sci*, 88, 900-7.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A. & Hanaki, K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46, 167-72.
- Grote, R. & Antranikian, G. 2006. Einführung in die Diversität, Systematik und Physiologie von Mikroorganismen. *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H. J. & Linacre, A. 2015. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 36, 941-944.
- Hammes, W. P. & Hertel, C. 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. (eds.) *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer US.
- Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. 2011. Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, 1, 298-303.
- Heller, K., Bockelmann, W., Brockmann, E. & Hansen, C. 2013. Identification of probiotics at strain level - Guidance document. *Bulletin : International Dairy Federation (IDF)*, 5-13.
- Heller, K. J. 2006. Mikrobiologie der Lebensmittelfermentationen. In: ANTRANIKIAN, G. (ed.) *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Heller, K. J., Loessner, M. J. & Fieseler, L. 2011. *Bakteriophagen: Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendungen zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern*, Behr.

- Hong, M., Zha, L., Fu, W., Zou, M., Li, W. & Xu, D. 2012. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 523-31.
- International Human Genome Sequencing, C., Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., Levine, R., Mcewan, P., Mckernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.-F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860.
- Kenny, J. G., Mcgrath, S., Fitzgerald, G. F. & Van Sinderen, D. 2004. Bacteriophage Tuc2009 Encodes a Tail-Associated Cell Wall-Degrading Activity. *Journal of Bacteriology*, 186, 3480-3491.
- Khan, S. R. & Kuzminov, A. 2017. Pulsed-field gel electrophoresis does not break *E. coli* chromosome undergoing excision repair after UV irradiation. *Analytical biochemistry*, 526, 66-68.
- Koort, J. M. K., Lukinmaa, S., Rantala, M., Unkila, E. & Siitonen, A. 2002. Technical Improvement To Prevent DNA Degradation of Enteric Pathogens in Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3497.
- Kot, W., Hansen, L. H., Neve, H., Hammer, K., Jacobsen, S., Pedersen, P. D., Sorensen, S. J., Heller, K. J. & Vogensen, F. K. 2014a. Sequence and comparative analysis of *Leuconostoc* dairy bacteriophages. *Int J Food Microbiol*, 176, 29-37.
- Kot, W., Neve, H., Heller, K. J. & Vogensen, F. K. 2014b. Bacteriophages of *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Kubota, R., Vine, B. G., Alvarez, A. M. & Jenkins, D. M. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Phytopathology*, 98, 1045-1051.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33, 1870-4.
- Kupczok, A., Neve, H., Huang, K. D., Hoepfner, M. P., Heller, K. J., Franz, C. & Dagan, T. 2018. Rates of Mutation and Recombination in Siphoviridae Phage Genome Evolution over Three Decades. *Mol Biol Evol*, 35, 1147-1159.
- Labrie, S. & Moineau, S. 2000. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 66, 987-94.
- Le, T. H., Nguyen, N. T. B., Truong, N. H. & De, N. V. 2012. Development of Mitochondrial Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the Small Liver Fluke

- Opisthorchis viverrini (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes). *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 1178-1184.
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S. & Zhang, L. 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 107, 54-61.
- Łoś, M. & Węgrzyn, G. 2012. Chapter 9 - Pseudolysogeny. In: ŁOBOCKA, M. & SZYBALSKI, W. T. (eds.) *Advances in Virus Research*. Academic Press.
- Lu, F., Romay, M. C., Glaubitz, J. C., Bradbury, P. J., Elshire, R. J., Wang, T., Li, Y., Li, Y., Semagn, K., Zhang, X., Hernandez, A. G., Mikel, M. A., Soifer, I., Barad, O. & Buckler, E. S. 2015. High-resolution genetic mapping of maize pan-genome sequence anchors. *Nature Communications*, 6, 6914.
- Madden, T. 2013. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: (MD), B. (ed.) *The NCBI Handbook*. 2nd ed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387/>: National Center for Biotechnology Information (US).
- Madera, C., Monjardin, C. & Suarez, J. E. 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of Lactococcus lactis bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7365-7371.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Brock, T. D. 2006. *Brock biology of microorganisms*, Upper Saddle River, NJ, Pearson Prentice Hall.
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S. & Van Sinderen, D. 2012a. Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology*, 434, 143-50.
- Mahony, J., Kot, W., Murphy, J., Ainsworth, S., Neve, H., Hansen, L. H., Heller, K. J., Sorensen, S. J., Hammer, K., Cambillau, C., Vogensen, F. K. & Van Sinderen, D. 2013a. Investigation of the relationship between lactococcal host cell wall polysaccharide genotype and 936 phage receptor binding protein phylogeny. *Appl Environ Microbiol*, 79, 4385-92.
- Mahony, J., Martel, B., Tremblay, D. M., Neve, H., Heller, K. J., Moineau, S. & Van Sinderen, D. 2013b. Identification of a new P335 subgroup through molecular analysis of lactococcal phages Q33 and BM13. *Appl Environ Microbiol*, 79, 4401-9.
- Mahony, J., Moscarelli, A., Kelleher, P., Lugli, G. A., Ventura, M., Settanni, L. & Van Sinderen, D. 2017. Phage Biodiversity in Artisanal Cheese Wheys Reflects the Complexity of the Fermentation Process. *Viruses*, 9, 45.
- Mahony, J., Murphy, J. & Van Sinderen, D. 2012b. Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: from detection to evolution and prevention. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Mahony, J., Randazzo, W., Neve, H., Settanni, L. & Van Sinderen, D. 2015. Lactococcal 949 Group Phages Recognize a Carbohydrate Receptor on the Host Cell Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3299-3305.
- Mahony, J. & Van Sinderen, D. 2014. Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Front Microbiol*, 5, 7.
- Mardanov, A. V. & Ravin, N. V. 2007. The Antirepressor Needed for Induction of Linear Plasmid-Prophage N15 Belongs to the SOS Regulon. *Journal of Bacteriology*, 189, 6333.

- Martinez, E., Campos-Gomez, J. & Barre, F. X. 2016. CTXvarphi: Exploring new alternatives in host factor-mediated filamentous phage replications. *Bacteriophage*, 6, e1128512.
- Marvig, C. L., Aideh, B., Neve, H., Heller, K. J., Knøchel, S. & Vogensen, F. K. 2011. Heat tolerance of dairy lactococcal c2 phages. *International Dairy Journal*, 21, 556-560.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N. & Notomi, T. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*, 59, 145-57.
- Muller-Merbach, M., Neve, H. & Hinrichs, J. 2005. Kinetics of the thermal inactivation of the *Lactococcus lactis* bacteriophage P008. *J Dairy Res*, 72, 281-6.
- Murphy, J., Bottacini, F., Mahony, J., Kelleher, P., Neve, H., Zomer, A., Nauta, A. & Van Sinderen, D. 2016. Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal Siphoviridae phages. 6, 21345.
- Murphy, J., Klumpp, J., Mahony, J., O'connell-Motherway, M., Nauta, A. & Van Sinderen, D. 2014. Methyltransferases acquired by lactococcal 936-type phage provide protection against restriction endonuclease activity. *BMC Genomics*, 15, 831.
- Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 16, 223-9.
- Neve, H., Kemper, U., Geis, A. & Heller, K. J. 1994. Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophages in a dairy plant. *Kieler Milchw. Forsch.*, 46, 167-178.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28, e63.
- Pedersen, M., Østergaard, S., Bresciani, J. & Vogensen, F. K. 2000. Mutational Analysis of Two Structural Genes of the Temperate Lactococcal Bacteriophage TP901-1 Involved in Tail Length Determination and Baseplate Assembly. *Virology*, 276, 315-328.
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Bjorkroth, J. & Ercolini, D. 2015. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Sci*, 109, 66-74.
- Ray, T., Mills, A. & Dyson, P. 1995. Tris-dependent oxidative DNA strand scission during electrophoresis. *Electrophoresis*, 16, 888-94.
- Romling, U. & Tummeler, B. 2000. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 38, 464-5.
- Rousseau, G. M. & Moineau, S. 2009. Evolution of *Lactococcus lactis* Phages within a Cheese Factory. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5336-5344.
- Safavieh, M., Ahmed, M. U., Sokullu, E., Ng, A., Braescu, L. & Zourob, M. 2014. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection. *Analyst*, 139, 482-7.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed.*, Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, J. E. & Moineau, S. 2010. Characterization of *Lactococcus lactis* Phage 949 and Comparison with Other Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6843-6852.
- Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. 2015. Application of a membrane technology to remove bacteriophages from whey. *International Dairy Journal*, 48, 38-45.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison Iii, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265, 687.

- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. 1978. The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *Journal of Molecular Biology*, 125, 225-246.
- Siringan, P., Connerton, P. L., Cummings, N. J. & Connerton, I. F. 2014. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open biology*, 4, 130200-130200.
- Sullivan, M. J., Petty, N. K. & Beatson, S. A. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27, 1009-10.
- Tanner, N. A. & Evans, T. C. 2014. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Nucleic Acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, 105, 15.14.1-15.14.14.
- Tao, Z. Y., Zhou, H. Y., Xia, H., Xu, S., Zhu, H. W., Culleton, R. L., Han, E. T., Lu, F., Fang, Q., Gu, Y. P., Liu, Y. B., Zhu, G. D., Wang, W. M., Li, J. L., Cao, J. & Gao, Q. 2011. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasit Vectors*, 4, 115.
- Terzaghi, B. E. & Sandine, W. E. 1975. Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807-813.
- Tuomanen, E. 2006. *Streptococcus pneumoniae*. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. (eds.) *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer US.
- Twort, F. W. 1915. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet*, 186, 1241-1243.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., Mckusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Francesco, V. D., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R.-R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z. Y., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M.-H., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., *et al.* 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291, 1304-1351.
- Vörös, Z., Csík, G., Herényi, L. & Kellermayer, M. 2018. Temperature-dependent nanomechanics and topography of bacteriophage T7. *Journal of Virology*.
- Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C., Neve, H. & Heller, K. J. 2017. Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *Int J Food Microbiol*, 241, 308-317.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-13.

- Wang, I. N., Smith, D. L. & Young, R. 2000. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol*, 54, 799-825.
- Yuan, Y. & Gao, M. 2017. Jumbo Bacteriophages: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 8, 403.
- Zhang, X., Lowe, S. B. & Gooding, J. J. 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491-499.