

**Die Endolysine von *Clavibacter michiganensis*-Phagen
als Kandidaten für den biologischen Pflanzenschutz
von Tomatenpflanzen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Johannes Wittmann

aus Warendorf

Mai 2011

Für meinen Großvater

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Zusammenfassung	1
Summary	3
II. Einleitung	5
1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	5
2. Bakteriophagen	7
2.1. Klassifikation der Phagen	7
2.2. Unterschiedliche Wege der Phagenvermehrung	8
2.2.1. Lytischer Zyklus	8
2.2.2. Lysogener Zyklus	10
2.3. Die <i>Clavibacter</i> -Phagen CMP1 und CN77	11
3. Unterschiedliche Strategien zur Lyse der Wirtszellen	12
3.1. Die bakterielle Zellwand	13
3.2. Aufbau des bakteriellen Peptidoglykans	13
3.3. Holine	15
3.3.1. Struktur der Holine	15
3.4. Endolysine	16
3.4.1. Allgemein	16
3.4.2. Modularer Aufbau der Endolysine	16
4. Phagentherapie	20
4.1. Einsatz von Bakteriophagen	20
4.2. Einsatz von Endolysinen zur Therapie	22
4.3. Einsatz von transgenen Organismen mit Phagengenen	23
III. Zielsetzung	25
IV. Material und Methoden	27
1. Material	27
1.1. Bakterienstämme	27
1.2. Plasmide und Vektoren	28
1.3. Nährmedien	29
1.3.1. TBY- Vollmedium	29
1.3.2. TBY- Agar	29
1.3.3. TBY-Weichagar	29
1.3.4. M9 Minimalmedium	29

1.3.5.	Spurenelemente-Lösung	30
1.3.6.	Selektivmedien	30
1.3.7.	X-Gal-Platten	30
1.4.	Längenstandards	30
1.5.	Geräte	31
2.	Methoden	32
2.1.	Plasmid-Isolierung	32
2.1.1.	Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly	32
2.1.2.	Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Spin Prep Kit	33
2.1.3.	Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Plasmid Midi Kit	34
2.1.4.	Präparation von „cleared lysate“ DNA zur qualitativen Analyse von Plasmiden	34
2.1.5.	Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales	35
2.1.6.	Qiagen-Klonanalyse (alkalische Lyse)	36
2.2.	Isolierung von Gesamt-DNA	37
2.3.	PCR-Amplifikation	38
2.4.	High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)	41
2.5.	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.6.	Fragmentisolierung mittels QIAquick Gel-Extraktion-Kit (Qiagen)	42
2.7.	Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	43
2.8.	Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.9.	Transformation	45
2.9.1.	Herstellung kompetenter Zellen	45
2.9.2.	Transformation	45
2.9.3.	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium</i> - Zellen	46
2.9.4.	Transformation von <i>Agrobacterium</i> -Zellen	46
2.10.	Elektroporation	46
2.10.1.	Herstellung elektrokompeter Zellen	47
2.10.2.	Herstellung elektrokompeter Zellen nach Thoms	47
2.10.3.	Elektroporation	48
2.11.	Random Primed DNA Markierung	48
2.12.	DNA-DNA-Hybridisierung	49
2.12.1.	Allgemeines	49
2.12.2.	Southernblot	49
2.12.3.	Southern-Hybridisierung	51
2.13.	Phagentiterung	52

2.14.	Herstellung von Bakteriophagenlysaten	53
2.14.1.	Herstellung eines Phagenlysats in Flüssigmedium	53
2.14.2.	Herstellung eines Abwaschlysats	54
2.15.	Isolierung von Phagen-DNA	54
2.16.	Überexpression von Proteinen	55
2.16.1.	Proteinisolierung	55
2.16.2.	Gesamtzellextrakt für SDS-PAGE	55
2.16.3.	French Press-Zelllysate	56
2.17.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.18.	Silberfärbung eines SDS-Gels	58
2.19.	Konservierung eines SDS-Gels	59
2.20.	Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA von QIAexpressionist™	60
2.21.	Proteinausfällung mit Ammoniumsulfat	61
2.22.	Tryptischer Verdau von Proteinen	62
2.23.	Maldi, Mascot	62
2.24.	Western Blot	63
2.24.1.	Semi-Dry Blot	63
2.24.2.	Westernblot Analyse	64
2.25.	Nachweis der lytischen Aktivität des Endolysins	65
2.26.1.	Isolation von <i>Clavibacter</i> —Murein	66
2.26.2.	Isolation von <i>Clavibacter</i> –Murein (Methode DSMZ)	67
2.27.	Überprüfung der Reinheit des isolierten Mureins	67
2.28.	Zymogramm-Analyse	68
2.29.	Erzeugung von <i>E. coli thyA</i> Mutanten	69
2.30.	Isolierung von Xylemsaft	69
2.31.	Ermittlung des Welkeindex und des Welkeverlaufs	70
2.32.	Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen	70
2.33.	Transformation von Tomatenpflanzen (<i>Lycopersicon esculentum</i> var. Money-maker)	70
2.33.1.	Sterilisation der Tomatensamen	74
2.33.2.	Vorbereitung der Kotyledonen	74
2.33.3.	Vorbereitung der <i>Agrobacterium</i> -Kultur	74
2.33.4.	Infektion and Co-Kultivierung von Pflanzenblättern mit <i>Agrobacterium</i>	74
2.33.5.	Selektion von transformiertem Gewebe	75
2.33.6.	Regeneration transgener Pflanzen	75
2.34.	Isolierung pflanzlicher DNA aus Blättern von <i>Solanum lycopersicum</i>	75

3.	Software, Internetseiten und Datenbanken	76
3.1.	Software	76
3.2.	Internetseiten und Datenbanken	76
V	Ergebnisse und Diskussion	78
1.	Molekulare und genetische Charakterisierung des Bakteriophagen CMP1	78
1.1.	Allgemeine Charakterisierung des Phagengenoms von CMP1	78
1.1.1.	Bestimmung der Größe und der Endstrukturen des Phagengenoms	78
1.1.2.	Identifizierung der terminalen Redundanz und Überprüfung einer möglichen zyklischen Permutation der Phagen-DNA	80
1.2.	Bioinformatische Analyse der Genomsequenz von CMP1	85
1.3.	Analyse möglicher Genprodukte	87
1.3.1.	Genprodukte aus der „frühen Region“	88
1.3.2.	Proteine zur Verpackung des Genoms und Strukturproteine	91
1.3.3.	Proteine zur Lyse des Wirtsorganismus	94
1.3.3.1.	Das Holin-Genprodukt des Phagen CMP1	94
1.3.3.2.	Das Endolysin-Genprodukt des Phagen CMP1	95
1.4.	Vergleich der Genome von CMP1 und CN77	96
1.5.	Vergleich der beiden Lyse-Cluster der <i>Clavibacter</i> -Phagen CMP1 und CN77	99
1.5.1.	Das Holin-Genprodukt des Phagen CN77	99
1.5.2.	Das Endolysin-Genprodukt des Phagen CN77	100
2.	Funktionelle Analyse ausgewählter Genprodukte des Phagen CMP1	101
2.1.	Der Expressionsvektor pSCodon1.2	102
2.2.	Klonierung der zu untersuchenden Gene	103
2.3.	Heterologe Expression ausgewählter Gene von CMP1 in <i>E. coli</i>	104
2.4.	Das Ssb-Protein von CMP1	106
2.4.1.	<i>Shift assay</i> mit einzelsträngiger DNA	107
2.5.	Nukleasen des Phagen CMP1	109
2.6.	Die Endonukleasen von CMP1	111
2.6.1.	Die Aktivität des Gp50 von CMP1	111
2.7.	Die Aktivität des Gp51 von CMP1	113
2.8.	ThyX von CMP1	115
2.8.1.	Herstellung von <i>E. coli thyA</i> -Mutanten und Komplementation durch ThyX	116
3.	Genprodukte von CMP1 und CN77 zur möglichen Eliminierung von <i>Clavibacter</i>	117
3.1.	Die Endolysine von CMP1 und CN77	118

3.2.	Expression und Aufreinigung der rekombinanten Endolysine von CMP1 und CN77	118
3.3.	Biologische Aktivität der Endolysine	122
3.4.	Biochemische Eigenschaften der Endolysine	125
3.5.	„Module-shuffling“ und Konstruktion von Chimär-Endolysinen	128
3.5.1.	Analyse der Nukleotidsequenzen der Endolysin-Gene von CN77 und CMP1	129
3.5.2.	Spezifische Markierung von <i>Clavibacter</i> durch ein Fusionsprotein aus der Peptidoglykan-bindenden Domäne und GFP	130
3.5.3.	Klonierung und Expression der Derivate von CN77- und CMP1-Endolysin-Genen	134
3.5.4.	Die Aktivität der neu kombinierten Endolysine	136
3.5.5.	Einfluss der Bindedomäne BCMP1 auf die Aktivität des Endolysins nach exogener Zugabe	138
3.5.6.	Potentielle Bedeutung einer separaten Bindedomäne	139
3.6.	Spezifität der Endolysine	141
3.7.	Bestimmung der Schnittstelle des Endolysins von CMP1 im Peptidoglykan von <i>Cmm</i>	144
3.7.1.	Massenspektrometrische Analyse des <i>Cmm</i> -Peptidoglykans	146
4.	Phagentherapie – Einsatz von Bakteriophagen zur Behandlung bakterieller Infektionen	149
4.1.	Vorarbeiten für den Einsatz von CMP1 zur Behandlung infizierter Tomatenpflanzen	150
4.1.1.	Stabilität aktiver Phagenpartikel im Boden	150
4.1.2.	Stabilität aktiver Phagenpartikel im Xylem der Tomatenpflanze	151
4.2.	Methoden zur Infektion von Tomatenpflanzen mit <i>Cmm</i>	152
4.3.	Behandlung von über die Wurzeln infizierten Pflanzen mit CMP1	153
4.4.	Einfluss des Zeitpunkts der Phagenbehandlung nach Infektion mit <i>Cmm</i>	154
4.5.	Phagentherapie bei über Wurzelverwundungen infizierte Pflanzen durch Gießen mit Phagenlysaten	156
4.6.	Phagentherapie bei über den Blattstiel infizierte Pflanzen	158
5.	Konstruktion einer transgenen Tomatenpflanze	161
5.1.	Konstruktion eines geeigneten Endolysin-Gens zur Expression in der Tomatenpflanze	162
5.2.	Anpassung des Codon-Gebrauchs	162
5.3.	Konstruktion eines geeigneten Plasmide zur Transformation von	

	Tomatenpflanzen mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	164
5.4.	Transformation von Tomatenpflanzen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	165
5.5.	Überprüfung der korrekten Transformation und Insertion des Endolysin-Gens	168
VI.	Konstruktion und Einsatz einer transgenen Tomatenpflanze – ein Ausblick	170
VII.	Anhang	172
VIII.	Literaturverzeichnis	180
IX.	Publikationen	198

I. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Phage CMP1, der bereits in den 1970er Jahren von Echandi und Sun isoliert wurde und nur zur Identifizierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämmen eingesetzt wurde, näher charakterisiert werden, um die Frage nach einem möglichen Einsatz zur Bekämpfung von *Clavibacter*-Infektionen bei Tomatenpflanzen klären zu können.

Im Zuge der Charakterisierung wurde die linear doppelsträngige DNA von CMP1 isoliert und anschließend sequenziert. Neben dem Genom des Phagen CMP1 wurde zum Vergleich auch das Genom des *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*-Phagen CN77 partiell sequenziert.

Die endgültige Sequenz von CMP1 ergab eine Genomlänge von 58652 bp inklusive seiner terminal-redundanten Enden von 791 bp (ca. 1,35% der Gesamtsequenz) (Wittmann *et al.*, 2011). Der durchschnittliche GC-Gehalt von 57% ist signifikant niedriger als der des Chromosoms vom Wirtsbakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (72,66%). Nach der bioinformatischen Analyse der Sequenz wurden 74 potentielle offene Leserahmen (ORFs) identifiziert, die in fünf verschiedene Cluster eingeteilt werden konnten. Dazu gehören u. a. Gene für den DNA-Metabolismus, für Strukturproteine und für Proteine zur Lyse des Wirtsbakteriums.

Lediglich 13 Gene wiesen nach der PSI-BLAST-Analyse eine konservierte Domäne auf. Um die vorhergesagten Funktionen zu verifizieren, wurden einige dieser Gene kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Nach einer ersten Charakterisierung konnten auf diese Weise u. a. die biologische Aktivität von drei Nukleasen (*orf2*, *orf49* und *orf50*) und einer Thymidylat-Synthase nachgewiesen werden.

Im Zuge der Annotation konnte bei beiden Phagensequenzen jeweils ein Endolysin-Gen identifiziert werden. Für das Endolysin-Gen von CN77 wurde eine konservierte VanY-Domäne für eine Peptidase vorhergesagt. Beide Gene wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert (Wittmann *et al.*, 2010).

Das Endolysin von CMP1 hat inklusive des fusionierten His-tags eine Länge von 306 Aminosäuren und ein berechnetes Molekulargewicht von 34,8 kDa, während das Endolysin von CN77 aus 290 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 31,9 kDa aufweist.

Nach der Expression konnten die beiden Proteine isoliert und gereinigt und für die Optimierung der Aktivität weiter biochemisch charakterisiert werden (pH-Optimum, Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen, etc). Für beide Endolysine wurde eine bakteriolytische Aktivität nachgewiesen, die sehr spezifisch und nur auf Mitglieder der *Clavibacter*-Gattung begrenzt ist. Sie lysieren keine Bakterien anderer Gattungen, nicht einmal nahe Verwandte wie *Leifsonia* oder *Rathayibacter*.

Versuche zu einer möglichen Phagentherapie, bei denen Tomatenpflanzen mit *Cmm* infiziert und anschließend mit Bakteriophagen behandelt wurden, zeigten, dass eine Behandlung mit Phagen zwar zu einer verzögerten Ausprägung von Welkesymptomen führt, eine komplette Eliminierung der pathogenen Bakterien konnte aber nicht erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde mit der Konstruktion einer transgenen Tomatenpflanze begonnen, die das Gen für das CMP1-Endolysin trägt, exprimiert und das Protein ins Xylem sekretiert. Dazu wurde das Gen an die *codon usage* der Tomatenpflanze angepasst, mit einer Sequenz für ein Signalpeptid versehen und anschließend in einen passenden Vektor zur Transformation von Tomatenkotyledonen durch *Agrobacterium tumefaciens* kloniert. Nach der Transformation konnten einige Kanamycin-resistente Pflänzchen erhalten werden, bei denen eine Insertion des optimierten Endolysin-Gens nachgewiesen werden konnte.

I. Summary

Within this dissertation the *Clavibacter michiganensis* phage CMP1, which was isolated from dry infected overwintering tomato stems by Echandi and Sun in 1972, should be further characterized to deal with the question of a possible biological plant protection of tomato plants from infection with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). The authors characterized it just partially to use it for the rapid identification of its host *Cmm*.

For a future application of phage CMP1 in the protection of tomato plants it should be characterized in more detail which includes the determination of the genome sequence. Therefore the double-stranded DNA of CMP1 was isolated and sequenced afterwards. In addition to that the genome of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* phage CN77 was partially sequenced for the purpose of comparison. The final genome sequence of CMP1 has a length of 58652 bp including the terminal redundant ends of 791 bp each (Wittmann *et al.*, 2011). It has a G+C content of 57% which is significantly lower than the G+C content of its host *Cmm* (72,6%). After the analysis with several bioinformatics tools 74 putative open reading frames (orfs) were identified which are organized in two large gene clusters on different strands. The orfs could be divided into five functional clusters, e.g. DNA metabolism, structural proteins and lysis of the host. After the comparison of the deduced amino acid sequences with the database PSI-BLAST only thirteen revealed a kind of conserved domain. To verify their predicted functions some genes were amplified by PCR, cloned into expression vectors and expressed in *E. coli*. After first experiments the biological activity of some gene products, e.g. three nucleases and a thymidylate synthase, were clearly identified.

During the annotation a gene for a putative endolysin was identified in both phage genomes. The amino acid sequence of the CN77 endolysin revealed a conserved VanY-domain for a peptidase. Both genes were cloned and expressed in *E. coli* (Wittmann *et al.*, 2010). The His-tagged endolysin of CMP1 consists of 306 amino acids and has a calculated molecular mass of 34,8 kDa, whereas the His-tagged endolysin of CN77 has 290 amino acids with a molecular mass of 31,9 kDa. The proteins were purified and their bacteriolytic activity was demonstrated. After optimizing the experimental conditions the bacteriolytic activity of both enzymes showed a host range which was limited to the respective *Clavibacter michiganensis* subspecies and did not affect other bacteria, even those closely related to *Clavibacter*.

Plant assays with tomato plants that were infected with *Cmm* and treated with phages afterwards showed that an application of CMP1 to infected tomato plants has only poor chances to be successful. It only led to a delayed appearance of wilt symptoms, but no total elimination of *Cmm* was achieved.

Since the high host specificity of the endolysins was demonstrated, first steps of the construction of a transgenic tomato plant that expresses a gene for an endolysin were started. The sequence of the endolysin of CMP1 was adapted to the codon usage of tomato plants to assure an optimal expression in the plant. In addition the gene was fused with a signal peptide addressing the protein into the xylem vessels. After the construction of the gene plant cells of cotyledons of tomato seedlings were transformed with the binary hybrid plasmid by *Agrobacterium tumefaciens*. After the transformation and selection of transformed tissue several tomato plants were regenerated which were proved to carry the inserted gene for the endolysin.

II. Einleitung

1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ist ein Phytopathogen, das bei der Tomate (*Solanum lycopersicum*) die bakterielle Welke (*bacterial wilt and canker*) hervorruft (Davis *et al.*, 1984). Es ist ein Gram-positives, nicht sporenbildendes, unbegeißeltes Bakterium mit coryneformer Morphologie. Auf festen Nährmedien bildet *Cmm* aufgrund von starker Exopolysaccharid (EPS)-Produktion mukoide Kolonien (Bermpohl *et al.*, 1996).

Clavibacter gehört zur Gruppe der Actinomyceten (Davis *et al.*, 1984) und konnte durch 16S-rDNA-Analysen in die Familie der *Microbacteriaceae* eingeordnet werden (Stackebrandt *et al.*, 1997). Die Gattung *Clavibacter* umfasst nur eine Art - *Clavibacter michiganensis* -, welche aber mehrere Subspezies aufweist, die unterschiedliche Wirtspflanzen infizieren (Carlson and Vidaver, 1982) und weltweit verbreitet sind (EPPO/CABI, 2005; Abb. 1).

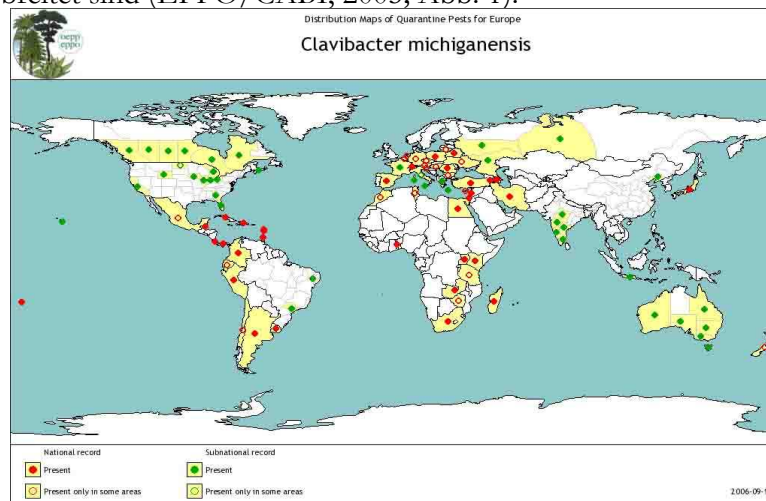


Abb. 1 Verbreitung von *Clavibacter michiganensis*, (www.eppo.org, Stand 2006).

Alle Subspezies infizieren ihre Wirtspflanzen über das vaskuläre System und führen dabei zu einer systemischen Infektion, bei der verschiedene Symptome auftreten (Tab. 1).

Phytopathogen	Wirtspflanze	Krankheitsbild
<i>Cm</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Leguminosen, z. B. Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	bakterielle Welke
<i>Cm</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	bakterielle Welke
<i>Cm</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Mais (<i>Zea mays</i>)	Blatt- und Stängelfäule
<i>Cm</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	bakterielle Ringfäule
<i>Cm</i> subsp. <i>tessellarius</i>	Weizen (<i>Triticum</i>)	Blattflecken

Tab. 1 Subspezies von *Clavibacter michiganensis* mit Wirtspflanze und Krankheitsbild (Metzler *et al.*, 1997).

Tomaten (*Solanum lycopersicum*), die Wirtspflanzen von *Cmm*, werden über Wunden im Spross- und Wurzelbereich oder über die Hydathoden infiziert (Carlton *et al.*, 1998). Anschließend kolonisiert *Cmm* das Xylem (Abb. 2 C) und führt so zu einer systemischen Infektion (Strider *et al.*, 1969). Zu Beginn der Infektion wird das Wachstum der Pflanze gehemmt, bis mit der unifazialen Fiederblattwelke die ersten sichtbaren Symptome auftreten. Dabei rollen sich auf einer Seite der Pflanze die Blätter von den Blatträndern her ein und welken aufgrund einer schwindenden Turgeszenz (Abb. 2 A). Im Spätstadium der Infektion kommt es oft zu Sprossläsionen (*canker*) (Abb. 2 B), die zum Verlust der Standfestigkeit der Pflanze und damit zum Abknicken und folglich zum Absterben der Pflanze führen (Wallis, 1977). Im Spätstadium der Infektion können Titer von über 10^9 CFU/Gramm Pflanzenhomogenat (Meletzus *et al.*, 1993) nachgewiesen werden.

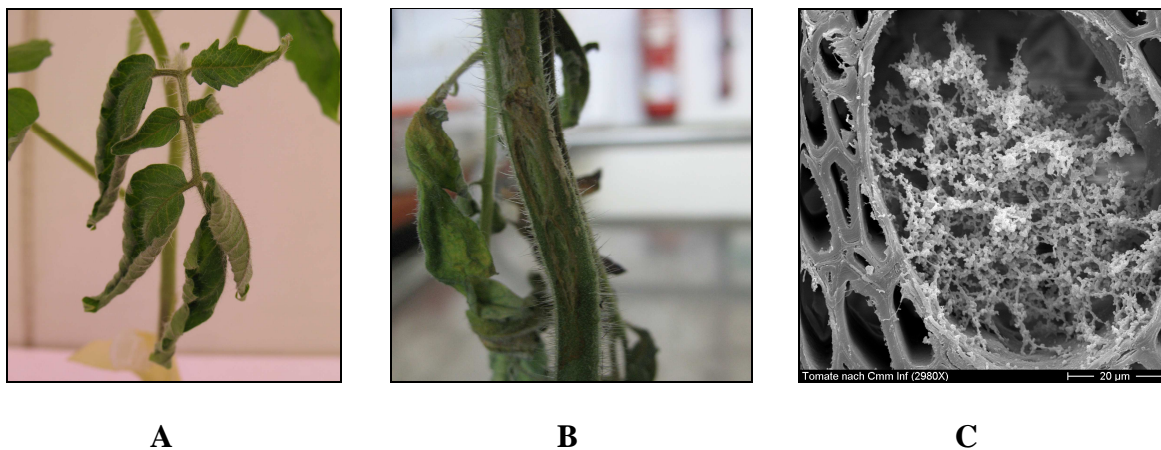


Abb. 2 Symptome einer *Cmm*-Infektion von Tomatenpflanzen: Fiederblattwelke (A), Sprossläsion (B), REM-Aufnahme von Xylemgefäßen einer mit *Cmm* infizierten Tomatenpflanze (T. Trapphoff) (C).

Werden Tomatenpflanzen erst in einem späten Stadium von *Cmm* befallen, können auch Samen von *Cmm* infiziert werden. Auf diesem Wege sorgt kontaminiertes Saatgut für die Verbreitung des Bakteriums und weitere Ausbrüche der Krankheit (Tsiantos, 1987). Zudem ist *Cmm* in der Lage, mehrere Jahre in abgestorbenem Pflanzenmaterial im Boden zu überdauern (Fatmi *et al.*, 2002). Aufgrund dieser beiden Gegebenheiten und der Tatsache, dass es bisher keine *Cmm*-resistenten Sorten gibt, kommt es weltweit häufig zu hohen Ernteverlusten, dem Ausfall von kontaminierten Nutzflächen und einem damit verbundenen großen wirtschaftlichen Schaden (EPPO/CABI, 2005). Deshalb wird *Cmm* in der EU und vielen anderen Staaten als Quarantäneorganismus behandelt und momentan sind die Überprüfung des Saatgutes und strengste Hygiene die wichtigsten Maßnahmen zur Eindämmung dieser bakteriellen Pflanzenkrankheit. Laut der Bundesanstalt für Züchtungsforschung sind Bakteriosen an Nutzpflanzen zurzeit chemisch nicht bekämpfbar. Behandlungen mit Kupfersulfat oder Streptomycin versprochen bei *Clavibacter*-

Infektionen zunächst Erfolg, allerdings wurde hier auch von auftretenden Resistenzen berichtet (Bender and Cooksey, 1986).

Aufgrund der bisher noch fehlenden Alternativen zum Schutz von Tomatenpflanzen vor Infektionen mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* wäre der Einsatz von Bakteriophagen zur Bekämpfung und Prophylaxe solcher Infektionen denkbar.

Eine Zusammenfassung der Literaturdaten und der Arbeiten der Arbeitsgruppe zu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bieten neuere Übersichtsartikel (Eichenlaub *et al.*, 2007; Eichenlaub and Gartemann, 2011).

2. Bakteriophagen

2.1. Klassifikation der Phagen

Bakteriophagen sind hochspezialisierte Viren, die an einen spezifischen bakteriellen Wirt angepasst sind. Um sich zu vermehren und neue Viruspartikel bilden zu können, sind sie vom Stoffwechsel des Wirtes abhängig (Klaus *et al.*, 1992). Die Charakterisierung der Bakteriophagen als Viren von Bakterien konnte erst mit der Entwicklung der Elektronenmikroskopie bestätigt werden (Pfankuch und Kausche, 1940). Bakteriophagen treten ubiquitär auf der Erde auf und ihre Zahl wird auf ca. 10^{31} geschätzt (Rohwer and Edwards, 2002; Whitman *et al.*, 1998).

Bakteriophagen sind ebenso wie andere Viren aus zwei unterschiedlichen Komponenten aufgebaut – aus einer aus vielen Proteinuntereinheiten bestehenden Kapsid-Hülle und dem darin enthaltenen Nukleinsäure-Molekül, dem Phagen genom, welches sowohl aus RNA als auch aus DNA bestehen kann. Diese können als Einzel- oder Doppelstrang-Moleküle vorliegen und tragen die Information für die Replikation des Phagen genoms und die Synthese der Strukturproteine.

Klassifikationen der Phagen erfolgen nach der Art ihrer Nukleinsäure und der Morphologie ihrer Köpfe und Schwänze, die aus verschiedenen Protein-Untereinheiten aufgebaut sind. Eine Klassifikation bekannter Bakteriophagen wurde zuerst 1965 von Bradley entwickelt und später von Ackermann und Dubow (1987) modifiziert. Nach diesem Schema erfolgt die Einteilung in verschiedene morphologische Grundtypen (Abb. 3). Die Gruppen A-C bilden demnach geschwänzte Phagen mit doppelsträngiger DNA und werden in der Ordnung *Caudovirales* zusammengefasst. Die Ordnung der *Caudovirales* stellt die weitaus größte Gruppe der Phagen dar. Innerhalb dieser Ordnung wird zwischen Phagen der Familie der *Myoviridae* (A, Schwanz lang und kontraktile), *Siphoviridae* (B, Schwanz lang, nicht kontraktile) und *Podoviridae* (C, Schwanz kurz, nicht kontraktile) unterschieden. Bei einer weiteren Unterteilung beziehen sich die Untertypen A1-3, B1-3 und C1-3 auf unterschiedliche Kopflängen der geschwänzten Phagen. Die Gruppen D und E

beschreiben schwanzlose Phagen mit einem isometrischen Kopf aus großen bzw. kleinen Proteinuntereinheiten und Einzelstrang-DNA bzw. Einzelstrang-RNA. Gruppe F und G umfassen nur wenige filamentöse bzw. pleomorphe Phagen.

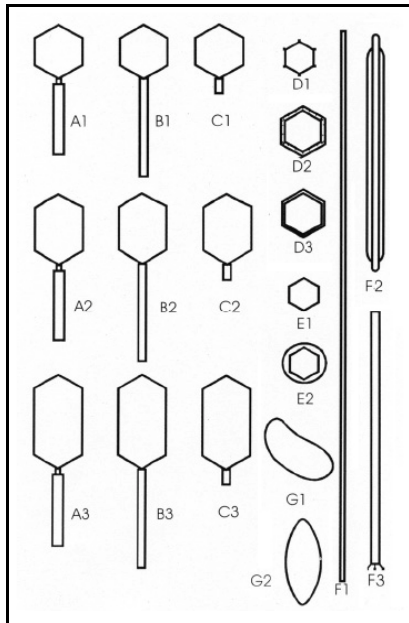


Abb. 3 Morphotypen von Bakteriophagen (nach Ackermann, 2003) (A= *Myoviridae*, B= *Siphoviridae*, C= *Podoviridae*).

2.2. Unterschiedliche Wege der Phagenvermehrung

Bei der Vermehrung der Phagen nach der Infektion des Wirtsbakteriums wird zwischen einem lytischen und einem lysogenen Zyklus unterschieden. Zusammenfassend lässt sich die Infektion durch den Phagen in folgende Schritte unterteilen: Adsorption an die Wirtszelle, Injektion der DNA, Replikation des Phagen-genoms und Produktion der Phagenproteine, Zusammenbau der Köpfe und Schwänze, Verpackung der viralen DNA und zuletzt Freisetzung der neuen Phagen durch Lyse des Wirts.

Bei der Adsorption des Phagen an die Zellwand des Wirtsbakteriums binden seine Schwanzfasern an spezifische Rezeptoren in der Bakterienzellwand, die häufig durch Lipoproteine und Lipopolysaccharide repräsentiert werden (Lindberg, 1973). Aufgrund dieser Affinität zwischen Rezeptor und Schwanzfasern bzw. Endplatte des Phagen ergibt sich die hohe Wirtsspezifität der Phagen. Nach der Injektion des Phagen-genoms in das Bakterium, entscheidet sich, ob der lytische oder lysogene Zyklus eingeschlagen wird.

2.2.1. Lytischer Zyklus

Nach der Injektion der DNA werden beim lytischen Zyklus während der Latenzphase, in der keine freien Phagen im Medium nachgewiesen werden können, die Phagen-Nachkommen

synthetisiert. Die Länge der Latenzphase hängt von verschiedenen Faktoren ab, z. B. von der physiologischen Kondition des Wirtes, Zelldichte der Wirtsbakterien und Zusammensetzung und Temperatur des Mediums (Ackermann und Dubow, 1987; Wang *et al.*, 1996). Zeitpunkt und Regulation der Lyse hängen dann wiederum von der Latenzphase jedes Phagen ab.

Aufgrund der geringen Größe der Phagen Genome ist die Codierungsdichte sehr hoch, d. h. die Gene folgen sehr dicht aufeinander und können dabei sogar mit wenigen Codons überlappen. Funktionell zusammengehörige Proteine werden von geclusterten Genen codiert und sind meist in Operons organisiert. Die Reihenfolge der Gene auf dem Genom spiegelt auch deren zeitliche Expression in der Zelle wider. Man teilt die Funktionen in sehr frühe, frühe und späte Gene ein (Studier, 1969; Studier und Maizel, 1969).

Die sehr frühen Genprodukte dienen der Abschaltung (*shutoff*) des Wirtsstoffwechsels. Unter den sehr frühen Genprodukten sind solche z. B. Antirestriktionsproteine und Proteine, die die Wirts-RNA-Polymerase modifizieren (Hesselbach and Nakada, 1977; Geiduschek and Kassavetis, 1988). Anschließend werden die „frühen“ Gene transkribiert, zu deren Genprodukten Nukleasen und andere Replikationsproteine wie Polymerasen und Helikasen gehören, so dass eine Vermehrung der Phagen-DNA gewährleistet ist. Die Nukleasen können z. B. auch die bakterielle DNA hydrolysieren, um die daraus folgenden Nukleotide zur Synthese eigener viraler DNA nutzen zu können. Danach folgt die Transkription der so genannten späten Gene, die die Strukturproteine des Phagen wie z. B. Schwanz- und Kopf-Proteine codieren. Kapsid und Schwanz werden getrennt voneinander synthetisiert und erst später zusammengefügt (Leiman *et al.*, 2003). Der Schwanz besteht aus mehreren Untereinheiten, meistens aus dem *major tail*- und *minor tail*-Protein, einer basalen Endplatte und mehreren Schwanzfasern. Die Länge des Schwanzes wird dabei vom *tape tail measure*-Protein reguliert, das als Form gebendes Gerüst fungiert, um das die anderen Proteine angeordnet werden (Katsura and Hendrix, 1984). Das Kapsid besteht meist aus vielen Molekülen des *major head*-Proteins, die die Flächen des Ikosaeders ausfüllen, und Proteinen, die diese dreieckigen Strukturen verbinden. Oft werden die Proteine des Kapsids noch durch Proteasen prozessiert, um dem Kapsid die endgültige Struktur zu geben. An der Öffnung des Kapsids befindet sich das Portalprotein, durch das die Phagen-DNA in das Kapsid gelangt. Die Verpackung der viralen DNA in die Phagenköpfe erfolgt mit Hilfe einer Terminase, deren Untereinheiten die DNA bindet, in die Kapside befördert und anschließend schneidet (Black, 1995; Rao and Feiss, 2008). Die Verpackung geht dabei von hochmolekularen Replikationsintermediaten aus, den so genannten Konkatemeren (Black, 1988). Phagen mit linear doppelsträngiger DNA müssen bei der Replikation den Verlust von terminalen Sequenzen kompensieren, der durch die Notwendigkeit eines RNA-Primers bei der Replikation und seiner folgenden Degradation entsteht. Aus diesem Grund nutzen sie terminale Redundanzen, um den

Verlust auszugleichen. Diese terminalen Redundanzen können zur Zirkularisierung des Phagen-Genoms oder zur Konkatemerbildung genutzt werden. Beide Replikationsintermediate - zirkuläre DNA mit anschließender *rolling circle*-Replikation und lineare Konkatemere – kommen vor und dienen neben der Verhinderung des DNA-Verlusts an den Enden auch dem Schutz vor Exonukleasen. Der Mechanismus der weiteren Verpackung hängt von den spezifischen DNA-Sequenzen ab. Besitzt die DNA wie beim Phagen Lambda z. B. *cos sites* (Feiss and Widner, 1982), so wird die DNA an bestimmten Stellen geschnitten und es entstehen immer identische Moleküle. Erfolgt nur der erste Schnitt der DNA innerhalb einer bestimmten Sequenz und wird die DNA dann nach dem *headfull*-Mechanismus verpackt, so kann dies zu einer terminalen Redundanz und einer zyklischen Permutation der DNA führen. Beispiele dafür sind die Phagen T4 und P1 (Streisinger *et al.*, 1967; Sternberg, 1990).

Nach dem Zusammenbau der einzelnen Phagenpartikel erfolgt die Expression der Gene der Lysekassette des Phagen. In dieser befinden sich Gene, die für die Lyse des Wirtsbakteriums und damit für die Freisetzung der neu synthetisierten Phagen verantwortlich sind.

Phagen, die obligat zur Lyse ihres Wirtsbakteriums führen, werden als virulent bezeichnet. Eine Ausnahme bilden dabei filamentöse Phagen. Nach Infektion des Wirtes teilt sich dieser weiter, und der Phage kann parallel mit ihm replizieren. Diese Phagen lysieren ihre Wirtszellen nicht, sie werden stattdessen über bestimmte Transportmechanismen mit Hilfe eines Signalpeptids aus dem Wirt in die Außenwelt sekretiert.

2.2.2. Lysogener Zyklus

Während virulente Phagen ihre Wirte nach der Vermehrung obligat lysieren, besteht bei temperenten Phagen die Möglichkeit, entweder den Wirt wie virulente Phagen zu lysieren (lytischer Zyklus) oder sich synchron mit ihrem Wirt zu vermehren und zunächst keine Phagen-Nachkommen zu bilden (lysogener Zyklus). Da es sich bei CMP1 um einen lytischen Phagen handelt und für die Pflanzentests nur virulente Phagen verwendet werden können, soll der lysogene Zyklus im Folgenden nur kurz beschrieben werden.

Meist wird der Eintritt in den lysogenen Zustand durch Integration der Phagen-DNA in das bakterielle Chromosom erreicht. Die Phagen-DNA wird somit mit dem Chromosom repliziert und an die Tochterzellen weitervererbt. In diesem nicht-infektiösen Zustand werden der Phage als Prophage und das Wirtsbakterium als lysogen bezeichnet. Neben der Integration in das Wirtsgenom gibt es aber auch noch das Phänomen der autonomen Replikation als Plasmid (z. B. P1) (Klaus *et al.*, 1992). Lysogene Bakterien haben potentiell noch die Fähigkeit, Phagen zu synthetisieren. Die Produktion eines Repressors verhindert die Expression der Gene für die lytische Vermehrung, wodurch die lysogenen Zellen auch immun gegenüber einer Infektion mit

gleichen Phagen sind. Die Prophagen können aber durch Induktion der SOS-Antwort in Bakterienzellen, z. B. durch DNA-schädigende Agenzien wie Mitomycin C (Otsuji, 1959) oder UV-Strahlung (Lwoff *et al.*, 1950) induziert werden. Das während der SOS-Antwort gebildete RecA Protein führt z. B. beim Phagen Lambda zum Abbau des Repressors, damit zur Exzision der Phagen-DNA aus dem Bakteriengenom und zur Einleitung des lytischen Zyklus.

2.3. Die *Clavibacter*-Phagen CMP1 und CN77

Insgesamt sind nur sehr wenige Phagen für die *Clavibacter*-Subspezies *Cmm*, *Cmn* und *Cmi* bekannt, die bisher auch lediglich partiell charakterisiert wurden (Echandi, 1973; Shirako *et al.*, 1986; Riley and Gooden, 1991; Wakimoto *et al.*, 1969, Vidaver *et al.*, 1981). Alle sind virulent und spezifisch für eine *Clavibacter*-Subspezies. Für diese Arbeit wurde versucht, aus infizierten Pflanzen- und Bodenproben neue Bakteriophagen für die Bekämpfung von *Cmm* zu isolieren. Die Probenbeschaffung in Deutschland war schwierig, da *Clavibacter*-Infektionen hier nicht so häufig auftreten. Daher war man auf Proben aus Israel angewiesen. Nach der Aufarbeitung der Proben konnten zwar einige neue Umweltisolate von *Cmm* isoliert werden, ein Bakteriophage konnte dabei aber nicht gefunden werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit dem Phagen CMP1 für *Cmm* gearbeitet, der bislang nur für die Identifizierung von *Cmm*-Isolaten genutzt wurde. Das Genom des Phagen wurde vollständig sequenziert und der Phage detailliert charakterisiert. Der *Cmn*-Phage CN77 wurde nur zu einigen Vergleichen hinzugezogen und das Genom wurde partiell sequenziert.

Der lytische Phage CMP1 wurde Anfang der 1970er Jahre von Echandi und Sun aus Stängeln überwinternder Tomatenpflanzen isoliert, die mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infiziert waren. Dieser Phage bildet nur Plaques auf seinem Wirtstamm, nicht aber auf weiteren Subspezies wie z. B. *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. Die Plaques haben einen Durchmesser von 0,5 - 1 mm, sind rund und trübe bis klar (Abb. 4, C). Echandi und Sun (Echandi and Sun, 1973) bestimmten eine Latenzzeit von 3 Stunden und eine im Vergleich zu anderen Phagen relativ kleine *burst size* von durchschnittlich 17 neu synthetisierten Partikeln pro infizierte Zelle.

Der Phage CMP1 besitzt ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von ungefähr 68 nm und ein ungefähr 245 nm langes und 9 nm breites, nicht kontraktiles Schwanzteil (Echandi and Sun, 1973; Abb. 4).

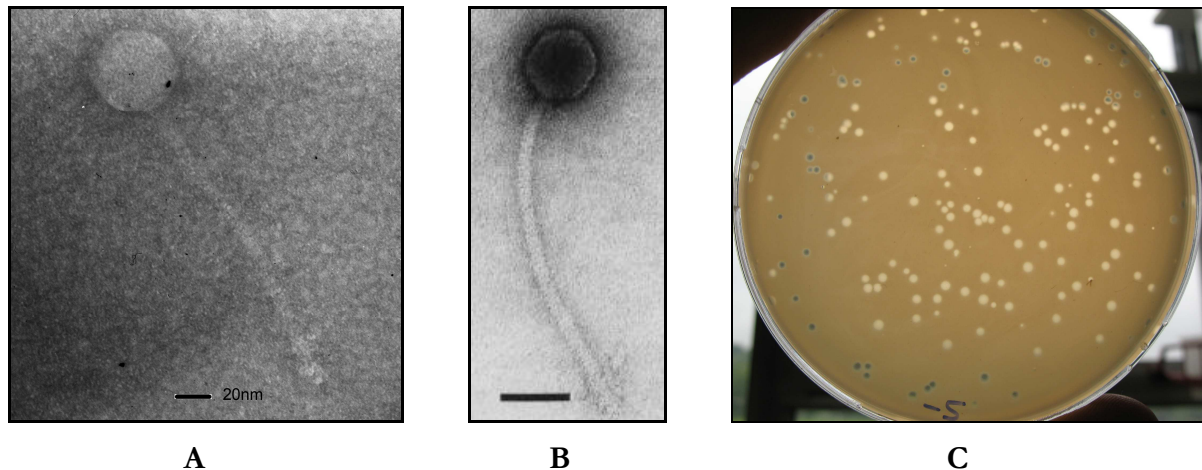


Abb. 4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagen A CMP1 (EM, Wittmann, 2007), B CN77 (EM, Ackermann, Skala = 50 nm), C Plaques CMP1.

Diese Morphologie ist ein charakteristisches Merkmal für die doppelsträngigen DNA-Phagen der Ordnung *Caudovirales*. Innerhalb dieser Ordnung gehört CMP1 zur Familie der *Siphoviridae*. Der *Cmm*-Phage CN77, der für Vergleiche ebenso experimentell untersucht wurde, weist eine ähnliche Morphologie auf.

3. Unterschiedliche Strategien zur Lyse der Wirtszellen

Generell gibt es bei Phagen zwei verschiedene Strategien der Wirtszell-Lyse (Young *et al.*, 2000). Die einfachsten und kleinsten lytischen Phagen, die ein Genom in Form von Einzelstrang-DNA (z. B. Φ X174) oder Einzelstrang-RNA (z. B. MS2) besitzen, exprimieren nur ein Lyse-Gen. Das Genprodukt zeigt aber keine Zellwand-auflösende Aktivität. Nach Sequenz-Analysen konnte festgestellt werden, dass durch dieses Gen auch keine Hydrolase codiert wird. Vielmehr hemmt dieses Lyse-Protein einen spezifischen Schritt in der Synthese des Mureins und verursacht Instabilität der Zellwand, was dann durch den inneren osmotischen Druck zur Lyse des Wirts führt (Bernhardt *et al.*, 2001, 2002).

Phagen mit Doppelstrang-DNA hingegen benötigen zwei verschiedene Lyse-Genprodukte, das Endolysin und das Holin. Das Endolysin hydrolysiert das Peptidoglykan, während das Holin durch Porenbildung für eine steigende Permeabilität der Cytoplasmamembran sorgt und dem Endolysin somit Zugang zum Peptidoglykan verschafft. Zudem spielt es noch eine wichtige Rolle beim genauen zeitlichen Verlauf der Lyse. Bei Phagen mit Gram-negativen Wirten können zudem häufig noch zwei weitere Hilfsproteine - das Rz und Rz1 - zur Wirtszellyse exprimiert werden, deren Funktion noch nicht ganz geklärt ist (Zhang and Young, 1999). Vermutlich

interagieren sie mit den Lipoproteinen, die das Peptidoglykan mit der äußeren Membran vernetzen.

3.1. Die bakterielle Zellwand

Nach der Synthese der Phagen-Nachkommen im Wirtsbakterium müssen diese freigesetzt werden, um weitere Wirtsbakterien infizieren zu können. Die Cytoplasmamembran und die bakterielle Zellwand repräsentieren die natürlichen Barrieren zur Außenwelt, die es mit Hilfe der Phagenproteine der Lysekassette zu überwinden gilt.

Bakterien können in zwei große Gruppen unterteilt werden, die Gram-positiven und die Gram-negativen Bakterien. Diese Einteilung basiert auf der so genannten Gram-Färbung, mittels derer die Bakterien aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellwandstrukturen differenziert werden können. Während die Gram-negative Zellwand sehr komplex ist und aus einer einfachen Peptidoglykanschicht (Labischinski *et al.*, 1991) und einer zusätzlichen äußeren Membran besteht, ist die Gram-positive Zellwand eher einfach aufgebaut und besteht hauptsächlich aus Peptidoglykan. Dieses besteht dafür aus 20-50 Schichten und macht ungefähr 90% der gesamten Zellwand aus. Neben assoziierten Proteinen enthält die Gram-positive Zellwand zudem noch Teichon- und Lipoteichonsäuren. Es kann zwischen Glycerol- und Ribitol-Teichonsäuren unterschieden werden, bei denen entweder Glycerin- oder Ribitol-Moleküle über Phosphatbrücken miteinander verestert sind (Schlegl, 1992). Meist sind an diesen noch Zucker und D-Alanin gebunden. Lipoteichonsäuren sind Glycerol-Teichonsäuren, die kovalent an Glycolipide der Cytoplasmamembran gebunden sind. Teichonsäuren sind für die Bindung zweiwertiger Ionen verantwortlich und dienen Bakteriophagen vermutlich auch als Rezeptoren bei der Adsorption.

Die Zellwand einiger Gram-positiver Bakterien wie z. B. *Mycobacterium* ist außerdem mit weiteren Substanzen wie Mykolsäuren inkrustiert, die der Zellwand nach außen einen hydrophoben Charakter verleihen. Eine weitere Besonderheit in der Zellwand ist eine membranartige Oberflächenschicht oder „S-Layer“ (*surface layer*), die einige Bakterien besitzen. Sie besteht meist aus einer monomolekularen Schicht identischer Proteine oder Glykoproteine und stabilisiert vermutlich die Zelle oder schützt die Bakterien vor Umwelteinflüssen von außen wie niedrige pH-Werte.

3.2. Aufbau des bakteriellen Peptidoglykans

Das Peptidoglykan (oder auch Murein) wird als das Stützskelett der Zellhülle bezeichnet, da es die Stabilität und Formgebung der Zelle gewährleistet; dabei wird es von unterschiedlichen Substanzen zusätzlich umlagert. Die Cytoplasmamembran wäre allein nicht fähig, dem

osmotischen Druck, der durch die Anreicherung gelöster Stoffe im Cytoplasma entsteht, standzuhalten.

Peptidoglykan ist ein Heteropolymer aus Polysacchariden und einer geringen Anzahl spezifischer Aminosäuren. Sein Rückgrat besteht aus langen Kohlenhydrat-Ketten, in denen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure alternierend über eine β -1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Die Muraminsäure ist dabei über ihre Lactylgruppe peptidisch mit 4-5 Aminosäureresten verknüpft. Zu den typischen Aminosäuren des Peptidoglykans zählen L-Alanin, D-Glutaminsäure, *meso*-Diaminopimelinsäure oder L-Lysin und D-Alanin. Die eigentliche Stabilität des Peptidoglykans wird aber erst durch die Quervernetzungen erreicht, für die Diaminosäuren (z. B. Diaminopimelinsäure) mit einer freien Aminogruppe notwendig sind (Abb. 5). Eine Vernetzung der Kohlenhydratketten aus den Disaccharid-Untereinheiten kommt in Gram-negativen Bakterien meist durch eine direkte peptidische Bindung zwischen der Aminogruppe der Diaminopimelinsäure mit der Carboxylgruppe des L-Alanins des jeweiligen anderen Peptidstamms zustande und verhilft dem Peptidoglykan so zu seiner Stabilität.

Das Peptidoglykan der Gram-positiven Bakterien enthält zwischen den quervernetzenden Tetrapeptiden meist noch eine Interpeptid-Brücke (Abb. 5 B), deren Zusammensetzung von Organismus zu Organismus variiert. Bekanntestes Beispiel ist die Glycinbrücke der Staphylokokken (Schneider *et al.*, 2004). In *Clavibacter* wird die Interpeptid-Brücke durch Diaminobuttersäure gebildet (Kandler und Schleifer, 1972).

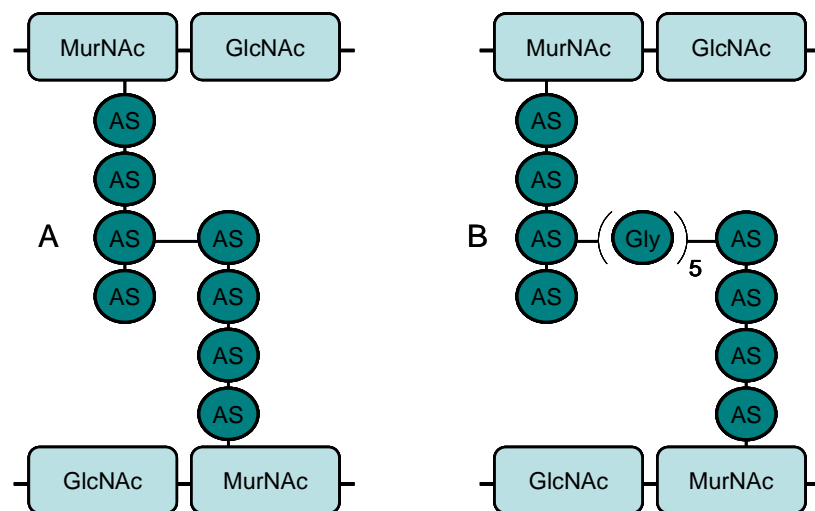


Abb. 5 Schematischer Aufbau einer Murein-Untereinheit bei Gram-negativen (A) und Gram-positiven Bakterien (B); AS= Aminosäure, Gly= Glycin, MurNAC= N-Acetylmuraminsäure, GlcNAC= N-Acetylglucosamin.

Die Länge der Zuckerketten und der Grad der Quervernetzungen variieren mit Bakteriengattung, -Art und Wachstumsbedingungen. Während z. B. bei *Bacillus subtilis* über 500 Disaccharid-Untereinheiten pro Strang vorliegen, sind es bei *Mycococcus xanthus* nur 9 (Vollmer and Seligman,

2010). Aufgrund der charakteristischen Quervernetzungen in ihrem Peptidoglykan werden Bakterien in verschiedene Zellwandtypen eingruppiert (Kandler and Schleifer, 1972). Die genaue Einteilung beruht auf der Zusammensetzung der Peptide, der charakteristischen Aminosäure, die die beiden Peptidstämme in der Quervernetzung verbindet, und den Aminosäureresten, über die die Quervernetzung geschieht.

Eine genaue Beschreibung des Zellwandtyps von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* erfolgt in Abschnitt V 3.7.

3.3. Holine

Holine wurden nach ihrer Fähigkeit benannt, *holes* in der Cytoplasmamembran zu formen (Young, 1992). Sie sind kleine hydrophobe Proteine mit einer stark hydrophoben und geladenen Domäne am C-terminalen Ende, die zwei Funktionen bei der Lyse der Bakterienzellen hat. Holine zeigen keine erkennbare enzymatische Aktivität, erzeugen aber durch Oligomerisation mehrerer Moleküle eine Pore und ermöglichen dem Endolysin auf diesem Weg den Zugang zu seinem Substrat, dem Peptidoglykan der Bakterien. Außerdem kann durch das Holin der zeitliche Ablauf der Zellyse genauer reguliert werden.

Untersuchungen mit lambdoiden Bakteriophagen weisen darauf hin, dass es auch Holine gibt, sogenannte Pinholine, die aufgrund ihrer Struktur für einen Transport des Endolysins zu klein sind, und deshalb für den Export keine Rolle spielen. Ihre Aufgabe besteht eher darin, durch die Bildung von Poren die Membran zu depolarisieren und zu destabilisieren (Park *et al.*, 2007). Die Depolarisation dient anschließend als Signal zur Aktivierung bereits sekretierter Endolysine (Nascimento *et al.*, 2008).

Holine sind eine höchst diverse Gruppe mit mehr als 100 schon bekannten und putativen Holin-Sequenzen aus, die ihrerseits wiederum mehr als 30 orthologe Untergruppen bilden (Wang *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenzen der Holine sind sehr heterogen; es gibt fast keine signifikanten Homologien, außer bei einzelnen Phagen von taxonomisch sehr nah verwandten Bakterien.

3.3.1. Struktur der Holine

Holine können anhand der Anzahl ihrer Transmembran-Domänen in zwei große Gruppen eingeteilt werden (Young, 1992). Holine der Klasse I bestehen aus 90-123 Aminosäuren und besitzen drei α -helicale Transmembran-Domänen. Das Modell-Beispiel für ein Klasse I-Holin ist das λ -Holin S. Klasse II-Holine haben eine Größe von 57-185 Aminosäuren und bilden nur zwei α -helicale Transmembran-Domänen aus, ein Beispiel für diese Holin-Klasse ist das S21 Holin des lambdoiden Phagen 21. Eine Ausnahme bildet hier das Holin des Phagen T4, das nur eine α -helicale Transmembran-Domäne aufweist. Die Carboxy-terminale Domäne aller Holine liegt in

der Regel im Cytosol, die N-terminale bei Klasse I-Holinen im Periplasma und bei Klasse II-Holinen ebenfalls im Cytosol. Die Transmembran-Domänen interagieren sowohl intra- als auch intermolekular und ermöglichen so eine Multimerisierung. Um eine Pore zu bilden, die groß genug ist, um ein ca. 15 kDa großes, komplett gefaltetes Protein wie z. B. ein Lysozym durch die Cytoplasmamembran zu schleusen, müssen sich mindestens sechs Moleküle zu einem Oligomerkomplex zusammenfinden. Experimente weisen darauf hin, dass das Lambda-Holin S Homo-Oligomere bilden kann, aber die genaue Struktur der Pore ist noch nicht bekannt (Wang *et al.*, 2000; Zagotta and Wilson, 1990).

3.4. Endolysine

3.4.1. Allgemein

In der späten Phase des lytischen Zyklus werden Phagen-codierte Enzyme, sogenannte Endolysine, zur Degradierung des bakteriellen Peptidoglykans exprimiert. Durch die Degradierung des Peptidoglykans kann die Zelle nur mit Hilfe der Cytoplasmamembran dem osmotischen Druck nicht mehr standhalten, die Zellen lysieren und es kommt damit zur Freisetzung der neu synthetisierten Phagen.

Die Bezeichnung Endolysin ist als Oberbegriff für verschiedene Mureinhydrolasen zu sehen, die innerhalb des phagenspezifischen Wirtes synthetisiert werden. Sie unterscheiden sich in ihren Angriffspunkten und Wirkmechanismen innerhalb der Peptidoglykan-Struktur. In der Literatur werden verschiedene Hydrolasen als Endolysine bezeichnet, unter ihnen auch solche, die nicht von Phagen codiert werden. So werden auch Autolysine, die bei der Zellteilung eine wichtige Rolle spielen (Turner *et al.*, 2004), das Lysozym des Phagenschwanzes (Arisaka *et al.*, 2003) oder andere Strukturproteine mit enzymatischer Aktivität zur Degradierung des Peptidoglykans bei der Injektion der Phagen-DNA in den Wirt (Moak und Molineux, 2004; Briers *et al.*, 2008) oder auch Mureinhydrolasen, die von konjugativen Plasmiden codiert werden (Bayer *et al.*, 1995), als Endolysine bezeichnet. Im dieser Arbeit wird der Begriff Endolysin aber ausschließlich wie von Jacob und Fuerst (1958) definiert für eine Zellwand-degradierende, Phagen-codierte Hydrolase verwendet. Mit Ausnahme der Transglycosylasen (z. B. Lysozym von λ (Bienkowska-Szewczyk *et al.*, 1981)) gehören alle Endolysine zu den Hydrolasen (Loessner, 2005).

3.4.2. Modularer Aufbau der Endolysine

Strukturell sind die meisten bisher untersuchten Endolysine von Phagen gleicher Wirte sehr ähnlich. Es gibt aber deutliche Unterschiede zwischen den Endolysinen von Phagen mit Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Briers *et al.*, 2009). Phagen von Gram-negativen

Wirten, z. B. T4 und T7, besitzen in der Regel Endolysine, die globulär aufgebaut sind (Matthews und Remington, 1974; Cheng *et al.*, 1994). Endolysine von Phagen Gram-positiver Wirte weisen hingegen meist einen modularen Aufbau aus zwei verschiedenen Domänen auf, die unterschiedliche Funktionen haben (Abb. 6).

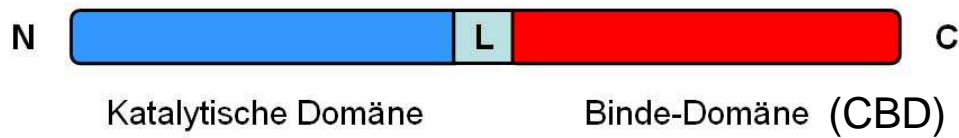


Abb. 6 Modularer Aufbau eines Endolysins (L=Linker; N=Aminoende, C=Carboxy-terminal).

Die N-terminale Domäne vermittelt die enzymatische, katalytische Aktivität, während die C-terminale Domäne (*Cell wall binding domain*, CBD) der Zellwand- und somit der Substrat-Erkennung dient. Verbunden werden die beiden Domänen über eine kurze Linkersequenz (Abb. 6). In den letzten Jahren wurden einige Ausnahmen entdeckt, bei denen das Endolysin eine dreiteilige Struktur besitzt. Neben den beiden schon erwähnten Domänen konnte hier eine zweite enzymatische Domäne im Zentrum des Proteins nachgewiesen werden (Navarre *et al.*, 1999; Pritchard *et al.*, 2004; Donovan *et al.*, 2006).

Die C-terminale Domäne, die an das Murein bindet, kann eine hohe Substratspezifität des Enzyms gewährleisten, da ohne direkte Bindung an das Substrat auch keine Hydrolyse möglich ist. Indem sie z. B. spezifische Peptidoglykan-assoziierte Liganden erkennt und daran bindet, erhöht die CBD die Affinität der enzymatischen Domäne zum Substrat (Fischetti, 2008). Es wird vermutet, dass die CBD der Endolysine von Phagen mit Gram-positiven Wirten eine Kohlenhydrat-bindende Domäne ist und so in ihrer Wirkweise einem Lectin ähnelt (Loessner *et al.*, 2002). Zum ersten Mal konnte der modulare Aufbau eines Endolysins bei Cpl-1, dem Endolysin eines Pneumokokken-Phagen, gezeigt werden (Hermoso *et al.*, 2003). Kristallstrukturanalysen offenbarten, dass dieses Endolysin zu den Cholin-bindenden Proteinen (CBP) gehört. Die Bindung des Endolysins an Cholin beinhaltende Teichonsäuren in der Zellwand der Pneumokokken erfolgt über die CBD. Bisher weiß man aber nur wenig über die molekulare und strukturelle Grundlage der Erkennung spezifischer Zellwandstrukturen durch Endolysine.

Die komplexe Struktur des heteropolymeren Peptidoglykans bietet den Hydrolasen verschiedenste Angriffspunkte; dementsprechend entstanden im Laufe der Evolution viele unterschiedliche enzymatische Domänen und Wirkmechanismen, um das Peptidoglykan zu spalten. Endolysine werden nach ihren Angriffspunkten und Wirkmechanismen auf das Peptidoglykan in zwei Gruppen von Hydrolasen eingeteilt, die grundlegend verschieden wirken (Abb. 7). Während die Glucosaminidasen und Muramidase (z. B. Lysozyme) die glykosidischen

Bindungen der Kohlenhydratketten spalten, hydrolysieren Amidasen und Peptidasen die Säureamid-Bindungen zwischen den Aminosäuren der Peptidbrücke und der Kohlenhydrat-Kette bzw. die die Säureamidbindungen zwischen den verschiedenen Aminosäuren der Peptidbrücke. Die Mehrheit der bisher untersuchten Endolysine gehört zu den Amidasen und Muramidasen.

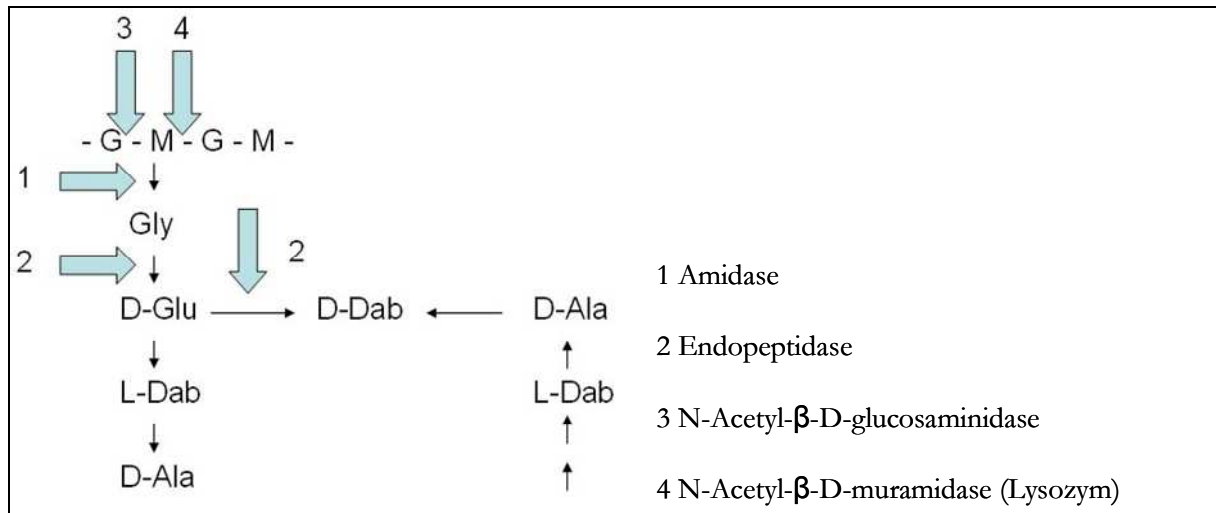


Abb. 7 Schema eines Typ B2γ Peptidoglykans (*Cmm*) und mögliche Angriffspunkte der Mureinhydrolasen. Ala= Alanin, Dab= Diaminobuttersäure, G= N-Acetylglucosamin, Glu= Glutaminsäure, Gly= Glycin, M= N-Acetylmuraminsäure.

Lysozyme (EC 3.2.1.17) sind 1,4-β-N-Acetylmuramidasen, die die glykosidische Bindung zwischen dem C-1 der N-Acetylmuraminsäure und dem C-4 des N-Acetylglucosamins hydrolysieren. Da nahezu alle Bakterien - mit Ausnahme der Archaeobakterien- Peptidoglykan mit Zuckerketten aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure enthalten, sind diese Hydrolasen nicht wirtsspezifisch. Ein Beispiel dafür ist die Muramidase vom *Lactobacillus helveticus*-Phagen φ-0303, die zehn verschiedene Bakterienspezies lysiert (Deutsch *et al.*, 2004).

Die N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase (EC 3.5.1.28) spaltet z. B. innerhalb des Peptidoglykans von *E. coli* die Verbindung zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und der Aminosäure L-Alanin. Viele Amidasen besitzen eine so genannte CHAP-Domäne (*cysteine, histidine-dependent amidohydrolase-s/peptidase*) (Bateman und Rawlings, 2003). Dabei wird das Cystein im katalytischen Zentrum zum nukleophilen Angriff auf die Bindung benötigt.

Die höchste Spezifität besitzen Endopeptidasen, die aufgrund der Vielzahl an möglichen Peptidbindungen im Murein oft nur Mitglieder einer Art lysieren (Loessner, 2005; Wittmann *et al.*, 2010). Für jede Peptidbindung gibt es auch ein hochspezifisches Enzym, das diese Bindung spalten kann. Oft ist die Aktivität des Endolysins auf die Bakterienspezies beschränkt, die der Phage als Wirtsorganismus nutzt (Zimmer *et al.*, 2002; Schuch *et al.*, 2002).

Eine Besonderheit zeigt der Mycobakteriophage Ms6 in seiner Lysekassette. Neben dem Gen für ein Endolysin (LysA) findet man noch ein Gen für ein weiteres Endolysin (LysB), das die

lipolytische Aktivität einer Lipase aufweist (Gil *et al.*, 2008). Diese bis dato unbeschriebene Aktivität eines Proteins bei der Lyse der Zellwand weist auf die besondere Beschaffenheit des Mureins von Mycobakterien hin, das einen hohen Anteil an Lipiden (über 60%) beinhaltet, die bei der Freisetzung der Phagen auch hydrolysiert werden müssen.

Bei Endolysinen von Phagen mit Gram-positiven Wirten wurde gezeigt, dass diese auch von außen wirken können. Durch Zugabe von Endolysin von außen, z. B. durch einen Rohextrakt eines dieses Lyse-Gen exprimierenden Stammes, konnte die Lyse der entsprechenden Gram-positiven Wirte herbeigeführt werden (Loessner *et al.*, 1995, 1997). Da Gram-negative Stämme eine äußere Membran besitzen, ist das Murein für das Endolysin nicht zugänglich und somit die Lyse der Bakterien von außen nicht möglich.

Die meisten bisher untersuchten Endolysine besitzen kein Signalpeptid und sind somit auf eine von Holinen gebildeten Pore in der Cytoplasmamembran angewiesen, um zum Substrat vorzudringen. Insbesondere bei Phagen von Gram-positiven Wirten wurden aber auch Endolysine identifiziert, die unabhängig von Holinen sekretiert werden (Sao-Jose *et al.*, 2000). Dies ist z. B. bei einem *Oenococcus oeni*-Phagen und dem Mycobakteriophage Ms6 der Fall. Bei letzterem codiert das Gen *gp1* in der Lysekassette ein Chaperon-ähnliches Protein, das nach der Expression mit dem Endolysin interagiert (Catalão *et al.*, 2010), wodurch die Translokation des Endolysins über das Sekretionssystem des Bakteriums ermöglicht wird.

Nur bei einem Phagen eines Gram-negativen Wirts konnte auch eine Holin-unabhängige Sekretion beobachtet werden. Das Endolysin des Phagen P1 besitzt eine N-terminale Transmembran-Domäne und bedient sich der *sec*-Funktion des Wirts zur Translokation (Xu *et al.*, 2004). Diese Domäne hat dabei nicht nur die Funktion, das Protein zur Membran zu leiten, sondern es dort auch in membrangebundener Form zu halten und bei Bedarf in enzymatisch aktiver Form ins Periplasma zu entlassen (Kuty *et al.*, 2010). Eine derartige Domäne wird auch als *signal-arrest-release* (SAR)-Sequenz bezeichnet (Briers *et al.*, 2011).

Das Entlassen ins Periplasma kann aber auch durch Holine gesteuert werden, die dabei aber keine Poren für den direkten Transport bilden, sondern die Membran durchlässig machen und das Membranpotential zerstören. Die Aktivierung des Enzyms wird über Cysteine bewerkstelligt, die nach dem Lösen aus der Membran interagieren können und so eine Konformationsänderung der Proteins bewirken (Xu *et al.*, 2005).

Nach der Hydrolyse des Mureins und der Freisetzung der neu synthetisierten Phagen muss gewährleistet werden, dass nicht zu viel Endolysin in die Umgebung freigesetzt wird, um mögliche neue Wirtsbakterien nicht sofort abzutöten. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strategien entwickelt, die dies verhindern sollen. Loessner *et al.* stellten die Hypothese auf, dass das Endolysin über seine C-terminale Bindedomäne mit hoher Affinität an das Peptidoglykan

gebunden wird (2002), wodurch die Diffusion vom Endolysin stark eingeschränkt werden könnte. Zusätzlich oder alternativ könnten auch die geringen Expressionsraten und die kurze Halbwertszeit der Endolysine die vorzeitige Lyse potentieller Wirtsbakterien verhindern.

4. Phagentherapie

4.1. Einsatz von Bakteriophagen

Schon kurz nach der Entdeckung der Bakteriophagen Anfang des 20. Jahrhunderts wurde das Potential ihrer bakteriziden Wirkung für Behandlungen von bakteriellen Infektionen erkannt. Der Entdecker der Phagen, Felix d`Herelle, setzte z. B. bei *Shigella*-Infektionen Bakteriophagen direkt als Therapeutikum ein (1919). Auch bei anderen durch Bakterien hervorgerufenen Krankheiten fanden Phagen schnell Anwendung. So verwendeten Bruynoghe und Maisin 1921 isolierte Phagen zur Behandlung einer durch Staphylokokken hervorgerufenen Hautkrankheit ein.

Mit der Entdeckung der Antibiotika und deren rasantem Aufstieg geriet die Phagentherapie aber fast in Vergessenheit. Phagen wurden in dieser Zeit nur als Modellsystem für genetische Grundlagenforschung oder zur Identifizierung und Typisierung von Bakterienstämmen genutzt. Lediglich in wenigen Ländern Osteuropas, vor allem in Georgien im George Eliava Institut, wurden Bakteriophagen weiterhin isoliert, untersucht und zu Phagen-Therapien eingesetzt (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Heute werden Bakteriophagen wieder verstärkt unter dem Aspekt einer potentiellen therapeutischen Wirkung gegenüber bakteriellen Infektionen betrachtet. In Zeiten immer häufiger auftretender Antibiotika-Resistenzen (Assadullah *et al.*, 2003) bietet die Phagentherapie aufgrund einer Reihe von Vorteilen gegenüber Antibiotika eine Erfolg versprechende Alternative. Zum einen sind sie hochspezifisch für ihr Wirtsbakterium und schädigen somit bei einem Einsatz nicht die gesamte bakterielle Gemeinschaft wie ein Antibiotikum, zudem sind sie selbst replizierend und somit bei Abwesenheit des Wirts auch selbst limitierend (O`Flaherty *et al.*, 2009). Sie unterliegen ebenso wie der Wirt einer ständigen Evolution und sind so auch in der Lage, sich an resistente Bakterien zu adaptieren. Ein weiterer Vorteil ist der ausbleibende Effekt auf eukaryotische Zellen, bei einem Einsatz werden pflanzliche oder tierische Zellen im Gegensatz zu einem Einsatz von Antibiotika nicht geschädigt (Hanlon, 2007). Ein wirtschaftlicher Vorteil ist sicherlich auch die einfache und günstige Produktion und Lagerung der Phagenpräparate. Voraussetzung für den Einsatz von Bakteriophagen ist aber eine genaue Charakterisierung der Phagen. Dabei muss sichergestellt werden, dass diese keine Gene für Toxine besitzen, die nach der Lyse der Bakterien freigesetzt würden, und dass es sich tatsächlich um virulente Phagen handelt. Ein Nachteil könnte die Lyse der pathogenen Wirte sein, da dadurch Toxine freigesetzt

werden können. Das könnte aber z. B. durch den Einsatz Holin-negativer Mutanten vermieden werden.

Mittlerweile gibt es eine Reihe von wissenschaftlichen Untersuchungen und auch bereits Firmen in der Biotechnologie-Branche, die sich mit der Herstellung therapeutischer Phagenpräparate beschäftigen. Dabei kommen diese Präparate in verschiedenen Bereichen zum Einsatz. Im Bereich der Lebensmitteltechnologie gibt es erfolgreiche Versuche einer Biokonservierung mit Hilfe von Phagen, z. B. in der Wurst- und Käseherstellung (Modi *et al.*, 2001) oder zur Reduktion von Salmonellen in der Hähnchenmast und Eierproduktion (Goode *et al.*, 2003; Hagens and Loessner, 2007; Doyle and Erickson, 2006). In diesem Bereich gab es 2006 bereits einen großen Durchbruch, als die FDA (*Food and drug administration*) in den USA die Erlaubnis zum Einsatz eines Präparates gab, das aus einem Phagen-Cocktail aus sechs verschiedenen Phagen bestand und nun zur Kontrolle von *Listeria monocytogenes*-Kontaminationen in Fleisch und Fertiggerichten eingesetzt werden durfte (O'Flaherty *et al.*, 2009). Untersuchungen zeigten, dass der Einsatz virulenter Phagen hier eine effiziente Kontrollmöglichkeit bietet (Guenther *et al.*, 2009). Phagenpräparate finden zudem in der Fischzucht in Aquakulturen Anwendung (Nakai, 2002).

Neben der Lebensmitteltechnologie gibt es vor allem im medizinischen Bereich Untersuchungen zur Behandlung von oberflächlichen Infektionen, z. B. Wundinfektionen durch *Staphylococcus aureus*, mit Bakteriophagen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Phagentherapie bei *Staphylococcus aureus*-Infektionen im Tiermodell Maus erfolgreich sein kann (Capparelli *et al.*, 2007). Der Titer der Pathogene in Modell konnte durch den Einsatz von Bakteriophagen reduziert und die Verbreitung im Körper verhindert werden. Ähnliche Untersuchungen mit Phagen von *Staphylococcus aureus* stehen auch in Georgien im George Eliava Institut im Vordergrund, wo bereits einige Erfolge bei der Behandlung von Wundinfektionen erzielt werden konnten. Durch den Einsatz der Bakteriophagen konnten die Antibiotika-resistenten Bakterien eliminiert werden, so dass es zum vollständigen Wundverschluss kam. Bei der Behandlung von mit enteropathogenen *E. coli*-Stämmen infizierten Kälbern, Ferkeln und Lämmern konnten durch die Verabreichung von Phagen die Pathogene erfolgreich eliminiert werden (Smith and Huggins, 1983; Smith *et al.*, 1987).

Auch beim Pflanzenschutz gewinnt die biologische Bekämpfung von bakteriellen Infektionen immer mehr an Bedeutung. In den letzten Jahren wurden Versuche unternommen, in denen apathogene Stämme des jeweiligen Pathogens (Frey *et al.*, 1994; Liu, 1998), Antagonisten des Pathogens oder saprophytisch lebende Bakterienstämme (Ji *et al.*, 2006) eingesetzt wurden, um den Pathogenbefall der Pflanzen zu verhindern oder zu limitieren. Die Ergebnisse waren sehr unterschiedlich, es konnten zwar positive Ergebnisse in Form einer Reduktion der Titer der

Pathogene nachgewiesen werden, eine komplette Eliminierung wurde aber nicht erreicht. Aus diesem Grund wird auch hier das Augenmerk verstärkt auf Bakteriophagen gelegt.

Inzwischen werden bereits Phagen zur Prophylaxe oder Bekämpfung von bakteriellen Erkrankungen bei Pflanzen eingesetzt, z. B. ein Cocktail aus verschiedenen Bakteriophagen gegen *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Flaherty *et al.*, 2001), dem Erreger der bakteriellen Stängel- und Blattwelke bei Pelargonien. Auch bei weiteren Erkrankungen, die durch andere Mitglieder der Gattung *Xanthomonas* hervorgerufen werden, konnten Phagen bereits erfolgreich eingesetzt werden, z. B. bei der Fleckenkrankheit bei Tomaten (Jones *et al.*, 2006) sowie bei Zitrusfrüchten (Balogh *et al.*, 2008). Weitere Beispiele sind in einem Review von Flaherty *et al.* (2001) aufgeführt. Erste Produkte können bereits für die Agrarwirtschaft kommerziell erworben werden, wie z. B. das Produkt „AgriPhage“ der Firma Omnylytics. Dies beinhaltet einen Phagencocktail zur Bekämpfung von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* oder *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und kann prophylaktisch auf Felder versprüht werden.

4.2. Einsatz von Endolysinen zur Therapie

Nicht nur der Einsatz von Phagenpartikeln wird in Betracht gezogen, auch die Endolysine, die zur Freisetzung der Phagen-Nachkommen aus dem Wirtsbakterium benötigt werden, könnten zur Therapie eingesetzt werden. Im Gegensatz zum Einsatz von kompletten Phagen könnten hier auch Endolysine von temperenten Phagen genutzt werden, die sonst aufgrund der Gefahr einer Lysogenisierung oder lysogenen Konversion (Brüssow *et al.*, 2004) nicht einsetzbar sind. Zudem besteht bei Endolysinen die Möglichkeit einer künstlichen Optimierung. Es gibt bereits Arbeiten zur Synthese von Endolysinen, die genetisch komplett neu konstruiert wurden. Dabei wurden dem Protein katalytische Domänen anderer Lysine hinzugefügt oder Originaldomänen durch andere Domänen ersetzt, um die Spezifität und Aktivität insgesamt zu erhöhen (Sanz *et al.*, 1996; Lopez and Garcia, 2004).

Im Gegensatz zur Behandlung mit Antibiotika wurde bislang bei Endolysinen keine Resistenzentwicklung beobachtet, wahrscheinlich aufgrund der hohen Konservierung des Substrats Peptidoglykan (Borysowski *et al.*, 2006). Untersucht wurden hierzu z. B. Kolonien, die am Rande von durch Endolysin hervorgerufenen Lysehöfen wuchsen (Fischetti *et al.*, 2008), und Bakterienkulturen, die über eine längere Zeitspanne mit niedrigeren Endolysin-Konzentrationen behandelt wurden (Loeffler *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2002). In keinem Fall konnten resistente Bakterien identifiziert werden.

Nachteil bei der Anwendung eines Enzyms wie dem Endolysin ist die fehlende Fähigkeit zur eigenständigen Vermehrung, die einem Phagen natürlich zu Eigen ist. Zudem müssen Stabilität und Dosierung im Einzelfall geprüft werden. Bisher wurden vorwiegend Endolysine von Phagen

mit Gram-positiven Wirten untersucht, da nur Gram-positive Bakterien durch die exogene Zugabe von Endolysinen lysiert werden können (Loessner *et al.*, 1995). Um auch Gram-negative Bakterien auch gleiche Wiese bekämpfen zu können, müssen Substanzen zur Permeabilisierung der äußeren Membran hinzugefügt werden. Entsprechende Versuche zur Lyse von *Pseudomonas aeruginosa* zeigten erste Erfolge (Briers *et al.*, 2011).

Der gleichzeitige Einsatz von mehreren Endolysinen hat offenbar einen synergistischen Effekt, da die Lyse der Bakterien beschleunigt wurde (Djurkovic *et al.*, 2005; Loeffler and Fischetti, 2003).

Untersuchungen im Tiermodell Maus zeigten bereits, dass durch die Behandlung mit Phagenendolysinen eine Reduktion der pathogenen Bakterien, in diesem Fall *Streptococcus*, bzw. eine prophylaktische Wirkung erreicht werden konnte (Nelson *et al.*, 2001). Ebenso wurden Versuche zur Bekämpfung von *Listeria*-Kontaminationen in Starterkulturen bei der Käseherstellung beschrieben, bei denen im Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* das Endolysin eines *Listeria*-Phagen synthetisiert und anschließend sekretiert wird (Gaeng *et al.*, 2000).

Endolysin-Gene werden meist nur schwach exprimiert und die Proteine haben oft nur eine kurze Halbwertszeit, um zu verhindern, dass bei der Lyse der Zellen zu viel Endolysin freigesetzt wird und mögliche Wirtszellen vorzeitig abgetötet werden. Aus diesem Grund stehen für eine potentielle Nutzung von Endolysinen für therapeutische und industrielle Anwendungen besonders Untersuchungen zur Steigerung der Expressionsrate und zur Verbesserung der Proteininstabilität im Vordergrund, z. B. durch ein *module shuffling*.

4.3. Einsatz von transgenen Organismen mit Phagengenen

Aufgrund der bereits genannten schwachen Expressionsrate und geringen Halbwertszeit der Endolysine muss für eine erfolgreiche Anwendung von Endolysinen zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen der stetige Nachschub an Endolysin gewährleistet werden. Zu diesem Zweck ist die Erzeugung eines transgenen Organismus erstrebenswert, der durch die konstitutive Expression eines Endolysins gegen das bakterielle Pathogen geschützt ist.

In Deutschland wurden bereits wissenschaftliche Projekte zur Herstellung transgener Kartoffeln und Apfelbäume (Hanke *et al.*, 2003) durchgeführt, mit dem Ziel ein Phagenenzym in der Pflanze zu exprimieren und so bakterielle Infektionen zu verhindern (de Vries *et al.*, 1999; Salm *et al.*, 2006). Tomatenpflanzen sollten das Lysozym-Gen vom Phagen T4 exprimieren, um resistent gegen *Erwinia carotovora* zu sein (Düring *et al.*, 1993), das gleiche Experiment wurde auch mit Kartoffeln zur Bekämpfung von *Bacillus subtilis*-Infektionen durchgeführt (Ahrenholtz *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass das Lysozym nur schwach exprimiert wurde. Da es sich beim T4-

Lysozym um eine Glycosylase handelt, ist die Beeinflussung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft im Umfeld der Pflanzen ein deutlicher Nachteil.

Neben Phagen-Endolysinen werden dabei auch andere Enzyme wie z. B. EPS-Depolymerasen genutzt (Malnoy *et al.*, 2005), die in den transgenen Organismen exprimiert werden sollen, um z. B. in Apfelbäumen die Infektion mit *Erwinia amylovora* zu verhindern.

Nicht nur in der Agrarwirtschaft wird die Erzeugung transgener Organismen mit Bakteriophagen-Genen in Erwägung gezogen. Auch in der Milchwirtschaft wurden bereits Versuche zur Herstellung transgener Rinder unternommen (Kerr and Wellnitz, 2003; Donovan *et al.*, 2005; Wall *et al.*, 2005). Dabei sollte in den Milchdrüsen der Rinder ein Endolysin-Gen gegen *Staphylococcus aureus* exprimiert werden, dessen Genprodukt anschließend in die Milch sekretiert werden sollte, um die Rinder vor Entzündungen (Mastitis) zu schützen. Die transgenen Rinder waren resistent gegen *Staphylococcus*-Infektionen.

III. Zielsetzung

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ist ein pflanzenpathogenes Bakterium, das Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) befällt und zur Welke der Pflanzen führt. Dadurch gibt es weltweit große Ernteaufschläge und das Bakterium gilt deshalb in vielen Ländern als Quarantänestamm. Während es gegen Schädlinge wie Insekten und Pilze bereits eine ganze Reihe von Gegenmaßnahmen gibt, sind bakterielle Erkrankungen von Nutzpflanzen noch schwer zu bekämpfen. Wichtigste Maßnahmen sind momentan die Überprüfung des Saatgutes und strengste Hygienevorschriften.

Durch das Problem zunehmender Antibiotika-Resistenzen und der Suche nach Alternativen, wird eine Phagentherapie heute in steigendem Maß in Betracht gezogen. Im Pflanzenschutz sind noch wenige Beispiele zum Einsatz von Phagen beschrieben. In den USA ist aber bereits ein Phagencocktail zur Bekämpfung von *Xanthomonas*-Infektionen zugelassen.

Diese Dissertation soll sich mit den Möglichkeiten des biologischen Pflanzenschutzes durch den Einsatz von Phagen und Phagenproteinen und der Herstellung transgener Pflanzen, die ein spezifisches Phagenendolysin zur Abwehr von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* produzieren, beschäftigen. Als Untersuchungsobjekt soll der Phage CMP1 dienen.

Dabei sollen Phagenlysate von CMP1 im Pflanzentest auf ihre Wirksamkeit gegen *Clavibacter*-Neuinfektionen, wie sie z. B. bei Verletzungen bei Stecklingsvermehrung oder Ausgeizen der Pflanzen vorkommen, überprüft werden. Damit ein Einsatz als Pflanzenschutzmittel denkbar ist, muss das Genom des Phagen CMP1 sequenziert und weiter mit bioinformatischen Mitteln untersucht werden, um auszuschließen, dass der Phage temperent ist und Toxingene im Phagen genom auftreten. Außerdem können so andere mögliche Phagenproteine wie z. B. Endolysine identifiziert werden, die ebenfalls für die Eliminierung pathogener Bakterien eingesetzt werden könnten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Identifizierung und biochemische Charakterisierung eines Endolysins. Dabei soll untersucht werden, um welche Art einer Mureinhydrolase es sich handelt und wie spezifisch diese auf verschiedene Bakterienarten und -gattungen wirkt. Hier sind vor allem die Enzyme interessant, die nicht unspezifisch auf alle Bakterien wirken, sondern vor allem diejenigen mit einer Peptidase-Aktivität, die eine hohe Spezifität für die *Clavibacter*-Zellwand haben könnten.

Da sich *Clavibacter michiganensis* im Xylem der Pflanze vermehrt, kann die Behandlung mit Phagen nur zur Prophylaxe gegen Infektionen bei Verletzungen der Pflanze, z. B. bei Pflegemaßnahmen dienen. Oberflächliches Besprühen mit Phagenlysaten wäre zur Therapie bereits infizierter Pflanzen eher ungeeignet. Deshalb ist das Fernziel dieser Arbeit, eine transgene Tomatenpflanze zu konstruieren, die ein spezifisches Endolysin eines Phagen produzieren und ins Xylem

sekretieren soll, das zur Lyse von *Clavibacter michiganensis* führt. Der Vorteil gegenüber der schon bekannten Lysozymkartoffel wäre die Spezifität für das pathogene Bakterium, d. h. die übrige Bakterienflora bliebe unbeeinflusst.

IV. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 und Tabelle 7, die eingesetzten Vektoren und selbst konstruierten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

1. Material

1.1. Bakterienstämme

Name	Genetische Marken	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	bei α -Komplementation o.ä. <i>F- 80 dlac Z ΔM15Δ</i> (<i>lac Z YA -arg F</i>) U169 <i>recA1 end A1 hsd R hsd M</i> <i>sup E44 λ- rel1 thi -1 gyr A</i> <i>rel A1</i>	Walter Arnold
<i>E. coli</i> SE1	F ⁻ , Cm ^R , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , DE3 (<i>lacI</i> , T7 Polymerase unter Kontrolle des <i>lacUV5</i> Promotors), <i>ccdB</i> ⁺	Cherry TM Codon Kit von Eurogentec
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , Tet ^R , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , DE3, <i>endA</i> , The [<i>argU proL Cam</i> ^R] [<i>argU</i> <i>ileY leuW Strep/Spec</i> ^R]	Stratagene
<i>E. coli</i> Arctic Express	F ⁻ , Tet ^R , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>endA</i> , The [<i>cpn10</i> <i>cpn60 Gent</i> ^R]	Stratagene
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		NCPPB3123
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		NCPPB382
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>		NCPPB7173
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>		LMG7295
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90 Helferplasmid	Koncz und Schell, 1986
<i>Leifsonia aquaticus</i>		DSM20146
<i>Bacillus subtilis</i>		Stammsammlung Dreiseikelmann
<i>Arthrobacter</i> O270		Stammsammlung B. Dreiseikelmann
<i>Micrococcus luteus</i>		Stammsammlung B. Dreiseikelmann

Tab. 2 Eingesetzte Bakterienstämme

1.2. Plasmide und Vektoren

Plasmid	Nähere Beschreibung	Referenz
pSCodon1.2	T7 Promotor, <i>ccdA</i> , Amp ^R , His-tag, Gene für <i>ileX</i> , <i>proL</i> , <i>lenW</i> , <i>ghyT</i> , <i>argU</i>	Cherry TM Codon Kit von Eurogentec
pSCherry	T7 Promotor, <i>ccdA</i> , Amp ^R , His-tag, Cherry-tag, Gene für <i>ileX</i> , <i>proL</i> , <i>lenW</i> , <i>ghyT</i> , <i>argU</i>	Cherry TM Codon Kit von Eurogentec
pUC13	Amp ^R , MCS, <i>lac</i> -Promotor	Sammlung Dreiseikelmann
pK18mob2	MCS, <i>lac</i> -Promotor, Kan ^R	Sammlung Dreiseikelmann
pBin19	Kan ^R , NOS (Nopalinsynthase)-Promotor, <i>npt</i> , NOS (Nopalinsynthase)-Terminator, MCS, <i>lacZ</i>	Prof. Dr. Staiger, Lehrstuhl für Molekulare Zellphysiologie, Universität Bielefeld
p35S-EGFP		Clontech
pSCodonLysCMP1		diese Arbeit
pSCodonLysCN77		diese Arbeit
pSCodonExo		diese Arbeit
pSCodonEndo		diese Arbeit
pSCodonSsb		diese Arbeit
pSCodoEndoHNHc		diese Arbeit
pSCodonThy		diese Arbeit
pSCodonHol		diese Arbeit
pSCodonHel		diese Arbeit
pSCodonHyd		diese Arbeit
pSCodonErf		diese Arbeit
pSCodonUgpQ		diese Arbeit
pSCodonBCMP1		diese Arbeit
pSCodonKCMP1		diese Arbeit
pSCodonBCN77		diese Arbeit
pSCodonKCMP1-BCN77		diese Arbeit
pSCodonKCN77-BCMP1		diese Arbeit
pSCodonGFP-BCMP1		diese Arbeit
pSCodonGFP-BCN77		diese Arbeit

Tab. 3 Verwendete Plasmide und Vektoren

1.3. Nährmedien

1.3.1. TBY- Vollmedium

- 10 g Trypton
- 5 g Hefe- Extrakt
- 5 g NaCl
- ad 1 l H₂O deionisiert
- pH mit NaOH auf 7,5 einstellen
- autoklavieren

1.3.2. TBY- Agar

- 1 l TBY- Vollmedium
- 15 g Agar
- autoklavieren

1.3.3. TBY-Weichagar

- 1 l TBY-Vollmedium
- 5 g Agar
- autoklavieren

1.3.4. M9 Minimalmedium

- 6 g Na₂HPO₄
- 3 g KH₂PO₄
- 0,5 g NaCl
- 1 g NH₄Cl
- mit KH₂PO₄ auf pH 6,5 einstellen

nach Autoklavieren Zugabe folgender Komponenten

- 20 ml 20 % Glucose
- 2 ml 1 M MgSO₄
- 100 µl 0,1 M CaCl₂
- 2,5 µl 200 mg/ml Thiamin
- 50 µl 10 mg/ml Nicotinsäure

- 100 µl Spurenelementelösung
- 1 ml 30 mM Methionin

1.3.5. Spurenelemente-Lösung (100ml)

- 0,2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{M}_6\text{O}_{24} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
- 40 mg $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

1.3.6. Selektivmedien

<u>Antibiotika</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
Ampicillin	150 µg / ml
Chloramphenicol	30 µg / ml
Gentamycin	10 µg / ml
Kanamycin	30 µg / ml
	50 µg / ml

1.3.7. X-Gal-Platten

Auf TBY-Platten werden ausgespatelt:

- 10 µl 100 mM IPTG
- 50 µl 2% X-Gal in DMF (w/v)

1.4. Längenstandards

Lambda-EH DNA Marker (1)

Als Größenstandard für die DNA-Fragmente diente DNA des Phagen Lambda, die mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII hydrolysiert wurde. Für Southern-Hybridisierungen wurde ein Digoxigenin-markierter Lambda-Marker (EcoRI/HindIII) der Firma Roche verwendet.

See Blue Pre-Stained Standard Proteinmarker (2)

2. Methoden

2.1. Plasmid-Isolierung

2.1.1. Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly (1979, modifiziert)

Die Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly beinhaltet eine alkalische Lyse. Anschließend wird die isolierte DNA auf einem CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten gereinigt. Nach der Ultrazentrifugation und der damit verbundenen Abtrennung von Verunreinigungen kann die Plasmid-DNA leicht isoliert werden, da die superhelikale Form der Plasmide eine deutlich erkennbare Bande im CsCl-Gradienten bildet. Die Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale DNA erhöht dabei die Dichte des Moleküls. Somit kann man die superhelikale Plasmid-DNA gut von chromosomalen Bruchstücken und „*open circle*“ DNA unterscheiden.

Material

MixI:

- 50 mM Glucose
- 10 mM EDTA
- 25 mM Tris-HCl, pH7,5
- 2 mg/ml Lysozym (frisch zusetzen)

MixII:

- 0,2 N NaOH
- 1 % SDS
- frisch mixen

CsCl gesättigtes Isopropanol

- 37 g CsCl gelöst in 41 ml TE-Puffer
- 100 ml Isopropanol

TE-Puffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- 40 ml Übernachtkultur
- 10 min 6500 rpm zentrifugieren, A8.24 Rotor, 4°C
- Überstand verwerfen, Zellen resuspendieren in 8 ml MixI
- 30 min auf Eis
- add. 16 ml MixII, vorsichtig mischen
- 10 min Raumtemperatur
- add. 12 ml 3 M Na-Acetat, pH 4,8
- vorsichtig mischen, 30 min auf Eis
- 20 min 20000 rpm zentrifugieren
- Überstand gleichmäßig auf 2 Zentrifugenröhrchen verteilen
- add. 18 ml Isopropanol/ Röhrchen
- 45 min -20°C (20-30 min -80°C)
- 20 min 20000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Röhrchen umgekehrt gut abtropfen lassen
- beide Pellets in insgesamt 4 ml TE Puffer lösen

CsCl-EthBr-Dichtegradientenzentrifugation

- 4,1 g CsCl in Corexgläser einwiegen
- add. 4 ml DNA-Lösung
- add. 300 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml)
- 30 min 20000 rpm zentrifugieren
- Überstand in Quicksealröhrchen füllen
- über Nacht und bei 15°C mit 50000 rpm in Rotor Vti65 zentrifugieren
- untere Bande im UV Licht abziehen
- Extraktion 3 x mit CsCl-gesättigtem Isopropanol
- Dialyse über Nacht gegen TE Puffer

2.1.2. Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Spin Prep Kit

Diese Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.3. Plasmid-Isolierung mittels Qiagen Plasmid Midi Kit

Diese Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.4. Präparation von „cleared lysate“ DNA zur qualitativen Analyse von Plasmiden

Diese Methode ist geeignet zur Isolierung Alkali-sensitiver Plasmide wie RSF1010 und seine Derivate.

Durchführung:

- 5 ml ÜK in Greiner Rörchen füllen
- 10 min 8000 rpm 5°C zentrifugieren
- Zellen suspendieren in 100 µl 20% Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH8
- in Eppendorfgesäß überführen
- add. 10 µl Lysozym (5 mg/ml)
- add. 10 µl 10 mM CDTA
- 15 min auf Eis inkubieren
- add. 100 µl Triton Lösung (50 mM Tris-HCl, pH8, 10 mM CDTA, 1% Triton-X-100)
- 30 min 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgesäß
- add. 100 µl H₂O und 100 µl Kirby Mix, mischen
- 3 min 13000 rpm zentrifugieren
- wässrige Phase in neues Gefäß
- add. 50 µl 1 M NaCl, 50 µl Kirby Mix, mischen
- 3 min 13000 rpm zentrifugieren
- wässrige Phase in neuem Gefäß mit 1 ml EtOH mischen
- 15 min 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- add. 0,5 ml 80% EtOH
- 10 min 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- im Heizblock trocknen
- DNA lösen in 30 µl TE Puffer

2.1.5. Plasmidisolierung nach Ramos-Gonzales (Ramos-Gonzalez *et al.*, 1991)

Diese Plasmidisolierung ist eine zuverlässige Methode zur qualitativen Analyse großer Plasmide bis zu einer Größe von 150 kb aus verschiedensten Gram-positiven wie auch Gram-negativen Stämmen. Die DNA kann aber aufgrund der Methode nicht gespalten werden und somit nicht zu weiteren Analyse eingesetzt werden.

Material

Lösung A:

- 20% Saccharose
- 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 25 mM EDTA
- 5 mg/ml Lysozym

Lösung B:

- 0,3 N NaOH
- 2% SDS

Kirby Mix:

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol
- 0,1 g Hydroxychinolin
- gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

Durchführung:

- 0,5 – 1 ml ÜnK
- Zentrifugation 3 min 13000 rpm in Biofuge
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen resuspendieren in 200 µl Lsg. A
- 100 µl Lsg. B zugeben, sofort vorsichtig mischen
- 3 min 55°C
- 300 µl Kirby Mix, vorsichtig mischen
- 30-45 min 13000 rpm zentrifugieren

- wässrige Phase abnehmen, bei Bedarf erneut 10 min zentrifugieren
- 40 µl für Gel

2.1.6. Qiagen-Klonanalyse (alkalische Lyse)

Diese Methode dient der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA als Nachweis bzw. Kontrolle vorangegangener Klonexperimente.

Das Protokoll ist für Versuche mit *E. coli* ausgerichtet und daher lässt sich diese Methode nicht oder nur bedingt auf alle Arten von Bakterien anwenden.

Material

P1:

- 50 mM Tris-HCl, pH 8
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A (frisch hinzugeben)

P2:

- 200 mM NaOH
- 1 % SDS

P3:

- 0,1 M K-Acetat, pH 5,5

TE-Puffer:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- 1,5 ml üN Kultur in Eppendorfgefäß pipettieren
- bei 13 000 rpm in Biofuge zentrifugieren
- Überstand quantitativ verwerfen
- Zellen in 0,3 ml Puffer P1 suspendieren (vortexen)
- 0,3 ml Lösung P2 zugeben und 6 mal vorsichtig invertieren
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 0,3 ml vorgekühlte Lösung P3 zugeben

- sofort 6 mal invertieren
- 5 min auf Eis stellen
- Zentrifugation 10 min 13 000 rpm in Biofuge
- 0,75 ml des wässrigen Überstandes in neue Eppendorfgefäße überführen
- 0,75 ml Isopropanol zugeben und durch Vortexen mischen
- Zentrifugation 20 min 13 000 rpm in Biofuge
- Überstand abgießen
- 0,5 ml 70 % Ethanol zugeben, mischen
- Zentrifugation 5 min 13 000 rpm in Biofuge
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet im Heizblock bei 70°C trocknen
- DNA in 30-100 µl (abhängig von Kopiezahl des Plasmids) TE-Puffer lösen

2.2. Isolierung von Gesamt-DNA (Hopwood, 1985)

Bei der Hopwood-Methode werden die Zellen zunächst durch Lysozym und EDTA aufgebrochen und die DNA anschließend durch eine Phenol-Behandlung von Proteinen gereinigt, wobei die Proteine in der organischen Phase und die DNA in der wässrigen Phase zurückbleiben. Für weitere Reaktionen muss das Phenol aber durch Dialyse entfernt werden.

Material

AKI:

- 6,7% Saccharose
- 1 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl, pH 8
- Lysozym (10 mg/ml)

SDS Lösung:

- 2 % SDS

Kirby Mix:

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol

- 0,1 g Hydroxychinolin
- gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

TE Puffer:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1 mM EDTA

Durchführung:

- 1,5 ml Übernachtskultur in Eppendorfgläser überführen
- 5 min bei 13 000 rpm zentrifugieren (Biofuge)
- Überstand quantitativ entfernen
- Zellen suspendieren in 250 µl AKI
- 1 h 37°C inkubieren
- add. 125 µl 2% SDS
- sofort intensiv vortexen (evtl. 37°C, bis Lyse vollständig)
- add. 250 µl Kirby Mix
- intensiv vortexen
- zentrifugieren: Biofuge 13 000 rpm, 5 min
- Oberphase in neues Eppendorfglas überführen
- add. 250 µl Kirby Mix
- vortexen und zentrifugieren
- Oberphase mindestens 2x6 h gegen TE Puffer dialysieren

2.3. PCR-Amplifikation (K. B. Mullis, 1987)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine *in vitro* Methode, die der Amplifikation kleinster Mengen spezifischer DNA dient.

Thermoresistente DNA-Polymerasen (Tag-Polymerasen) duplizieren dabei einen durch zwei Oligonucleotidprimer definierten DNA-Abschnitt. Durch das Denaturieren der template-DNA entstehen zwei einzelsträngige DNA-Matrizen, an die sich die Oligonucleotidprimer anlagern können. Die DNA-Polymerase synthetisiert dann durch das Anlagern von dNTP's an die 3'-OH-Primer-Enden einen neuen komplementären Strang.

Durch das häufige Durchlaufen dieser Reaktionsschritte findet eine exponentielle Vermehrung des definierten DNA-Abschnittes statt.

Material

10 x Reaktionspuffer:

- 20 mM Tris-HCl, pH 8,55
- 16 mM (NH₄)SO₄

dNTP Mix:

- je 2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP

Primersequenzen:

Gen	Primer	Primer Sequenz	Annealing-Temperatur
<i>bhb</i>	forward	CGCATATGCAGCAATTTGCACC	70°C
	reverse	CCCTCGAGTGCGCGGTTCGTTTC	72°C
<i>ssb</i>	forward	CGCATATGAACGGTATTAGCTAC	66°C
	reverse	CCCTCGAGGAAGCCGCTCGC	70°C
<i>erf</i>	forward	CGCATATGCCTGAGTACGGACAG	72°C
	reverse	CCCTCGAGGTGCGTAGGCTCCG	72°C
<i>exo</i>	forward	CGCATATGCCAAGAGTAGATAAG	66°C
	reverse	CCCTCGAGGGCATTCGTGCTCTC	72°C
<i>bel</i>	forward	CGCATATGGGCAAAGCAGGAGAC	72°C
	reverse	CCCTCGAGGTAGCCATGTATGCA	70°C
<i>hol</i>	forward	CGCATATGGTTACGTTTGAGCCG	70°C
	reverse	CCCTCGAGCGCGCGGTGCTCAG	72°C
<i>lysCMP1</i>	forward	CGCATATGTCCGAGAATCTTAAC	66°C
	reverse	CCCTCGAGTTTCTTATCGGGGG	66°C
<i>ugpQ</i>	forward	CGCATATGTCGCGGTCTTTAC	72°C
	reverse	CCCTCGAGGTACTTGGTAGAAACG	70°C
<i>lysCN77</i>	forward	CCCATATGGGCTACTGGGGGT	68°C
	reverse	CCCTCGAGTGCGGCAGCCCGG	70°C
<i>end</i>	forward	CGCATATGGCTACTGACACTGAG	70°C
	reverse	CCCTCGAGTCTACTCTTGGCATGT	72°C
<i>hyd</i>	forward	CCCATATGGCATGGGAATTCCC	70°C
	reverse	CCCTCGAGCGGGAATTCCCA	72°C

Durchführung:**Reaktionsansatz für Taq-Polymerase:**

H ₂ O	146,5 µl
10x Puffer ohne MgCl ₂	22,5 µl
dNTP Mix (2 mM jedes)	8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	27 µl
Primer 1	4,5 µl
Primer 2	4,5 µl
template (Gesamt-DNA, Phagen DNA, ÜNK, Phagenlysat)	9 µl
Taq Polymerase	3 µl
Summe	225 µl

Reaktionsansatz für Pwo-Polymerase (Peqlab):

H ₂ O	173,5 µl
10x Puffer ohne MgCl ₂	22,5 µl
dNTP Mix (2 mM jedes)	8 µl
Primer 1	4,5 µl
Primer 2	4,5 µl
template (Gesamt-DNA, Phagen DNA, ÜNK, Phagenlysat)	9 µl
Taq Polymerase	3 µl
Summe	225 µl

- je 25 µl auf 8-er stripe verteilen
- mit ca. 25 µl Mineralöl überschichten und sorgfältig schließen

Einstellung des Thermocyclers:

Window	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4	Zyklen	Schritt
1	5 min 94°C	0 min	0 min	0 min 6°C	1	Denaturieren
2	1.5 min 94°C	1,5 min 44-66°C	1.5 min 72°C	0 min	30	Denaturierung/Primer Annealing/Polymerisation
3	0 min 94°C	0 min	5 min 72°C	0 min	1	Polymerisation
4	0 min 94°C	0 min	0 min	0 min		

2.4. High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

PCR-Produkte müssen für weitere Reaktionen gereinigt werden. Bei dieser Methode wird das Amplifikat an Glasfasern in Gegenwart chaotropher Salze im Reaktionsgefäß gebunden. Eventuelle Verunreinigungen wie nicht eingebaute Nukleotide, Primer, Polymerasen, Mineralöl oder Salze werden durch die Glasfasermembran nicht gebunden und somit durch verschiedene Waschschrte entfernt.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.5. Agarose-Gel-Elektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus den beiden Untereinheiten D-galactose und 3,6-anhydro L-galactose des Disaccharids Agarobiose besteht. Dies bildet lange Ketten aus ca. 200 Agarobiose-Einheiten, die durch Erhitzen in eine Gitterstruktur überführt werden. Je höher die Agarose-Konzentration ist, desto feinporiger ist die Gitterstruktur des Gels und desto langsamer können die DNA-Fragmente wandern.

Aufgrund der Phosphat-Gruppen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind DNA-Fragmente negativ geladen, so dass durch Anlegen einer Spannung eine Wanderung im Gel hervorgerufen werden kann.

Durch die Agarose-Gel-Elektrophorese können lineare DNA-Fragmente, superhelikale Plasmid-DNA und RNA-Proben ihrer Größe entsprechend voneinander aufgetrennt und anschließend identifiziert werden. Die Trennung und Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente werden dabei durch ihre Größe und Konformation (linear, zirkulär mit Einzelstrangbruch oder superhelikal) beeinflusst.

Material

LB Loading Buffer (Protrans) oder Bromphenolblau (BPB)-Ladepuffer

- 40 % Glycerin
- 125 mM EDTA, pH 8.0
- Spatelspitze Bromphenolblau

TA-Puffer

- 40 mM Tris-Acetat, pH7.5
- 10 mM Na-Acetat
- 1 mM EDTA
- mit CH₃COOH auf pH 7.8 einstellen

Durchführung:

- 0,8 – 2,0 g Agarose nach Bedarf abwiegen
- add. 100 ml 1x TA-Puffer
- kurz aufkochen
- Kamm in den Gelträger setzen und die flüssige Agarose eingießen
- Gel fest werden lassen
- Elektrophoresekammer mit 1x TA-Puffer befüllen
- nach Erstarren des Gels den Gelträger in die Elektrophoresekammer setzen und den Kamm ziehen
- Proben mit BPB-Ladepuffer versetzen
- Geltaschen mit den Proben beladen
- Gel bei einer Spannung von 40 V - 90 V laufen lassen
- anschließend das Gel für 10 Minuten in einer verdünnten Ethidiumbromid-Lösung färben
- das Gel unter fließendem Wasser abspülen und im UV-Durchlicht fotografieren

2.6. Fragmentisolierung mittels QIAquick Gel-Extraktion-Kit (Qiagen)

Mittels des QIAquick Gel-Extraktion-Kits können DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert werden.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.7. Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen zu erkennen, daran zu binden und die Doppelstränge dann hydrolytisch zu spalten. Sie unterscheiden sich in Erkennungssequenz, Spaltstelle und Ursprungsorganismus. Für die Spaltungsreaktion benötigen sie unterschiedliche Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke), um eine optimale Aktivität gewährleisten zu können. Einige Enzyme benötigen für eine optimale Aktivität darüber hinaus BSA oder gar spezielle Puffer.

Restriktionsendonukleasen (bezogen von New England Biolabs)

Name	NEB-Puffer	Temperatur	Inaktivierung	Zusatz
<i>BamHI</i>	<i>BamHI</i> -Puffer	37°C	20 min 65°C	BSA
<i>BsaI</i>	NEB-Puffer 3	50°C	20 min 65°C	--
<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i> -Puffer	37°C	20 min 65°C	--
<i>HindIII</i>	NEB-Puffer 2	37°C	20 min 65°C	--
<i>KpnI</i>	NEB-Puffer 1	37°C	20 min 65°C	--
<i>MfeI</i>	NEB-Puffer 4	37°C	20 min 65°C	BSA
<i>NdeI</i>	NEB-Puffer 4	37°C	20 min 65°C	--
<i>PstI</i>	NEB-Puffer 2	37°C	20 min 80°C	BSA
<i>SacI</i>	NEB-Puffer 1	37°C	20 min 65°C	BSA
<i>SmaI</i>	NEB-Puffer 4	25°C	20 min 65°C	--
<i>XhoI</i>	NEB-Puffer 2	37°C	20 min 65°C	BSA

Die verwendeten Puffer wurden als 10x konzentrierte Lösungen von der Firma New England Biolabs bezogen.

NEB-Puffer 1

- 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7.0
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

NEB-Puffer 2

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.9
- 10 mM MgCl₂
- 50 mM NaCl

- 1 mM DTT

NEB-Puffer 3

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.9
- 10 mM MgCl₂
- 100 mM NaCl
- 1 mM DTT

NEB-Puffer 4

- 20 mM Tris-Acetat, pH 7.9
- 10 mM Mg-Acetat
- 50 mM K-Acetat
- 1 mM DTT

Durchführung:

- x µl DNA (entsprechend ca. 0.2 µg DNA)
- add. 2 µl 10 x NEB-Puffer
- add. 1 µl Restriktionsendonuklease
- add. 2 µl BSA (10x) wenn angegeben
- add. 15/17 µl H₂O Millipore
- Inkubationszeit im Temperaturoptimum nach Herstellerangaben
- gegebenenfalls Inaktivierung nach Herstellerangaben

2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

T4 DNA Ligase Puffer (New England Biolabs)

- 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 1 mM ATP
- 25 µg/ml BSA

Durchführung:

- X µl Fragment-DNA

- add. $Y \mu\text{l}$ Vektor-DNA (Verhältnis Vektor/Fragment mind. 1:2)
- add. $2 \mu\text{l}$ 10x T4 DNA Ligase Puffer
- add. $1-2 \mu\text{l}$ T4 DNA Ligase
- mit H_2O Millipore auf $20 \mu\text{l}$ auffüllen
- Inkubation bei 4°C oder 16°C ÜN

2.9. Transformation (nach Mandel und Higa, 1970, modifiziert)

Natürlich kompetente Bakterien können freie DNA aus der Umgebung aufnehmen. *E.coli* gehört nicht zu den natürlich-kompetenten Stämmen, kann aber auch durch eine CaCl_2 -Behandlung in der Kälte kompetent gemacht werden.

2.9.1. Herstellung kompetenter Zellen

Durchführung:

- 10 ml TBY mit $0,2 \text{ ml}$ üNK animpfen
- Bakterien bei optimaler Wachstumtemperatur bis zu einem Titer von $2 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ anwachsen lassen (log-Phase)
- 5 ml in ein Corex-Röhrchen überführen und 5 min bei $6\ 500 \text{ rpm}$ und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in 5 ml vorgekühltem 100 mM CaCl_2 resuspendieren
- 30 min bei 0°C auf Eis stehen lassen
- 5 min bei $6\ 500 \text{ rpm}$ und 5°C zentrifugieren
- Zellen in 1 ml 100 mM CaCl_2 resuspendieren und zur direkten Transformation benutzen oder in 100 mM CaCl_2 mit 20% Glycerin resuspendieren und bei -80°C einfrieren

2.9.2. Transformation

Durchführung:

- zu $200 \mu\text{l}$ kompetenten Zellen add. Ligationsansatz oder circa $0,5 \mu\text{g}$ DNA
- 20 min bei 0°C inkubieren (Anlagerung der freien DNA an Zelle)
- 3 min bei 42°C inkubieren (Hitzeschock)
- add. 1 ml TBY
- 45 min bei 37°C inkubieren (Expression der Antibiotikaresistenzen)

- ausplattieren auf antibiotikahaltigem Selektivmedium
- Inkubation über Nacht bei optimaler Wachstumstemperatur

2.9.3. Herstellung kompetenter *Agrobacterium*- Zellen

Durchführung:

- 5 ml LB-Medium mit Rifampicin und Gentamycin mit Einzelkolonie animpfen
- Bakterien bei optimaler Wuchstemperatur (28°C) 2 Tage anwachsen lassen
- 50 ml LB mit Rifampicin und Gentamycin mit 2 ml Übernachtskultur animpfen und bis zu einer $OD_{600}=0,5-1$ wachsen lassen
- 5 min bei 6 500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in 1 ml vorgekühltem 20 mM $CaCl_2$ resuspendieren
- 100 μ l Aliquots in N_2 einfrieren
- zur direkten Transformation benutzen oder in 100 mM $CaCl_2$ mit 20% Glycerin resuspendieren und bei -80°C einfrieren

2.9.4. Transformation von *Agrobacterium*-Zellen

Durchführung:

- zu 100 μ l kompetenten Zellen add. Ligationsansatz oder circa 0,5 μ g DNA
- 20 min bei 0°C inkubieren (Anlagerung der freien DNA an Zelle)
- 5 min bei 37°C inkubieren (Hitzeschock)
- add. 1 ml LB-Medium
- 4h bei 28°C inkubieren (Expression der Antibiotikaresistenzen)
- ausplattieren auf antibiotikahaltigem Selektivmedium
- Inkubation über Nacht bei optimaler Wachstumstemperatur

2.10. Elektroporation

Nur *E.coli* und nahe verwandte *Enterobacteriaceae* können durch eine $CaCl_2$ -Behandlung kompetent gemacht werden. Deswegen wird häufig eine alternative Methode - die Elektroporation - angewandt. Dabei sorgt ein kurzer elektrischer Impuls dafür, dass die Zellmembran permeabel für die freie DNA wird, indem kleine Löcher in der Membran entstehen, die sich aber in kürzester Zeit wieder schließen.

Durch die Elektroporation ist es möglich, Bakterienzellen mit Vektoren und Plasmiden unterschiedlichster Art zu transformieren.

Allerdings müssen für die unterschiedlichen Bakterienarten Wachstum, Vorbereitung der Zellen und Pulsdaten (Ohm/Volt/Capacity) optimiert werden.

2.10.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Durchführung:

- 40 ml Medium mit 2 ml ÜNK animpfen
- bei optimaler Wachstumtemperatur bis zu einem Titer von 2×10^8 cfu/ml anwachsen lassen (log-Phase)
- 15 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 6 000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in 5 ml H_2O (Millipore) bei 0°C resuspendieren
- Zentrifugenbecher mit H_2O (Millipore) auffüllen
- 15 min bei 6 000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in 0,5 ml 15% Glycerin bei 0°C resuspendieren
- zu je 100 μl portionieren
- sofort verwenden oder bei -80°C einfrieren

2.10.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen nach Thoms (persönliche Mitteilung)

Durchführung:

- Stamm auf einer TBY-Platte ausstreichen und ÜN bei optimaler Wachstumtemperatur inkubieren
- Zellen von der Platte mit einem Spatel oder umgeknickter Pipettenspitze abnehmen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- in circa 300 μl 10% - 15% Glycerin resuspendieren
- 3 bis 5 min bei 13 000 rpm (Eppendorfszentrifuge) zentrifugieren
- die letzten beiden Schritte 2 – 3 mal wiederholen
- in 1 ml 10% - 15% Glycerin resuspendieren

- zu je 100 μ l portionieren
- sofort verwenden oder bei -80°C einfrieren

2.10.3. Elektroporation

Material

SOC-Medium

- 2 % Trypton
- 0.5% Hefe
- 0.05% NaCl (=10 mM)
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl_2
- 10 mM MgSO_4
- autoklavieren
- 20 mM Glucose (=0.4%)

Durchführung:

- zu 100 μ l kompetenten Zellen add. x μ l Plasmid-DNA
- Elektroporationsküvetten bei 0°C vorkühlen
- kompetente Zellen mit DNA in die Elektroporationsküvetten pipettieren
- Einstellung des Impulsgebers an die Bakterienart anpassen
- Impulse geben (der Wert der Zeitkonstante sollte zwischen 2 und 17 liegen)
- sofort die Küvette mit 1 ml SOC-Medium spülen
- Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführen
- 1 h bei optimaler Wachstumtemperatur regenerieren lassen
- auf Selektivmedium ausplattieren

2.11. Random Primed DNA Markierung (zur nicht-radioaktiven Markierung von DNA) (Kit der Firma Roche)

Die Random Primed DNA-Markierung dient der nicht radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten. Die zu markierenden DNA-Fragmente werden dabei zunächst denaturiert, so dass

Hexanukleotide an die nun vorliegenden Einzelstränge binden können. Diese dienen als Startprimer für die Klenow Polymerase, welche unmarkierte dNTP's und Digoxigenin markierte dUTP's (dig-dUTP) zu einer Synthese des neuen Doppelstranges benutzt.

Durchführung:

- DNA Fragment lösen in 15 µl H₂O
- 10 min bei 100°C denaturieren
- in Eis abkühlen
- kurz anzentrifugieren
- Zugabe von:
 - 2 µl Hexanukleotid-Mix (vial 5)
 - 2 µl dNTP Mix (vial 6; 1 mM dACGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-UTP)
 - 1 µl Klenow Enzym (2 U/µl, vial 7)
- 60 min 37°C
- Reaktion durch Zugabe von 2 µl 250 mM EDTA stoppen
- evtl. bei -20°C lagern

2.12. DNA-DNA-Hybridisierung**2.12.1. Allgemeines**

Anhand dieser Methode können homologe DNA-Sequenzen in unterschiedlichen DNA-Proben detektiert werden. Dabei wird die zu untersuchende DNA-Probe zunächst elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt, denaturiert und durch Blotten auf eine Nylonmembran übertragen, dort quervernetzt und dann gegen eine Digoxigenin markierte, einzelsträngige DNA-Sonde hybridisiert

Homologe Bereiche der auf der Membran fixierten DNA-Probe mit der Sonde können so angefärbt und identifiziert werden.

2.12.2 Southernblot (Southern, 1975, modifiziert)

Beim Southernblot werden DNA-Proben, die durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, von dem Agarosegel auf eine Membran übertragen. Der Blot erfolgt mit Hilfe eines Vakuumblotter (Pharmacia).

Material

Lösung I

- 0,25 M HCl

Lösung II

- 1,5 M NaCl
- 0,5 M NaOH

Lösung III

- 1 M Tris-HCl, pH 5,0
- 2 M NaCl

20 x SSC

- 174 g NaCl
- 88,2 g Na-Citrat
- add. 1000 ml H₂O Millipore

Durchführung:

- Trägerplatte in Blotter einsetzen (Vakuumblotter, Pharmacia)
- Plastikmaske anfeuchten und glatt auflegen
- Test auf Dichtigkeit: dazu Ausschnitt in Maske mit Folie bedecken, Pumpe anschließen und 50 mbar Unterdruck erzeugen
- nun angefeuchtete Membran auf Ausschnitt legen
- Agarosegel luftblasenfrei auf Membran legen
- zur Depurinierung Lösung 1 auf Gel pipettieren und 4 bis max. 10 min bis zum Farbumschlag des BPB von blau nach gelb einwirken lassen
- absaugen
- zur Denaturierung Gel mit Lösung 2 überschichten und 3 min einwirken lassen, BPB wird wieder blau, absaugen
- zur Neutralisierung Gel mit Lösung 3 überschichten und 3 min einwirken lassen, absaugen
- für den Transfer der DNA auf die Membran das Gel für 30-60 min mit 20 x SSC überschichten

- Membran zur Quervernetzung 5 min auf Transilluminator legen

2.12.3. Southern-Hybridisierung

Im Laufe dieses Reaktionsschrittes werden die DNA-Proben gegen eine Digoxigenin markierte, einzelsträngige DNA-Sonde hybridisiert

So können homologe Bereiche der DNA-Proben mit der eingesetzten Sonde angefärbt und kenntlich gemacht werden.

Material

Prähybridisierungspuffer

- 5 x SSC
- 0,1 % N-Lauroylsarcosine (w/v)
- 0,02 % SDS (w/v)
- 2 % Blocking-Reagenz

Hybridisierungs-Puffer I

- 150 mM NaCl
- 100 mM Maleinsäure, pH 7,5

Hybridisierungs-Puffer II

- 1% Blocking-Reagenz in Hybridisierungs-Puffer I

Hybridisierungs-Puffer III

- 50 mM Tris-HCl, pH 9,5
- 50 mM NaCl
- 20 mM MgCl₂

Waschlösung I

- 2 x SSC
- 0,1 % SDS

Waschlösung II

- 0.1 x SSC

- 0.1 % SDS

Durchführung:

- Membran in eine Schale transferieren
- Membran 10 min in 5 x SSC waschen
- die Membran über eine Pipette rollen und luftblasenfrei in den Hybridisierungszylinder überführen
- 20 ml Prähybridisierungspuffer zugeben
- zur Prähybridisierung mind. 60 min bei 65°C im Hybridisierungssofen rollern
- markierte Sonde 10 min bei 98°C denaturieren
- Prähybridisierungspuffer abschütten
- 10 ml Hybridisierungslösung (Sonde mit Prähybridisierungspuffer) zur Membran geben
- zur Hybridisierung über Nacht bei 68°C im Hybridisierungssofen rollern
- Hybridisierungslösung abgießen
- (kann mehrfach verwendet werden, Lagerung bei -20°C)
- Membran 2x 5 min mit Waschlösung I bei RT waschen
- Membran 2x 15 min mit Waschlösung II bei 50°C im Hybridisierungssofen waschen
- Waschlösung entfernen
- Membran in eine Schale transferieren und kurz mit Puffer I waschen
- 30 min in Puffer II inkubieren (Schüttler)
- 20 ml Puffer II mit anti-Digoxigenin- alkalische Phosphatase-Konjugat (1 µl / 10 ml) zugeben
- 30 min bei RT schütteln
- Puffer II mit anti-Digoxigenin- alkalische Phosphatase-Konjugat abgießen
- 2 x 15 min mit Puffer I + Tween 80 (3 g / 100 ml) waschen (Schüttler)
- 2 x 5 min mit Puffer III waschen (Schüttler)
- Nachweis: 20 ml Puffer III + 50 µl NBT / BCIP im Dunkeln stehen lassen bis
- Signale sichtbar werden
- die Reaktion mit H₂O abstoppen

2.13. Phagentiterung

Um den Titer eines Phagenlysats bestimmen zu können, wird eine Verdünnungsreihe erstellt und diese auf einen Wirtstamm aufgetropft. Die Bestimmung des Titers ist für weitere Versuche

wichtig, da z. B. Infektionen mit verschiedenen *mois* durchgeführt werden und das Phagen-Bakterien-Verhältnis dafür beachtet werden muss.

Durchführung:

- Verdünnungsreihe des Phagenlysats in TBY anlegen (Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})
- je 10 μ l der Verdünnungsreihe im Uhrzeigersinn auf die Indikatorplatte tropfen
- Tropfen einziehen lassen
- $\ddot{u}N$ bei der optimalen Wachstumstemperatur des Wirtsstammes inkubieren
- Plaques auszählen und Phagentiter bestimmen

Herstellung der Indikatorplatte

Durchführung:

- 100-200 μ l Kultur ($\ddot{U}K$, besser log Kultur) in Weichagarröhrchen füllen
- Zugabe von 3 ml $\frac{1}{2}$ TBY Weichagar
- zügig auf Agarplatte (Raumtemperatur) gießen

2.14. Herstellung von Bakteriophagenlysaten

Phagen können zum einen durch die Herstellung eines Flüssiglysats oder zum anderen durch die Herstellung eines Abwaschlysats auf einer TBY-Agar-Platte vermehrt werden.

2.14.1. Herstellung eines Phagenlysats in Flüssigmedium

- 500 ml Vollmedium animpfen mit $\ddot{U}NK$ des Wirtsstammes
- bei geeigneter Temperatur (26°C bzw. 37°C) schütteln bis Titer ca. $2-3 \times 10^8$
- Infektion mit Phagen mit Multiplizität 0,1-0,5
- weiterschütteln bis zur vollständigen Lyse
- Zentrifugation 15 Min. 7000 rpm
- Überstand 2 h bei 12000 rpm zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet vorsichtig in kleinem Volumen Puffer suspendieren (10 mM Tris-HCl, pH7,5, 50 mM NaCl, ca. 1 ml)
- In der Zwischenzeit CsCl Stufengradienten herstellen; dazu je 0,7 ml CsCl Lösung der Dichten -1,6, 1,5, 1,4 und 1,3 vorsichtig übereinanderschichten.

- Phagenlysate auf den Gradienten auftragen und Röhrchen mit Puffer D bis zum Rand auffüllen.
- Austarieren
- in der Ultrazentrifuge 2 h bei 35000 rpm (Rotor TST55.5) zentrifugieren
- Zentrifugenröhrchen unten anstechen und Phagenbande auffangen
- Dialyse gegen Puffer D (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl)

2.14.2. Herstellung eines Abwaschlysats

- 100-200 μ l log Kultur des Wirtsstammes in ein Weichagarr hrchen f llen
- add. x μ l Phagenlysate (20 – 30 000 Plaques sollten zu erwarten sein)
- add. 100 μ l 1 M CaCl_2 bei P1 Infektion
- add. 0,5 ml TBY
- add. 3 ml Weichagar
- Ansatz auf Agarplatte gießen
- Inkubation bis zur konfluenten Lyse
- mit 0,5 ml TBY  berschichten
- Weichagarschicht in ein Corexglas überführen
- add. 100 μ l Chloroform (mit Glaspipette unterrühren)
- 15 min bei RT inkubieren
- 30 min mit 10 000 rpm (Rotor A8.24) bei 4°C zentrifugieren
- Überstand (=Phagenlysate) in ein Glasröhrchen überführen

2.15. Isolierung von Phagen-DNA

Material

Kirby Mix:

- 88 ml Phenol
- 12 ml Kresol
- 0,1 g Hydroxychinolin
- gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8

TE Puffer:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

- 1 mM EDTA

Durchführung:

- gereinigtes Phagenlysat mit gleichem Volumen Kirby Mix mischen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Oberphase (wässrige, DNA-haltige Phase) in neues Eppendorfgefäß überführen
- Phenolextraktion zwei Mal wiederholen
- Oberphase ün gegen TE Puffer (mindestens zwei Wechsel) dialysieren

2.16. Überexpression von Proteinen

Für die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine als N- terminale His-tag -Fusion wurde der Vektor pSCodon genutzt. Dieser Expressionsvektor ermöglicht die Überexpression und Reinigung der Proteine mit einem fusioniertem His-tag.

2.16.1. Proteinisolierung

Um Proteine isolieren zu können, müssen die Zellen zunächst einmal lysiert werden. Dafür werden verschiedene Verfahren mit verschiedenen Wirkmechanismen verwendet. So können die Zellen osmotisch durch eine hypotonische Lösung, mechanisch durch hohen Druck wie bei der French Press-Methode, durch Ultraschall, chemisch durch Einsatz von Detergenzien oder enzymatisch mit Lysozym aufgeschlossen werden.

2.16.2. Gesamtzelleextrakt für SDS-PAGE**Material**

Sample buffer (Probenpuffer) für SDS-PAGE

- 100 mM Tris, pH 6,8
- 6% SDS
- 12 % Glycerin
- 1 M β -Mercaptoethanol
- BPB

Durchführung:

- 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführen

- Zentrifugieren 5 min, 13000 rpm (Biofuge)
- Überstand quantitativ verwerfen
- Pellet in sample buffer resuspendieren (30 µl Probenpuffer/o.D. 450 nm)
- 5-10 min bei 98°C inkubieren
- 15 min bei 13 000 rpm (Biofuge) zentrifugieren
- Überstand für SDS-PAGE oder bei -20°C

2.16.3. French Press-Zellysat

Bei der French Press wird durch Druckaufbau in der Kühlzelle das in der Zellsuspension befindliche Gas komprimiert. Die Öffnung der Auslasskapillare führt zu einem Druckabfall, der die Explosion der Gasblasen zur Folge hat und die umgebenden Zellen so aufbricht.

Durchführung:

- Zellen 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren
- Pellet in 1-2 ml H₂O resuspendieren
- Zellsuspension in 3/8-Kühlzelle (vorgekühlt bei 4°C) bei 138 MPa (900 psi) aufschließen
- Aufschluss je nach Viskosität wiederholen
- Suspension 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren, um Zelltrümmer zu entfernen
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen (=Proteinextrakt)

2.17. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli modifiziert (1970)

Bei einer SDS-PAGE werden die aufgetragenen Proteine nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Diese Auftrennung wird durch den Zusatz von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer und in der Gebrauchslösung gewährleistet, das die Proteine denaturiert und alle mit derselben negativen Ladung versieht.

Eine SDS-PAGE ist aus zwei unterschiedlichen konzentrierten Polyacrylamid-Gelen aufgebaut, dem Sammel- und dem Trenngel.

Im Sammelgel werden die Proteine zunächst auf eine schmale Bande konzentriert, bevor diese dann in dann Trenngel eintreten, in dem dann die eigentliche Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Größe erfolgt.

Material

RB-Stammlösung 10 x

- 121 g Glycin
- 75 g Tris-Base
- add. 1 l H₂O Millipore

RB-Gebrauchslösung 1x

- 100 ml RB-Stammlösung
- 10 ml 10 % SDS
- add. 1 l H₂O Millipore

Färbelösung

- 40% Methanol
- 10% Essigsäure
- 1% Coomassie Brilliant Blue G250

Entfärber

- 40% Methanol
- 10% Eisessig

Herstellung der Polyacrylamid-Gele:

	17,5 % Trenngel	5 % Sammelgel
30 % Acrylamid	4,38 ml	0,42 ml
1 % Bis-Acrylamid	0,55 ml	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,7	1,68 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	0,31 ml
H ₂ O Millipore	0,8 ml	1,43 ml
10 % SDS	100 µl	30 µl
10 % APS	50 µl	17 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Mengenangaben beziehen sich auf Glasplatten mit den Maßen 10 cm x 12 cm

Durchführung:

- Glasplatten gut mit Ethanol reinigen
- Glasplatten und Spacer zusammensetzen und mit Agarose abdichten
- Trenngel gießen, bis ca. 1 cm unter den Kamm
- vorsichtig mit H₂O dest. überschichten
- polymerisieren lassen (bis Kanten des Gel abgerundet sind)
- Wasser gut abgießen, kurz mit Ethanol nachspülen
- Sammelgel gießen, Kamm einsetzen
- für mind. 45 min polymerisieren lassen
- unteren Spacer entfernen
- Gel in Kammer setzen
- Kammer mit RB-Gebrauchslösung füllen
- Kamm vorsichtig entfernen
- Proben mit SDS-Probenpuffer auf das auspolymerisierte Gel auftragen
- die Proben für 15 min im Gel bei 10 mA einlaufen lassen
- Spannungsgeber auf 20 mA einstellen
- nach dem Lauf die Spacer und die beiden Glasplatten entfernen
- Gel mindestens 45 min in der Färbelösung bei RT inkubieren
- Färbelösung abgießen, abspülen und in der Entfärbelösung bei RT inkubieren, bis Banden gewünschte Intensität aufweisen

2.18. Silberfärbung eines SDS-Gels

Neben der Coomassie-Färbung bietet die Silberfärbung eine weitere Alternative zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Dazu werden die Proteine nach der Denaturierung zunächst fixiert und anschließend mit Silbernitrat behandelt. Ag⁺-Ionen werden dabei an die Proteine angelagert. Nach der Inkubation mit Formaldehyd werden die Ionen zu elementarem Silber reduziert, wodurch die Proteine dann angefärbt werden.

Material

Lösung 1:

- 50% Methanol
- 12% Eisessig

- 0,02% Formaldehyd

Lösung 2:

- 0,25 AgNO₃
- 0,05% Formaldehyd

Entwickler:

- 6% Na₂CO₃
- 0,02% Formaldehyd
- 0,004% Na₂S₂O₃

Lösung 3:

- 50% Methanol
- 12% Eisessig

Durchführung:

- Gel 15 min in Lösung 1 fixieren
- 3x 10 min in 50% Ethanol waschen
- 1 min in 0,02% Na₂S₂O₃ waschen
- 3x 20 s mit Millipore waschen
- 15min färben in Lösung 2 färben
- 20 s waschen mit Millipore
- Einige Sekunden bis Minuten in Entwickler legen, bis Signale erscheinen
- 3x 2 min mit Millipore waschen
- Reaktion ca. 10 min mit Lösung 3 stoppen

2.19. Konservierung eines SDS-Gels

Material

Konservierungspuffer:

- 25% Isopropanol
- 3% Glycerin

Durchführung:

- Gel und Einmachfolien werden 15 min in Konservierungspuffer geschüttelt
- Gel wird zwischen zwei Folien in einen Rahmen gespannt
- Trocknung üN bei RT

2.20. Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA von QIAexpressionist™

Bei einer Affinitätschromatographie wird die spezifische Bindung des Moleküls, das aufgereinigt werden soll, an einen Liganden genutzt, der matrixgebunden vorliegt. Die Wechselwirkung der beiden Moleküle wird genutzt, um ein dabei das Molekül spezifisch aus einer Mischung zu adsorbieren. Dabei können verschiedene Wechselwirkungen, z. B. zwischen Antigen und Antikörper genutzt werden. In diesem Fall wurden die Proteine mit einem Poly-Histidin-Peptid fusioniert, so dass diese über eine Säule mit Ni-NTA aufgereinigt werden können.

Material

Äquilibrierungspuffer/Waschpuffer:

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 20 mM Imidazol (nur in Waschpuffer)

Elutionspuffer 1

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 100 mM Imidazol

Elutionspuffer 2

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 200 mM Imidazol

Elutionspuffer 3

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 300 mM Imidazol

Durchführung:

- 500 µl Ni-NTA Superflow Granulat mit 1 ml Äquilibrierungspuffer waschen, Lösung 2x wechseln
- 1 ml Überstand mit löslichem Protein dazugeben, 1 h bei 4°C inkubieren, zwischendurch aufschütteln
- Ni-NTA Granulat mit gebundenem Protein auf Säule geben
- mit mind. 5 ml Waschpuffer waschen, Durchfluss sammeln
- je 500 µl Elutionspuffer auf Säule geben, Durchfluss in Fraktionen sammeln

Anstatt der Elutionspuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an Imidazol kann das gebundene Protein auch mit einem pH-Gradienten eluiert werden. Der pH des Waschpuffers beträgt 7,5 und kann während des Waschens langsam gesenkt werden. Die Elutionspuffer haben einen pH-Wert zwischen 5,9 und 4,5. Erste gebundene Proteine lösen sich bereits bei pH 5,9, der Großteil der Proteine konnte im Bereich um 5-4,5 eluiert werden.

2.21. Proteinausfällung mit Ammoniumsulfat

Um die sich nach der Induktion im Medium befindenden Proteine zu konzentrieren, bedient man sich der Methode des Fällens, insbesondere des Aussalzens. Das am häufigsten verwendete Salz ist das Ammoniumsulfat, das den hydrophoben Effekt in der Lösung erhöht und somit Proteinaggregationen über hydrophobe Wechselwirkungen fördert. Dabei schützt es auch noch die biologische Aktivität der Proteine, so dass diese beim Fällern nicht zerstört werden. Ein weiterer Vorteil ist das leichte Entfernen nach der Fällung, z. B. durch Dialyse.

Material

Puffer 1:

- 50 mM NaCl
- 20 mM Tris
- 7 mM β -Mercaptoethanol

Durchführung:

- Medium mit induzierten Zellen zentrifugieren, 20 min bei 12000 rpm und 4°C
- Überstand mit 80% Sättigung Ammoniumsulfat behandeln
- 20 min auf Eis rühren lassen

- Zentrifugieren, 20 min bei 12000rpm und bei 4°C
- Pellet in 2 ml Puffer 1 auf Schüttler resuspendieren
- Dialyse gegen Puffer 1 üN bei 4°C

2.22. Tryptischer Verdau von Proteinen

Das Enzym Trypsin kann Peptidbindungen in Proteinen spezifisch hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin spalten. Durch diese Behandlung entsteht für jedes Protein ein spezifisches Peptidmuster. Die molekulare Masse dieser Peptidstücke kann mittels massenspektrometrischer Analysen bis auf 1kDa bestimmt werden. Bei einer bekannten Proteinsequenz kann so anhand des spezifischen Peptidmusters auf ein Protein zurückgeschlossen werden.

Durchführung:

- Proteinbande aus gefärbten Gel ausschneiden und in ein Eppi überführen
- add. 250 µl 50% H₂O / 50% CH₃CN (Acetonitril), 5 min vortexen
- Waschlösung verwerfen
- add. 250 µl 50% CH₃CN / 50 mM NH₄HCO₃ (Ammoniumhydrogencarbonat, 30 min auf Wipptisch schütteln
- Waschlösung verwerfen
- add. 250 µl 50% CH₃CN / 10 mM NH₄CO₃, 30 min auf Wipptisch schütteln
- Waschlösung verwerfen
- Trocknung der Gelstücke üN unter Abzug
- 15 µl Trypsinlösung (0,1 µg Trypsin in 15 µl 10 mM NH₄CO₃) zugeben, 10 min bei RT inkubieren
- add. 20 µl 10 mM NH₄CO₃
- 24 h Inkubation bei 37°C, anschließend Lagerung bei -20°C

2.23. Maldi, Mascot

Die tryptisch verdauten Proteine werden mit Hilfe von MALDI (Jonsson, 2001) massenspektrometrisch analysiert. Die dabei entstehenden Massenspektren werden anschließend mit dem Programm MASCOT (Perkins *et al.*, 1999) bearbeitet, das zu einem direkten Vergleich mit den Proteinen der *Cmm*-Datenbank genutzt werden kann.

2.24. Western Blot

Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert, wobei das Auftrennungsmuster aber nicht verändert wird. Das an die Proteine angelagerte SDS wird ausgewaschen und die Proteine können renaturieren und ihre natürliche Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, die dann durch Antikörper erkannt werden können.

Bei dem elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Systeme im Einsatz, das von uns verwendete Semidry-Blot-System und das Tank-Blot-System.

Nach dem Transfer auf die Nitrocellulose müssen zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da die Antikörper sich sonst an diese Bindungsstellen heften würden und somit ein spezifischer Nachweis unmöglich wäre. Für das Blockieren der freien Bindungsstellen eignet sich in diesem Fall aufgrund des exprimierten Proteins mit His-tag Milchpulver oder BSA (bovine serum albumin).

Um nach der Inkubation mit dem Strep-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat gegen den Streptag des exprimierten Proteins die spezifische Bindung der Antikörper nachzuweisen, wird ein NBT/BCIP verwendet, das von der alkalischen Phosphatase umgesetzt werden kann. Die Produkte bilden dann ein sichtbares Präzipitat um den Strep-tag-Antikörper-Komplex.

2.24.1. Semi-Dry Blot

Material

BIOMETRA-Kammer

Blotpuffer I:

- 300 mM Trisbase
- 10% Methanol

Blotpuffer II:

- 30 mM Trisbase
- 10% Methanol

Blotpuffer III:

- 40 mM Capronsäure
- 10% Methanol

Durchführung:

- Whatman 3 mm Filterpapier in Größe des Gels ausschneiden (18x)
- Nitrocellulose (S&S, Optitran BA-S 85) in Größe des Gels ausschneiden
- Unterteil des Blotters (Anode) an Kühlkreislauf anschließen
- Wasserhahn vorsichtig öffnen, so dass die Durchflussgeschwindigkeit 0,5-1 l/min nicht überschreitet
- Blotaufbau:
 - 6 Lagen Filterpapier in Puffer I getränkt
 - 3 Lagen Filterpapier in Puffer II getränkt
 - Nitrocellulose in Puffer II getränkt
 - Acrylamidgel
 - 9 Lagen Filterpapier in Puffer III getränkt
- alle Lagen luftblasenfrei auf Blotter schichten
- Deckel (Kathode) schließen und mit Eisgefäß beschweren
- Spannungsgeber anschließen und für ca. 90 min bei 60 mA blotten

2.24.2. Westernblot Analyse**Material**

TBS:

- 50 mM Tris HCl, pH 7,5
- 150 mM NaCl

Blocking Puffer

- TBS mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver und 0,5% v/v Tween 20

TBS-Tween Puffer

- TBS mit 0,1% v/v Tween 20

Reaktionspuffer

- 100 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 100 mM TrisCl, pH 8,8

Durchführung:

- Membran in Schale transferieren
- In 20 ml Blocking Puffer für 1h bei RT auf Schüttler inkubieren
- primären Antikörper (Anti-His-Tag monoklonal aus Maus, 1:2000) in Blocking Puffer hinzugeben
- Inkubation bei 4°C bei 100 rpm
- 3x 5 min mit TBS-Tween Puffer waschen
- 3x 5 min mit TBS-Puffer waschen
- Sekundär-AK (Anti-Maus –IgG-AP; 1:5000-1:10000) in Blocking Puffer verdünnen und 2 h bei RT inkubieren
- 3x 5 min mit TBS-Tween Puffer waschen
- 3x 5 min mit TBS-Puffer waschen
- Membran in 20 ml Reaktionspuffer transferieren
- 50 µl NBT/BCIP hinzugeben
- Inkubieren, bis Signale der gewünschten Stärke sichtbar werden
- Reaktion mit H₂O stoppen
- Trocknen lassen

2.25. Nachweis der lytischen Aktivität des Endolysins

Der Nachweis der Expression des rekombinanten Endolysins erfolgte durch Photometrie und Plattendiffusions- bzw Tropftests.

Photometer-Test**Durchführung:**

- 1 ml Zellkonzentrat von *Cmm* 3123 mit TBY auf OD₆₀₀ ± 0,5 verdünnen
- auf Eis kühlen
- zu 900 µl Zellkonzentrat werden 50 µl Rohextrakt des rekombinanten *E.coli*-Stammes pipettiert
- Abnahme der OD₆₀₀ messen
- bei Optimaltemperatur inkubieren

2.26.1. Isolation von *Clavibacter*-Murein

(Höltje, J.V., 1998; Hoyle and Beveridge, T.J., 1983)

Durchführung:

- ca. 2 g Zellen in 6 ml 50 mM NaPi (pH 7,2) in 40 ml Tube resuspendieren
- 2x French Press
- 45 min Ultraschall auf Eis (0,7 Puls bei 200)
- in Corexglas überführen
- 10 min 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand (noch nicht klar) >12000 g 1 h zentrifugieren
- in 5 ml 50 mM NaPi (pH 7,2) resuspendieren
- add. 1 ml 25% SDS
- 40 min bei 100°C im Wasserbad
- 1 h 12000 g zentrifugieren
- Pellet 2x waschen mit 50 mM NaPi (pH 7,2)
- Pellet in 2 ml 50 mM NaPi (pH 7,6) resuspendieren + 100 µl Pronase (1 mg/ml)
- 2 h bei 37°C
- 30 min 12000 g zentrifugieren
- mit 50 mM NaPi (pH 7,6) waschen
- Pellet in 2 ml 5% TCA resuspendieren
- 20 min bei 100°C im Wasserbad
- zum Abkühlen 5min unter Abzug (->Chloroform weg)
- 30 min 12000 g zentrifugieren
- 3x waschen mit 50 mM NaPi (pH7,6)
- Pellet in 2 ml Ethanol reuspendieren
- 10 min 6500 rpm zentrifugieren
- Überstand weg, 2 ml Diethylether, resuspendieren
- Zentrifugieren 10 min 6500 rpm
- Überstand weg
- unter Abzug trocknen

2.26.2. Isolation von *Clavibacter*-Murein (Methode DSMZ)

- 3-4 g Zellmaterial mit Glasperlen (0,1-0,11 mm und 0,17-0,18 mm 1:1, Sartorius) vermischen, bis homogener Zellbrei entsteht
- einfüllen in Metallkolben
- anschließend Metallkolben in Zelmühle Vi4 (Vibrogen) fixieren und abdichten
- Behandlung der Zellen 25 min unter Wasserkühlung
- Zellbrei über eine Fritte (Duran Group, 125 ml filterfunnels, porosity 1) mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe in Erlenmeyerkolben überführen
- Zentrifugieren 10 min 2000 rpm
- Überstand entnehmen, Pellet enthält Glaskugeln
- Zentrifugieren 15 min bei 20000 rpm
- Pellet 3x in H₂O dest. waschen
- Pellet in Phosphatpuffer pH 7,9 waschen
- Zentrifugieren 15 min 20000 rpm
- Pellet in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,9 resuspendieren
- in Erlenmeyerkolben überführen
- add. Spatelspitze Trypsin und 1 Tropfen Toluol
- Inkubation unter ständigem Rühren bei 37°C üN
- Zentrifugieren 15 min bei 20000 rpm
- Pellet in H₂O resuspendieren, waschen
- Zentrifugieren 15 min bei 20000 rpm
- Pellet resuspendieren in 10 ml H₂O
- add. 1 ml SDS (20%)
- Inkubation 20 min bei RT unter leichtem Schütteln
- 3x Zentrifugieren 15 min bei 20000 rpm und waschen mit H₂O

2.27. Überprüfung der Reinheit des isolierten Mureins (Rhuland, 1955)

- ca. 2-3 mg lyophilisierte Zellen oder zwei Spatelspitzen isolierter nasser Biomasse zu 200 µl 4 N HCl in einer 2 ml Glasampulle (Gerresheimer Querétaro, Mexico, P/N 12050U-2/untreated) geben
- Ampulle zuschmelzen und für 16 h bei 100 °C inkubieren
- nach dem Abkühlen Ampulle öffnen und den Inhalt durch ein wenig Aktivkohle filtrieren

- Hydrolysat in leichtem Luftzug bei 35 °C trocknen
- in 200 µl Wasser aufnehmen und erneut trocknen lassen, 2x wiederholen
- in 100 µl Wasser aufnehmen
- Lösung wird am unteren Ende einer 20 cm langen Cellulose- TLC Platte (Merck, P/N 1.05577) zusammen mit zwei Standards aufgetragen
- Standard 1 enthält Dpm (Fluka, P/N 33240; *meso*- und LL-Dpm), DL-Lysin-dihydrochlorid (Aldrich, P/N 62910) und DL-ornithin Monohydrochlorid (Sigma, P/N O-2250)
- Der zweite Standard enthält 2,4-Diaminobuttersäure- Dihydrochlorid (Sigma, P/N D-3758) (alle 5 mg/ml Wasser)
- TLC-Gefäß mit Filterpapier mit Lösungsmittel befüllen (Rhuland *et al.*, 1955) (32 ml Methanol, 4 ml Pyridin, 7 ml Wasser und 1 ml 12 N HCl für die Äquilibration)
- Chromatogramm laufen lassen, bis Lösungsmittelfront fast oberes Ende erreicht
- TLC für 1 h unter Abzug trocknen lassen
- mit Ninhydrin-Reagenz besprühen (1,25 mg Ninhydrin, 233 ml Wasser-gesättigtes 1-Butanol, 17 ml Essigsäure)
- Flecken erscheinen nach Erhitzen bei 100°C für 5 min

2.28. Zymogramm-Analyse

Bei einer Zymogramm-Analyse wird die enzymatische Aktivität eines Proteins untersucht. Dabei werden die denaturierten Proben durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Im Gegensatz zu einer normalen PAGE wird in das Trenngel noch das für das zu untersuchende Protein spezifische Substrat zusätzlich mit eingegossen (Potvin *et al.*, 1988). Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine wieder renaturiert und liegen dann wieder in der aktiven Form vor und können so mit dem Substrat interagieren. Diese Reaktion kann dann durch z. B. durch Aufklärung oder Verfärbung des Gels detektiert werden.

Material

Renaturierungspuffer:

- 25 mM NaPi, pH 6,8
- 10 mM MgCl₂
- 0,1% Triton -X100

Färbelösung:

- 0,1% Methylenblau in 0,01% KOH

Durchführung:

- in ein 12% SDS-Trenngel (0,03% SDS) wird 0,2% (wt/v) isoliertes Murein mit eingegossen
- vor dem Auftragen der Proben werden diese 7 min bei 98°C gekocht
- nach der PAGE wird das Gel kurz mit Millipore gewaschen
- bei RT 30 min in Millipore waschen
- bei RT 30 min in Renaturierungspuffer inkubieren
- üN bei 30°C in Renaturierungspuffer inkubieren
- 10 h bei 37°C in Renaturierungspuffer inkubieren
- Anfärben der Mureinsacculi mit Färbelösung (Bernadsky *et al.*, 1994)

2.29. Erzeugung von *E. coli thyA* Mutanten

Für die Erzeugung von *E. coli thyA* Mutanten wurde der für die Expression benötigte Stamm SE1 wie beschrieben zunächst in Minimal-Medium angezogen. Anschließend wurden 20 µl einer ÜN-Kultur dieses Stamms auf M9 Platten mit 20 µg/ml Trimethoprim und 50 µg/ml Thymin ausplattiert und bei 37°C inkubiert (Stacey and Simson, 1965). Nach drei Tagen wurden Einzelkolonien von den Platten parallel auf TBY und TBY mit Thymin ausgestrichen. Kolonien, die nur auf TBY-Platten mit Thymin wuchsen, wurden für den Versuch eingesetzt.

2.30. Isolierung von Xylemsaft

Für die Isolierung von Xylemsaft wurden 6 Wochen alte Tomatenpflanzen verwendet.

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde
- Pflanzen im Zwei-Blatt-Stadium (2 Wochen nach der Aussaat) entnehmen und in vorbereitete Pflanztöpfe (Durchmesser: 12 cm) mit steriler Topferde einpflanzen
- Anzucht der Pflanzen für vier Wochen im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln)
- Pflanzen unterhalb des ersten Fiederblattes mit einem sterilen Skalpell abtrennen
- Xylemsaft innerhalb der folgenden 1-2 h von der Schnittfläche pipettieren
- entnommenen Xylemsaft zunächst auf Eis lagern, anschließend bei -20°C

2.31. Ermittlung des Welkeindex und des Welkeverlaufs

Als Welkeindex eines *Cmm*-Stamms wird der Zeitraum bezeichnet, zu dem 50 % der infizierten Pflanzen deutliche Welkesymptome aufweisen (Bermpohl, 1990). Der Welkeverlauf gibt Aufschluss über den genauen Welkestatus aller Pflanzen. Hierzu werden täglich die Welkesymptome der einzelnen Pflanzen nach einem vierstufigen Schema protokolliert. Pflanzen mit einer sich leicht einkrümmenden Blattspitze werden mit „(+)\", eindeutige Welkesymptome (mindestens ein deutlich welkendes Blatt) mit „+“ gekennzeichnet. Sehr starke Welke, bei der mehr als 2/3 der Blätter einer Pflanze welken, werden mit „++“ bewertet. Sind alle Blätter einer Pflanze durch die Welke so stark beeinträchtigt, dass sie nicht mehr zur Photosynthese fähig sind, werden die Pflanzen als „tot“ bezeichnet.

2.32. Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen

Zur Bestimmung des Frischgewichts und der Größe der Tomatenpflanzen wurde der Spross direkt oberhalb der Erde mit einem sterilen Skalpell oder einer sterilen Schere abgetrennt. Anschließend wurde die Pflanze gewogen und mit einem Lineal die Größe der Pflanze, von der Schnittfläche bis zum obersten Punkt der Pflanze, bestimmt.

2.33. Transformation von Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* var. Money-maker)

Material

Medium für *Agrobacterium*

YEB-Medium:

- 5 g/l Beef-Extrakt
- 1 g/l Hefe-Extrakt
- 5 g/l Peptone
- 5 g/l Sucrose
- 0,49 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- für Platten add. 15 g/l Bacto Agar Difco
- autoklavieren

LB-Medium

- 10 g/l Bacto-Tryptone

- 5 g/l Hefe-Extrakt
- 10 g/l NaCl
- für Platten add. 15 g/l Bacto Agar Difco
- autoklavieren

Bacteria-growth medium (BGM)

- 10 g/l Hefe-Extrakt
- 10 g/l Bacto-Peptide
- 5 g/l NaCl
- Autoklavieren
- add. 0,2 mM Acetosyringon
- antibiotics

Medien für Pflanzen

Germination Medium (GM)

auflösen in 900 ml ddH₂O:

- 4,4 g/l Murashige & Skoog + minimal organics (MSMO Sigma)
- 30 g/l Saccharose, pH mit 1 M KOH auf 5,8 einstellen, anschl. auf 1 l auffüllen
- 6 g/l Agar (DIFCO, Detroit, USA)
- autoklavieren

Liquid Germination Medium (LGM)

auflösen in 450 ml ddH₂O:

- 2,2 g/l Murashige & Skoog + minimal organics (MSMO Sigma, M 6899, bei 4°C)
- 15 g/l Saccharose
- 30 g/l Saccharose
- pH mit 1 M KOH auf 5,8 einstellen, anschl. auf 0,5 l auffüllen
- autoklavieren

Conditioning medium (CM)

auflösen in 900 ml ddH₂O

- 4,4 g/l Murashige & Skoog + minimal organics (MSMO Sigma)
- 30 g/l Saccharose

- pH mit 1 M KOH auf 5,8 einstellen, anschl. auf 0,5 l auffüllen
- 6 g/l Agar (DIFCO, Detroit, USA)
- autoklavieren
- abkühlen lassen auf 60°C (handwarm)
- Hormone hinzufügen:
0,1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA

Selektionsmedium (SM35, SM50 or SM100)

auflösen in 900 ml ddH₂O

- 4,4 g/l Murashige & Skoog + minimal organics (MSMO Sigma)
- add. NPT Vitamin-Stammlösung (1 ml/l) (10 mg/l Thiamin; 1 mg/l Nikotinsäure, 1 mg/l Pyridoxinic acid)
- 30 g/l Saccharose
- pH mit 1 M KOH auf 5,8 einstellen, anschl. auf 0,5 l auffüllen
- add. 6 g/l Bitek (DIFCO, Detroit, USA)
- autoklavieren
- abkühlen lassen auf 60°C (hand warm)
- add. Hormon 1 mg/l trans-Zeatin (Sigma, Z0876, -20°C),
- add. Antibiotikum gegen *Agrobacterium*: 150 mg/l Augmentan
- add. Antibiotikum für Selektion: 35 (**SM35**), 50 (**SM50**) or 100 (**SM100**) mg/l Kanamycin

Rooting medium (RM20)

- 4,4 g/l Murashige & Skoog + minimal organics (MSMO Sigma)
- add. NPT Vitamin-Stammlösung (1 ml/l) (10 mg/l Thiamin; 1 mg/l Nikotinsäure, 1 mg/l Pyridoxinic acid)
- 30 g/l Saccharose
- pH mit 1 M KOH auf 5,8 einstellen, anschl. auf 0,5 l auffüllen
- add. 6 g/l Bitek (DIFCO, Detroit, USA)
- autoklavieren
- abkühlen lassen auf 60°C (handwarm)
- add. Hormon: 0,1 mg/l IAA

- add. Antibiotikum für Selektion: Kanamycin (**RM20**), 500 mg/l Vancomycin (Douchefa V0155)

Stammlösungen

Naphtalenacetic acid (**NAA**) (Sigma)

- Konzentration: 1 mg/ml
- add. 1/10 Vol. 0,1 M NaOH, dann 9/10 Vol. ddH₂O
- sterilfiltrieren (0,2 µm)
- 1 ml Aliquots bei 4°C oder bei -20°C

6-BenzylAminoPurin (**BAP**) (Sigma)

- Konzentration: 1 mg/ml
- add. 1/10 Vol. 0,1 M HCL, dann 9/10 Vol. steriles ddH₂O
- sterilfiltrieren (0,2 µm)
- 1 ml Aliquots bei 4°C oder bei -20°C

IAA (**IAA**) (Sigma)

- Konzentration: 1 mg/ml
- add. 1/10 Vol. 100% EtOH, dann 9/10 Vol. steriles ddH₂O
- sterilfiltrieren (0,2 µm)
- 1 ml Aliquots bei 4°C oder bei -20°C

trans-Zeatin (**t-Z**) (Sigma, bei -20°C)

- Konzentration: 1 mg/ml
- add. 1/10 Vol. 0,1 M HCL, dann 9/10 Vol. steriles ddH₂O
- sterilfiltrieren (0,2 µm)
- 1 ml Aliquots bei 4°C oder bei -20°C

NPT Vitaminmix (**NPT**) (1 ml Aliquots bei -20°C)

- Thiamine-HCl stock concentration: 10 mg/ml
- Nicotinic acid stock concentration: 1 mg/ml
- Pyridoxine-HCl stock concentration: 1 mg/ml

2.33.1. Sterilisation der Tomatensamen (2 Wochen vor der Transformation)

- Samen 3 min waschen in 70% Ethanol
- anschl. 1,5% Hypochlorid mit 0.001% Triton W-100 für 10 min
- Waschen mit sterilem Wasser (3x 200 ml)
- üN trocknen unter Sterilbank

2.33.2. Vorbereitung der Kotyledonen

- 12 Tage vor Transformation Aussaat von ca. 30 Samen pro 0,5 l Glass mit **Germination Medium (GM)**
- 30 Gläser für 500 Kotyledonen
- Keimung für 10 Tage im Dunkeln bei 22°C
- Kotyledonen sollten eine gelbliche Farbe aufweisen und ca. 1 cm lang sein
- 2 Tage vor Transformation Keimlinge unterhalb der Kotyledonen abschneiden
- Spitzen der Blättchen abschneiden und die Blättchen mit der Blattoberseite in flüssiges GM legen
- anschl. ca. 20 Blättchen mit der Oberseite auf Agarplatten mit **Conditioning Medium (CM)** legen
- Inkubation für 2 Tage im Dunkeln bei RT

2.33.3. Vorbereitung der *Agrobacterium*-Kultur

- einige Tage vor der Transformation den rekombinanten *Agrobacterium*-Stamm (GV3101, pMP90) auf Platten (LB-Medium (Rif/Gen/Amp)) ausstreichen und bei 26°C 48 h inkubieren
- Zwei Tage vor der Transformation 3ml LB-Medium (Rif/Gen/Amp) mit einer Einzelkolonie animpfen und bei 26°C 24 h inkubieren
- einen Tag vor der Transformation 20 ml **Bacteria Growth-Medium (BGM)** mit 200 µl ÜN-Kultur animpfen, Inkubation 24 h bei 26°C

2.33.4. Infektion and Co-Kultivierung von Pflanzenblättern mit *Agrobacterium*

- vor der Infektion OD₅₉₀ der Kultur mit 10 mM MgSO₄ auf 1 einstellen
- *Agrobacterium*-Suspension mit Pipette auf Kotyledonen tropfen (2 Tropfen pro Blättchen)
- Inkubation für 2 Tage im Dunkeln bei 22°C

2.33.5. Selektion von transformiertem Gewebe (in 0,25 l Gläsern)

- Kotyledonen auf **Selektionsmedium** mit **35 mg/l Kanamycin (SM35)** transferieren, Blattoberseite nach oben (14 h Licht and 10 h im Dunkeln bei 23°C, 50% Luftfeuchtigkeit)
- 3 Tage auf Selektionsmedium mit 35 mg/l Kanamycin (**SM35**)
- 7 Tage auf frischem Selektionsmedium mit 35 mg/l Kanamycin (**SM35**)
- 2 x 7 Tage auf Selektionsmedium mit 50 mg/l Kanamycin (**SM50**)
- Ab der vierten Woche Kotyledonen jede Woche auf frisches Selektionsmedium mit 100 mg/l Kanamycin (**SM100**) transferieren

Nach ein paar Wochen sollten die ersten Sprosse gebildet werden, diese Sprosse und grüne Kalli sollten abgeschnitten und direkt auf das Medium gelegt werden.

2.33.6. Regeneration transgener Pflanzen

- nach 2 Monaten werden die Sprosse abgeschnitten und auf Rooting Medium mit 20 mg/l Kanamycin (**RM20**) transferiert
- die Spitze der Pflanzen wird abgeschnitten und in frisches Medium überführt, der untere Teil kann entsorgt werden, sobald erste Wurzeln entstanden sind

2.34. Isolierung pflanzlicher DNA aus Blättern von *Solanum lysopersicum*

Material

CTAB-Extraktionspuffer

- 1,4 M NaCl
- 0,1 M Tris-HCl
- 20 mM EDTA pH 8,0
- autoklavieren
- vor Extraktion 3% CTAB (w/v) und 0,2% Mercaptoethanol hinzugeben

Durchführung:

- 200 mg Pflanzenmaterial in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- mit Mikropistill zerkleinern

- Probe in 500 µl CTAB-Extraktionspuffer aufnehmen
- 60 min bei 65°C inkubieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- mit 200 µl Chloroform versetzen, vorsichtig mischen (nicht vortexen)
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Obere (wässrige) Phase in neues Eppendorf-Gefäß überführen
- mit 0,6 Volumen (300 µl) Isopropanol versetzen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 500 µl 70% Ethanol waschen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- DNA-Pellet trocknen
- in TE-Puffer lösen

3 Software, Internetseiten und Datenbanken

3.1. Software

Artemis10 (The Wellcome Trust, Sanger Institute)

AxioVision (Carl Zeiss AG)

Chromas (Version 2.2, Technelysium; www.technelysium.com.au/chromas.html)

Clone Manager 7.0 (Sci Ed Central; Scientific and Educational Software)

ClustalX (Erstellung multipler Alignments von Aminosäuresequenzen) (Thompson *et al.*, 1997)

Editsequence (DNASStar)

GeneDoc (Darstellung/Bearbeitung von multiplen Protein-Alignments) (Nicholas *et al.*, 1997)

SeqMan (DNASStar)

3.2. Internetseiten und Datenbanken

Analyse von Nukleotid-, Aminosäure- oder Proteinsequenzen

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
(Online-Datenbank zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen)

- <http://gcu.schoedl.de/>
(Online-Programm zum Vergleich der Codonbenutzung verschiedener Organismen)
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>
(Online-Programm zur Vorhersage von möglichen Transmembran-Domänen in der Struktur eines Proteins)
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/#submission>
(Online-Programm zur Vorhersage von möglichen Signalpeptiden in Proteinen)
- <http://merops.sanger.ac.uk/>
(Online-Datenbank zur Analyse von Peptidasen)

Sequenzierung

- <http://www.gatc-biotch.de/de/index.php>
- <http://www.sigmaldrich.com/>

DNA-Neusynthese

- <http://www.mrgene.com/>

Journale und Artikel

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>
- <http://gateway.ovid.com/>

V. Ergebnisse und Diskussion

1. Molekulare und genetische Charakterisierung des Bakteriophagen CMP1

Um Bakteriophagen zu einer Phagentherapie einsetzen zu können, müssen diese vorher genau charakterisiert werden, um u. a. eine optimale Vermehrung der Phagen zu gewährleisten und um sicherzustellen, dass es sich um virulente Phagen handelt. Lysogenisierung würde zum einen die Eliminierung der Bakterien verhindern und zum anderen können bei temperenten Phagen durch Lysogenisierung z. B. zusätzliche Toxin-Gene o. ä. auf das zu eliminierende Bakterium übertragen werden. In diesen Fällen spricht man von lysogener Konversion (Wagner und Waldor, 2002), wie z. B. beim Erreger der Cholera (*Vibrio cholerae*), bei dem der Prophage das Cholera-Toxin produziert (Brüssow *et al.*, 2004).

Das Phagenom wurde zudem sequenziert, um zum einen mögliche Phagengene zu identifizieren, deren Genprodukte als Alternativen zum Phagen selbst zum Pflanzenschutz eingesetzt werden könnten, und zum anderen eine genaue Analyse des Genoms in Hinsicht auf Indizien für Gene, die für einen lysogenen Zyklus des Bakteriophagen sprechen könnten (z. B. Integrasen, Excisasen, Repressoren), durchzuführen.

1.1. Allgemeine Charakterisierung des Phagenoms von CMP1

1.1.1. Bestimmung der Größe und der Endstrukturen des Phagenoms

Um einen ersten Eindruck über die Größe des Genoms von CMP1 zu gewinnen, wurde die DNA aus Phagen isoliert, die vorher über einen CsCl-Gradienten gereinigt und konzentriert wurden. Da DNA-Fragmente ab einer gewissen Größe durch eine übliche Agarosegelelektrophorese nicht mehr aufgetrennt werden können, wurde zu diesem Zweck die Phagen-DNA durch eine Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt (Doškař *et al.*, 2000). Bei dieser Variante der Gelelektrophorese wird die Richtung des elektrischen Feldes in regelmäßigen zeitlichen Abständen geändert, um den größeren DNA-Fragmenten eine leichtere Ausrichtung und somit eine einfachere Wanderung im Agarosegel zu ermöglichen.

Die CMP1-DNA wurde zusammen mit 10 µl 25% Sucrose in TBE auf das Gel aufgetragen. Als Marker diente hier λ -DNA (Abb. 8).

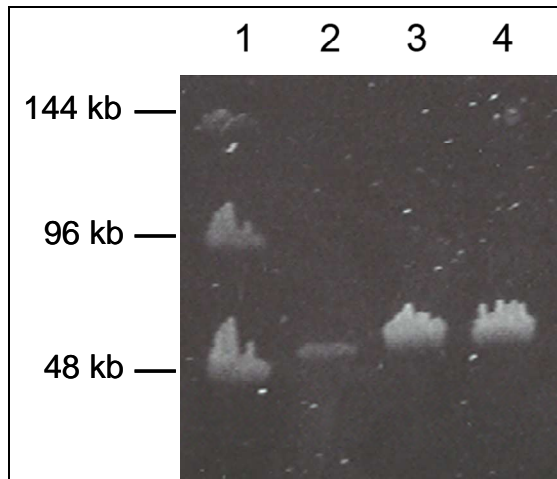


Abb. 8 PFGE zur Bestimmung der Genomgröße und zur Identifikation möglicher kohäsiver Enden (0,8% Agarosegel, 24 h Laufzeit, Pulswechsel 5/15 Sekunden bei 5 Volt). Spur 1: Konkatemere λ -DNA, Spur 2-4: CMP1-DNA.

Nach der Pulsfeldgelelektrophorese wurde die Größe des Genoms des *Clavibacter*-Phagen CMP1 im Vergleich mit den Konkatemeren des Phagen Lambda auf etwa 60 kb geschätzt. Während in Spur 1 mit der λ -DNA deutlich drei Banden, d. h. Monomere (48 kb), Dimere (96 kb) und Trimere (144 kb) der λ -DNA zu erkennen sind, gab es auch nach mehreren Versuchen mit CMP1-DNA nur eine Bande. Auch nach Behandlung der DNA durch Erhitzen auf 80°C und langsames Abkühlen konnte keine Konkatemerisierung nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen wurde, dass dieser Phage keine kohäsiven DNA-Enden besitzt.

Nach der Sequenzierung und der anschließenden Assemblierung der Einzelsequenzen wurde ein Sequenzierklon identifiziert, der ein Plasmid mit einem inserierten Endfragment des Phagen-genoms trägt. Die Sequenzierplasmide wurden durch Insertion gescherter Phagen-DNA über eine SmaI-Schnittstelle in den Vektor pSmart erzeugt. Aus deren Existenz lässt sich auch folgern, dass dieser Phage *blunt ends* als Endstruktur seiner DNA und keine freien Einzelstrangenden besitzt.

Um dies zu bestätigen, wurde CMP1-DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII hydrolysiert und die entstandenen Fragmente in einen mit HindIII und SmaI gespaltenen pUC18-Vektor inseriert. Nach Transformation von *E. coli* und einer Restriktionsanalyse der reisolierten Hybridplasmide konnten nur zwei verschiedene Plasmide nachgewiesen werden, deren Inserts durch Vergleiche mit der gesamten Nukleotidsequenz von CMP1 als die beiden Endfragmente identifiziert werden konnten. Die linear doppelsträngige CMP1-DNA hat also keine kohäsiven, sondern *blunt*-Enden.

1.1.2. Identifizierung der terminalen Redundanz und Überprüfung einer möglichen zyklischen Permutation der Phagen-DNA

Parallel zur Sequenzierung wurden weitere Experimente zur Identifizierung einer möglichen terminalen Redundanz durchgeführt. Bakteriophagen mit doppelsträngiger DNA haben im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen zur Verpackung ihrer DNA in die Kapside entwickelt. Beim Phagen λ wird die konkatemere DNA nach der Replikation an den genau definierten *cos sites* geschnitten, so dass stets identische Monomere der Phagen-DNA entstehen (Feiss and Widner, 1982). Die konkatemeren Replikationsintermediate des Phagen P1 werden an der so genannten *pac site* geschnitten und nach dem *headfull*-Mechanismus (King *et al.*, 1973) verpackt, d. h. es wird immer so viel DNA verpackt, bis die Kapside komplett gefüllt sind. Dabei kann mehr als ein vollständiges Genom verpackt werden. Durch diesen Mechanismus entstehen terminal-redundante Enden im Genom und eine zirkuläre Permutation des Genoms. Dabei entstehen keine identischen DNA-Moleküle wie beim Phagen λ , sondern viele unterschiedliche Monomere. Der Phage T7 hingegen nutzt keine *pac site* zur Verpackung seiner DNA in die Kapside. Seine DNA weist zwar auch terminal-redundante Enden auf, sein Genom ist aber nicht permutiert. Dies beruht auf der Art der Prozessierung der DNA-Konkatemere nach der bidirektionalen Replikation. Im Fall der T7-DNA werden Einzelstrangbrüche, so genannte *staggered nicks*, an den Rändern der terminalen Redundanz eingefügt. Anschließend wird neue DNA von den entstandenen freien 3'-Enden her synthetisiert, wodurch so die terminale Redundanz dupliziert wird und am Ende identische DNA-Monomere entstehen (Watson, 1972).

Terminal-redundante Enden dienen z. B. der Ringschlussbildung des Phagengenoms nach der Injektion über Rekombination oder wie bereits erwähnt der Konkatemerbildung. Damit dienen die terminalen Redundanzen zur Kompensation des Verlusts von terminalen Sequenzen bei der Replikation linearer Moleküle. Es ist bekannt, dass viele *Siphoviridae*-Phagen von Gram-negativen Wirten DNA mit terminal-redundanten Enden besitzen. Eine andere Strategie, um den Verlust von terminalen Sequenzen zu verhindern, ist eine kovalente Bindung von Proteinen am Ende der linearen DNA, die als Primer für die Replikation dienen. Dabei kommt es aufgrund der Nutzung dieser Proteine als Primer für die Replikation zu keinem Verlust von terminalen Sequenzen (Yoshikawa and Ito, 1981; Savilahti and Bamford, 1987). Dieser Mechanismus ist vor allem bei Bakteriophagen von *Bacillus subtilis* verbreitet (Geiduschek and Ito, 1982).

Die Mechanismen zur Replikation und Verpackung der DNA beim Phagen CMP1 waren zu Beginn dieser Arbeit unklar, für eine genaue Analyse dieser Mechanismen müssten weitere Untersuchungen angestellt werden.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die DNA des Phagen CMP1 keine *sticky ends*, sondern *blunt ends* besitzt. In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob sein Genom terminale Redundanzen aufweist und zirkulär permutiert ist.

Die mögliche zirkuläre Permutation wurde durch eine Zeit-abhängige Hydrolyse der Phagen-DNA mit der Exonuklease Bal31 (Loessner *et al.*, 2000) und einer anschließenden Hydrolyse mit einem Restriktionsenzym überprüft.

Durch die Bal31-Exonuklease wird die Phagen-DNA von den Enden her degradiert. Bei einer zyklischen Mutation sind diese Fragmente nicht identisch. Bei einem anschließenden Restriktionsverdau können in diesem Fall viele verschiedene Fragmente degradiert worden sein. Bei einer nicht zyklisch permutierten DNA sind die beiden Endfragmente immer identisch. Daher werden bei limitierter Inkubationsdauer zunächst nur diese von der Bal31-Exonuklease degradiert. Bei nicht permutierter DNA sollten also eindeutig zwei Fragmente identifiziert werden können, die die Enden der DNA darstellen.

Für diesen Versuch wurde CMP1-DNA unterschiedlich lange mit der Exonuklease Bal31 behandelt und anschließend mit dem Restriktionsenzym KpnI hydrolysiert. Danach wurden die Proben elektrophoretisch in einem 1% Agarosegel aufgetrennt (Abb. 9).

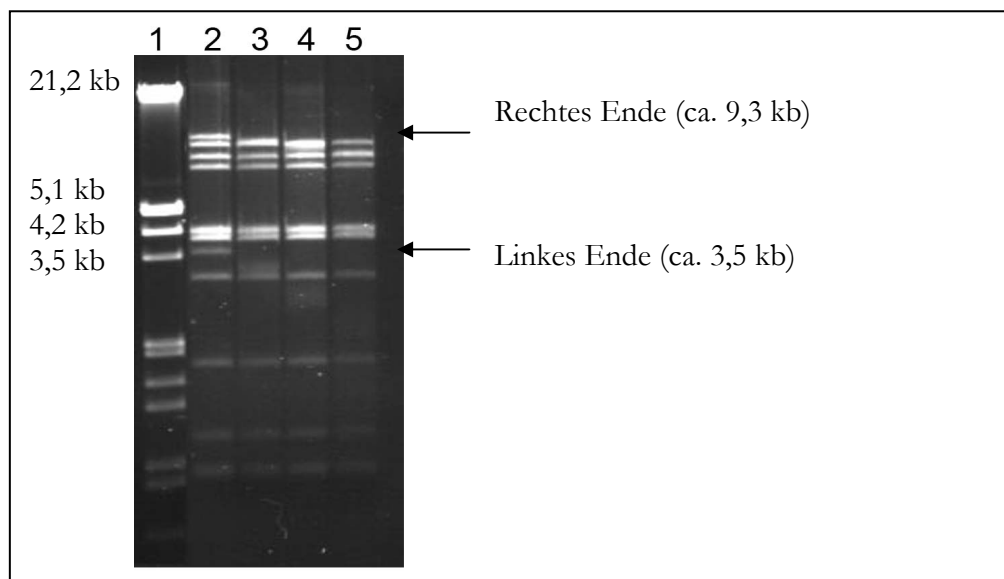


Abb. 9 Zeitabhängige Hydrolyse von CMP1-DNA mit Bal31-Exonuklease, anschließend Hydrolyse mit KpnI. Agarosegelelektrophorese, 1% Agarosegel. Spur 1: λ DNA, EcoRI/HindIII; Spur 2-5: CMP1-DNA, KpnI, Spur 2: vor Bal31-Hydrolyse, Spur 3: 15 min Bal31-Hydrolyse, Spur 4: 30 min Bal31-Hydrolyse, Spur 5: 45 min Bal31-Hydrolyse.

In Abb. 9 ist deutlich zu erkennen, dass die 9,3 kb und 3,5 kb KpnI-Fragmente mit längerer Behandlung mit der Exonuklease Bal31 zunehmend degradiert werden. Nach Fertigstellung der Genomsequenz wurden diese KpnI-Fragmente als Endfragmente identifiziert. Die anderen KpnI-DNA-Fragmente zeigten nach 45 minütiger Exonuklease-Behandlung keine Veränderung.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass alle DNA-Moleküle identische Enden besitzen und die DNA von CMP1 nicht zyklisch permutiert ist. Zudem beweist dies noch mal, dass die beiden Endfragmente wie in den vorhergehenden Versuchen korrekt bestimmt wurden.

Der Nachweis möglicherweise vorhandener terminaler Redundanzen sollte mittels Southern-Hybridisierung erfolgen.

Durch Vergleiche der Ergebnisse von virtuellen Restriktionsmustern der zirkulären CMP1-Karte mit experimentellen Restriktionsmustern wurde ein 1,6 kb XhoI-Fragment identifiziert, das vermutlich ein Endfragment der DNA repräsentiert. Dieses XhoI-Fragment wurde daher als Sonde gegen mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysierte CMP1-DNA bei einer Southern Hybridisierung eingesetzt. Durch eine Detektionsreaktion konnten hybride Bereiche der DNA-Proben mit der eingesetzten Sonde angefärbt und somit kenntlich gemacht werden (Abb. 10).

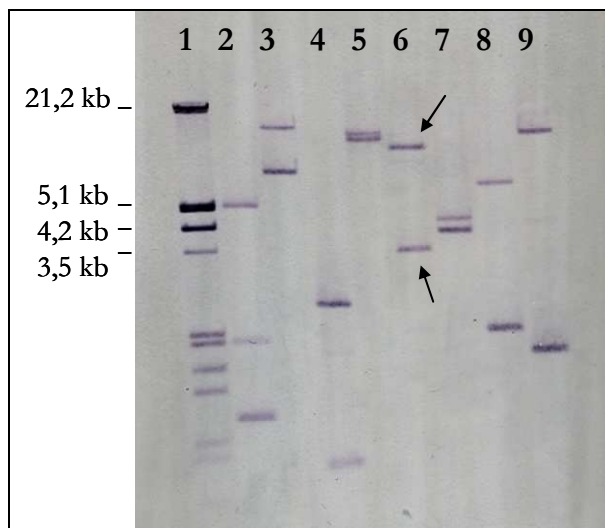


Abb. 10 Southern-Hybridisierung gespaltener CMP1-DNA mit Sonde aus einem CMP1-1,6 kb-XhoI-Fragment. Spur 1: λ DNA, EcoRI/HindIII, Spur 2-9: CMP1-DNA, hydrolysiert mit: Spur 2: ApaI, Spur 3: DraI, Spur 4: EcoRI, Spur 5: HindIII, Spur 6: KpnI, Spur 7: PvuII, Spur 8: SalI, Spur 9: XhoI.

Bei den verschiedenen Ansätzen konnten jeweils zwei Banden identifiziert werden. Das Auftreten zweier Banden spricht für das Vorhandensein homologer Bereiche im Genom, insofern keine Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme in dem XhoI-Fragment vorliegen. Durch die geringe Größe des Fragments ist dies aber unwahrscheinlich. Nach einem Vergleich mit der DNA-Sequenz konnten die nachgewiesenen Banden den durch die Hydrolyse mit dem jeweiligen Restriktionsenzym entstandenen Fragmenten zugeordnet werden, die jeweils die beiden Enden des Genoms beinhalten. Die in Spur 6 auftretenden Banden (Abb. 10) korrelieren in ihrer Größe z. B. mit den DNA-Fragmenten, die bei der Hydrolyse mit der Bal31-Exonuklease degradiert werden (Abb. 9).

Durch diesen Versuch konnte eine terminale Redundanz innerhalb des CMP1-Genoms eindeutig nachgewiesen werden. Das Genom ist folglich terminal-redundant, aber nicht zirkulär permutiert. Zuletzt sollte noch die tatsächliche Länge der terminalen Redundanz der Phagen-DNA bestimmt werden. Die beiden DNA-Enden konnten wie bereits erwähnt kloniert werden, so dass durch Sequenzierung dieser Hybridplasmide die terminale Redundanz bestimmt werden konnte. Parallel sollten die genaue Länge der terminalen Redundanz über die RACE (Rapid amplification of cDNA ends)-Technik erfolgen. Diese wird benutzt, um die komplette Länge von RNA-Transkripten aus Zellen zu erhalten. In diesem Fall wurde sie aber für die genaue Bestimmung von DNA-Enden eingesetzt. Dazu wurden die DNA-Enden durch eine terminale Transferase (RACE Kit, Roche) mit einem polyA-Schwanz versehen. Anschließend wurde mit dem Primer 5'-CAC AGA GTA TGA GCG AGA-3' und dem Oligo d(T)-Ankerprimer 5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT-3' ein ungefähr 1,1 kb großes PCR-Produkt amplifiziert, das anschließend in den pUC18-Vektor inseriert und dann sequenziert wurde. Nach Auswertung und Vergleich der erhaltenen DNA-Sequenz mit dem gesamten CMP1-Genom konnte die terminale Redundanz auf 791 bp festgelegt werden.

Nachdem die terminale Redundanz der Phagen-DNA genau bestimmt wurde, sollte zuletzt die Frage geklärt werden, ob diese für eine mögliche Konkatemerbildung bei der Replikation oder für einen Ringschluss des Phagen-genoms nach der Injektion in die Wirtszelle genutzt wird, um z. B. die DNA vor der Degradation durch bakterielle Exonukleasen zu schützen. Zu diesem Zweck wurden *Cmm3123*-Kulturen mit dem Phagen CMP1 infiziert. Nach 2, 3 und 4 h nach Infektion wurde die Gesamt-DNA von *Cmm3123* isoliert und mit Restriktionsenzymen hydrolysiert (Abb. 11).

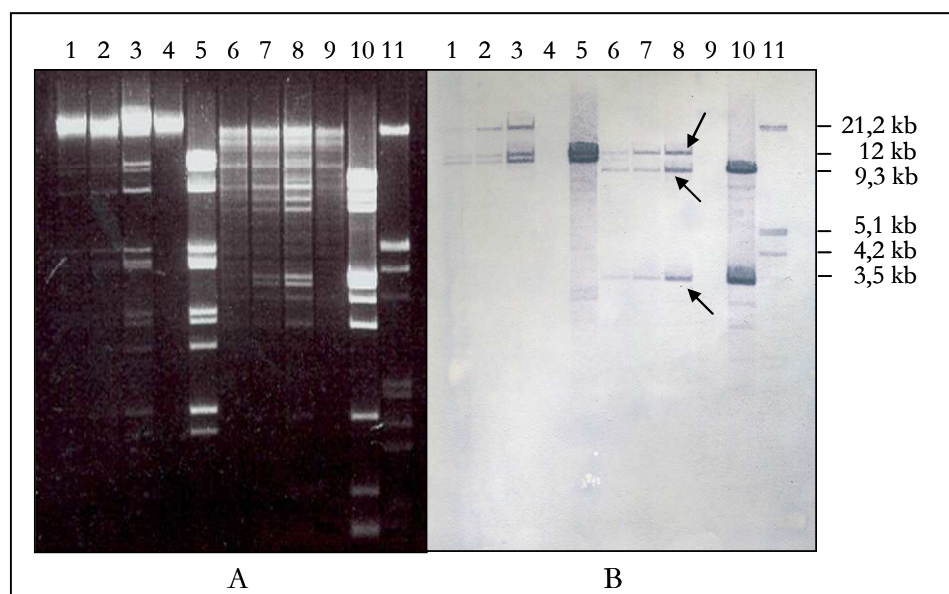


Abb. 11 Analyse der Replikationsintermediate von CMP1 in *Cmm* nach Infektion (A Agarosegel, B Southern-Hybridisierung, CMP1-1,6 kb-XhoI-Fragment als Sonde). Agarosegelelektrophorese, 1%

Agarosegel. Spur 1-5 HindIII hydrolysiert, Spur 6-10 KpnI hydrolysiert, Spur 1: Gesamt-DNA (*Cmm3123*, 2h nach φ -Inf.), Spur 2: Gesamt-DNA (*Cmm3123*, 3h nach φ -Inf.), Spur 3: Gesamt-DNA (*Cmm3123*, 4h nach φ -Inf.), HindIII, Spur 4: Gesamt-DNA (*Cmm3123*), Spur 5: CMP1-DNA, Spur 6: Gesamt-DNA (*Cmm3123*, 2h nach φ -Inf.), Spur 7: Gesamt-DNA (*Cmm3123*, 3h nach φ -Inf.), Spur 8: Gesamt-DNA (*Cmm3123*, 4h nach φ -Inf.), Spur 9: Gesamt-DNA (*Cmm3123*), Spur 10: CMP1-DNA, Spur 11: λ DNA, EcoRI/HindIII.

In Abb. 11 ist deutlich zu erkennen, dass die Menge der neusynthetisierten DNA des Phagen in den Wirtszellen nach der Infektion im Laufe der Zeit zunimmt (Spuren 1-3 bzw. 6-8). Sollte es zu einem Ringschluss des Genoms oder einer Konkatemerbildung kommen, so müssten nach einer Hybridisierung der hydrolysierten CMP1-DNA gegen die bereits erwähnte Sonde, 1,6 kb-XhoI-Endfragment des CMP1-Genoms, eine Bande detektiert werden, die den Zusammenschluss der beiden Enden repräsentiert (Abb. 12).

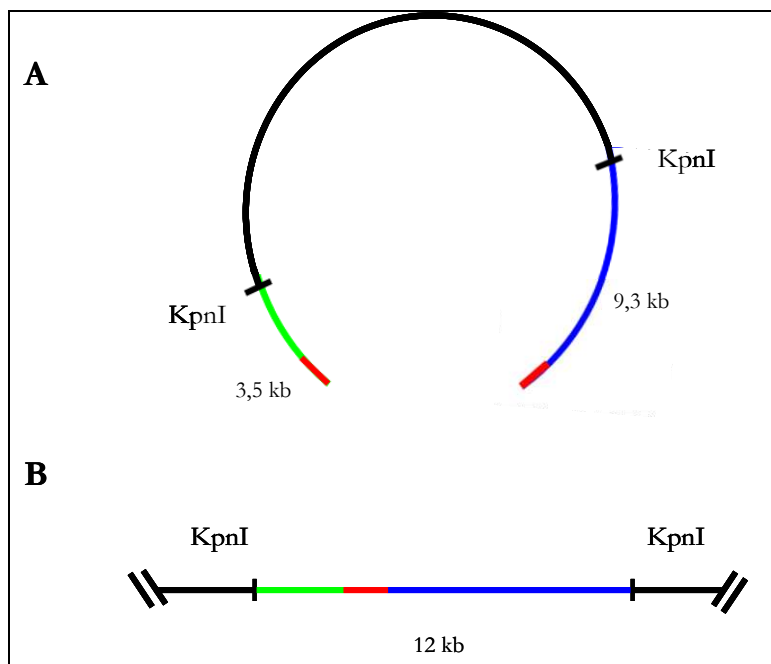


Abb. 12 Schematische Darstellung eines möglichen Ringschlusses des CMP1-Genoms über die terminalen Redundanzen (A, lineares DNA-Molekül; B, Bereich der terminalen Redundanz nach Ringschluss) Terminale Redundanzen sind rot markiert.

In den Spuren 6-8 lassen sich deutlich zwei Banden (9,3 kb und 3,5 kb) erkennen, die wie bereits durch die Bal31-Hydrolyse bestätigt die beiden einzelnen Endfragmente von CMP1 darstellen, die dieselbe Größe wie die auch in Abb. 9 ermittelten Endfragmente haben. Ein weiteres Fragment hat die Größe (ca. 12 kb) der vermutlich hier über die terminalen Redundanzen verbundenen Endfragmente und bestätigt so eine Ringbildung oder Konkatemerisierung des

CMP1-Genoms mit Hilfe der terminalen Redundanzen. Eine Unterscheidung von zirkulären oder konkatemeren Intermediaten ist mit diesen Experimenten nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Genom des *Clavibacter*-Phagen CMP1 *blunt ends* als Endstrukturen besitzt. Zudem konnten terminal redundante Bereiche von je 791 bp identifiziert werden, über die während der Replikation zirkuläre oder konkatemere Intermediate gebildet werden. Eine zyklische Permutation konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

1.2. Bioinformatische Analyse der Genomsequenz von CMP1

Die Bestimmung der Genomsequenz des Bakteriophagen CMP1 wurde im IIT der Universität Bielefeld durchgeführt. Die genomische DNA wurde zunächst geschert (Hydroshear, GeneMachines) und die entstandenen Fragmente anschließend in den mit SmaI hydrolysierten Vektor pSMART inseriert. Die so entstandenen Insertionen in 300 Hybridplasmiden wurden von beiden Seiten mit Standardprimern sequenziert. Eine einzelne Nukleotidsequenz hatte dabei eine durchschnittliche Länge von ca. 600 bp, was zu einer ca. dreifachen Abdeckung des Genoms mit zusammengefügteten Einzelsequenzen führt. Die endgültige Sequenz ergab eine Genomlänge von 58652 bp (Accession-Nummer GQ 241246) inklusive der terminal-redundanten Enden von 791 bp (ca. 1,35% der Gesamtsequenz) (Wittmann *et al.*, 2011). Der durchschnittliche GC-Gehalt von 57% ist signifikant niedriger als der des Chromosoms vom Wirtsbakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (72,66%) (Gartemann *et al.*, 2008). Ein geringerer GC-Gehalt in der DNA von Phagen im Vergleich mit ihren Wirtsbakterien ist ein weit verbreitetes Phänomen, das z. B. auch bei *E. coli*-Phagen wie T4 oder JS98 auftritt (Zuber *et al.*, 2007). Es wurde zudem bereits beschrieben, dass Phagengenome durchschnittlich einen 4% höheren AT-Gehalt als ihre Wirtsbakterien besitzen (Rocha und Danchin, 2002). Größere Unterschiede zum GC-Gehalt der Wirte gibt es bei verschiedenen Phagentypen, d. h. z. B. bei dsDNA- oder ssDNA-Phagen.

Die Annotation möglicher ORFs (*open reading frames*) erfolgte nach mehreren Kriterien. Es wurden dabei die Startcodons ATG, GTG und TTG genutzt und die Analyse auf ORFs beschränkt, deren Genprodukte eine minimale Größe von 100 Aminosäuren aufwiesen. Zudem wurde auf mögliche Shine Dalgarno-Sequenzen (Shine und Dalgarno, 1975) stromaufwärts der untersuchten ORFs geachtet. Mit Hilfe dieser Kriterien wurden letztendlich 74 mögliche *open reading frames* identifiziert, von denen 60 mit einem ATG-, 12 mit einem GTG- und 2 mit einem TTG-Startcodon beginnen. Insgesamt werden durch die ermittelten ORFs 88,6% des Genoms durch codierende Regionen abgedeckt. Bei Bakteriophagen überlappen ORFs häufig mit wenigen Codons, so dass zwischen einzelnen ORFs kaum Lücken entstehen. Nach der ersten Analyse der Genomsequenz wurde anschließend versucht, auftretende Lücken zwischen bereits annotierten ORFs durch kleinere, bisher nicht berücksichtigte ORFs zu schließen.

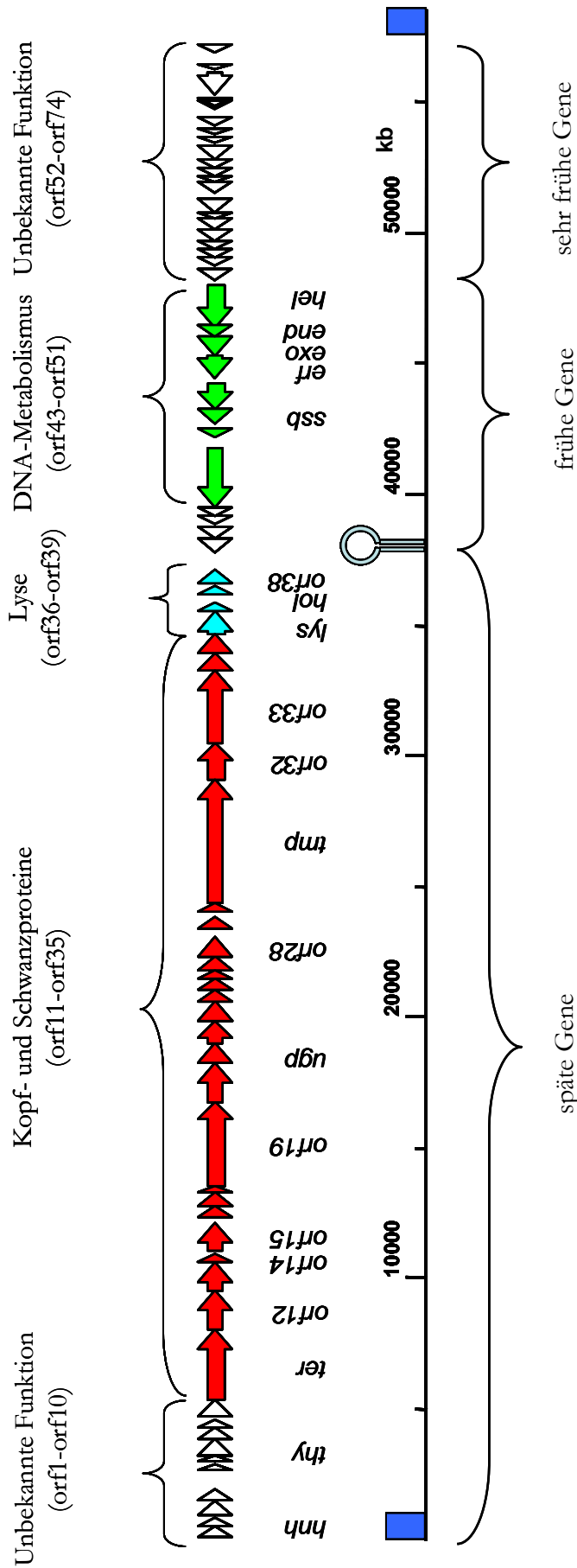


Abb. 13 Schematische Darstellung der Genomstruktur des Bakteriophagen CMP1. Die eingezeichneten Pfeile repräsentieren die ermittelten *open reading frames* und zeigen die Richtung der Transkription an. Die beiden blauen Boxen stellen die terminalen Redundanzen dar. Funktionelle Cluster (z. B. Lyse, Strukturproteine, etc.) werden durch gleiche Farben gekennzeichnet. Der eingezeichnete *Stem-loop* weist die strukturellen Aspekte eines bidirektional aktiven, rho-unabhängigen Terminators auf.

Die ORFs sind in zwei großen Genclustern organisiert, die jeweils auf verschiedenen DNA-Strängen lokalisiert sind. Die Transkription dieser beiden Gencluster beginnt an den beiden Enden des Genoms und läuft aufeinander zu (Abb. 13). Zwischen diesen beiden großen Clustern konnte eine relativ starke Sekundärstruktur (-23,2 kcal) innerhalb der DNA-Sequenz in Form einer Haarnadelstruktur vorhergesagt werden. Diese Struktur weist einige Aspekte eines bidirektional aktiven, rho-unabhängigen Terminators auf, der die Transkription der beiden Cluster hier vermutlich enden lässt (Wilson und von Hippel, 1995). Zudem konnten noch weitere Sekundärstrukturen innerhalb der Sequenz ermittelt werden, denen aber keine eindeutige terminatorische Funktion zugewiesen werden konnten.

Mögliche Promotorsequenzen für die Expression von CMP1-Genen konnten im Genom nicht identifiziert werden. Auch über die möglichen Eigenschaften einer solchen Sequenz im Wirt *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ist bislang nichts bekannt. Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen für Promotoren in *E. coli* waren nicht vorhanden. Viele Bakteriophagen besitzen Gene für zusätzliche tRNAs, die im Phagen häufig, aber im Wirt eher selten auftreten. In diesem Fall werden die tRNA-Gene genutzt, um eine optimale Translation der Phagengene zu gewährleisten (Bailly-Bechet *et al.*, 2007). Es wurde zudem beschrieben, dass virulente Phagen mehr Gene für tRNAs besitzen als temperente Phagen. Es wird vermutet, dass virulente Phagen schneller replizieren und daher eine sehr effiziente Translation benötigen. Dies würde sich auch auf die Latenzzeit auswirken und diese verkürzen, was vorteilhaft für den Phagen wäre (de Paepe and Taddei, 2006). Im Genom von CMP1 konnten jedoch keine Gene für tRNAs identifiziert werden.

1.3. Analyse möglicher Genprodukte

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von allen ORFs wurden für die Annotation und funktionelle Einordnung der Gene von CMP1 mit der Datenbank GenBank mittels PSI-BLAST verglichen (Tabelle 8, s. Anhang). Die Tabelle zeigt die besten Übereinstimmungen der ORFs von CMP1 mit anderen Sequenzen aus der Datenbank, die hauptsächlich auf die Gruppe „Caudovirales“ limitiert wurde. Dabei gab es aber auch Ausnahmen, wenn beispielsweise höhere Übereinstimmungen bei Phagen in der gesamten Datenbank gefunden wurden. Da CMP1 der erste Phage der Gattung *Clavibacter* ist, dessen Genom komplett sequenziert wurde, konnten nur wenige, teils sehr schwache Ähnlichkeiten zu Genprodukten anderer Bakteriophagen ausgemacht werden. Die meisten Übereinstimmungen zu bekannten Genprodukten gab es bei Vergleichen mit Sequenzen von Mycobakteriophagen, die die größte Gruppe der Phagen mit hohem GC-Gehalt bilden. Von dieser Gruppe existieren bereits 69 vollständige Genomsequenzen in Datenbanken, die meisten resultieren allerdings aus Genomprojekten und repräsentieren zumeist

Prophagen im Genom des Wirtsbakteriums. Zudem sind diese Phagengenome auch nicht detailliert annotiert, da mit diesen nur strukturelle Vergleiche der Phagengenome, aber keine direkten Funktionsanalysen der einzelnen Gene durchgeführt wurden. Generell konnten nur rund 20% der Mycophagen-Genprodukte eindeutige Funktionen zugewiesen werden (Hatfull, 2010).

Insgesamt wiesen nur 13 ORFs von CMP1 konservierte Motive in ihrer Aminosäuresequenz und signifikante Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion auf. Es ist bekannt, dass nur wenige Phagenprodukte Homologien in Datenbanken aufweisen (Kwan *et al.*, 2005). Im Genom des Phagen CMP1 wies die abgeleitete Aminosäuresequenz von *orf19* die höchste Homologie zu einem bereits bekannten Protein, in diesem Fall einer SGNH-Hydrolase, auf (Identities= 81/127 (63%)). Dieser Wert zeigt, wie schwach die Übereinstimmungen mit Sequenzen anderer Phagen waren und wie schwer dementsprechend die genaue Annotation des Genoms war.

Trotz weniger funktioneller Zuordnungen konnte das Genom nach Vergleichen mit Datenbanken in verschiedene Gencluster, die für verschiedene Bereiche wie DNA-Metabolismus, Kopf- und Schwanzproteine und Lyse codieren, unterteilt werden.

1.3.1. Genprodukte aus der „frühen Region“

Gene aus der „frühen Region“ eines Phagengenoms codieren meist für Proteine, die für die Etablierung des Phagen im Wirt sorgen. Bei der Etablierung des Phagen stehen vor allem der *shutoff* und die Umfunktionierung des Wirtsstoffwechsels für die Phagenproduktion im Vordergrund. Dabei spielen die Abschaltung des bakteriellen Restriktionssystems, der Schutz freier DNA-Enden des Phagengenoms, der Abbau der Wirts-DNA zur Synthese neuer Phagen-DNA und die Modifikation des Transkriptionssystems zur bevorzugten Transkription des Phagengenoms eine große Rolle.

Für den Phagen T7 wurde bereits ein Anti-Restriktionssystem beschrieben, durch das die Aktivität des bakteriellen Restriktionsenzym gehemmt wird (Krüger *et al.*, 1977; Walkinshaw *et al.*, 2002). Dabei verhindert ein Phagen-kodiertes Protein die Bindung des Restriktionsenzym an die Phagen-DNA und schützt diese damit vor der Degradation. Der Phage T4 schützt die freien Enden seiner DNA bei der Infektion durch ein Protein, das an diese bindet und sie so vor bakteriellen Exonukleasen schützt (Silverstein und Goldberg, 1976).

Für die Abschaltung des Wirtsstoffwechsels nutzt z. B. der Phage T7 ein Protein, das an die RNA-Polymerase von *E. coli* bindet und deren Interaktion mit der Wirts-DNA unterbindet. Zusätzlich spielt auch eine Protein-Kinase zur Modifikation der RNA-Polymerase eine entscheidende Rolle (Hesselbach and Nakada, 1977). Der Phage T4 beendet mit Hilfe eigener Proteine z. B. die Transkription der Wirtsgene durch ADP-Ribosylierung der RNA-Polymerase

und beeinflusst so den Wertsstoffwechsel (Goldfarb and Palm, 1981, Mailhammer *et al.*, 1975). Der Phage SPO1 trägt ein Gen für einen eigenen Sigma-Faktor, der nach Expression den Sigma-Faktor des Wirts an der RNA-Polymerase ersetzt und die Spezifität der Promotorekennung damit so verändert, dass bevorzugt Phagen-Gene transkribiert werden (Costanzo and Pero, 1984). Um eine erfolgreiche Etablierung des Phagen im Wirtsorganismus zu gewährleisten, sind aber viele verschiedene Mechanismen nötig.

Die Gene der „sehr frühen Region“ des Phagen CMP1 liegen im Bereich von Base 47235 an bis zum rechten Ende des Phagengenoms und beinhalten *orf52* bis *orf74*. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der in diesem Bereich liegenden ORFs konnten nicht weiter charakterisiert werden, da deren Vergleich mit der Datenbank keine Ähnlichkeiten oder Übereinstimmungen zu bereits bekannten Genen oder funktionellen Domänen erbrachten. Die 22 möglichen Genprodukte dieser Region sind allesamt sehr klein, 13 sind weniger als 100 Aminosäuren lang und 9 haben eine Länge zwischen 100 und 200 Aminosäuren.

Die Gene der folgenden Region, die als „frühe Region“ bezeichnet wurde (*orf40-orf51*), codieren für Proteine, die vermutlich eine Rolle im DNA-Metabolismus des Phagen CMP1 spielen. *Orf51* ist der erste *open reading frame*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz (Gp51) eine Homologie zu einem Protein mit bekannter Funktion offenbart. Das hypothetische Protein Gp51 besitzt eine konservierte Domäne für eine Nukleosid-Triphosphat-Hydrolase, die aufgrund eines P-loops in die Superfamilie der DEAD-ähnlichen Helikasen eingeordnet werden kann (Tanner *et al.*, 2003). Diese sind an der ATP-abhängigen Entwindung von DNA und RNA beteiligt.

Die stromaufwärts folgenden ORFs *orf50* und *orf49* codieren für zwei Nukleasen, die ihrerseits wahrscheinlich eine Rolle in der Rekombination und Replikation des Phagengenoms spielen (Kerr and Sadowski, 1975; Miller, 1975). Das Genprodukt von *orf50* besitzt eine Domäne mit einer schwachen Homologie zu einer HNHc-Endonuklease. Diese kann auch in vielen anderen Proteinen identifiziert werden, die an DNA binden oder diese hydrolysieren (Gorbalenya, 1994). Zudem weist das abgeleitete Protein eine hohe Dichte an positiven Ladungen an der Oberfläche und eine hohe Polarität (IP=10,1) auf, die auf eine Interaktion mit negativ geladener DNA hinweisen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass diese Region tatsächlich Proteine des DNA-Metabolismus codiert.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von *orf49* mit der Datenbank ließ eine konservierte Domäne für eine DnaQ-ähnliche Exonuklease erkennen. Exonukleasen dieser Art katalysieren das Entfernen von Nukleosidmonophosphaten an DNA-Enden in 3'-5' Richtung. Sie enthalten vier konservierte saure Aminosäuren, die um das aktive Zentrum gruppiert sind und als Liganden für zwei Metallionen fungieren, die für die Katalyse notwendig sind. Die meisten Exonukleasen dieser Art repräsentieren die *proofreading*-Untereinheit (Epsilon) der bakteriellen DNA-Polymerase

III, die das Hauptenzym für die Replikation darstellt. Beim Phagen T7 sind Endo- und Exonukleasen z. B. auch für die Bildung von Konkatemeren notwendig (Serwer *et al.*, 1987).

Die Aminosäuresequenz von *orf48* zeigte Übereinstimmungen zu einem Protein eines möglichen Prophagen im Genom von *Sodalis glossinidius* in Form einer konservierten Domäne für ein Erf-ähnliches Einzelstrang-Bindeprotein. Erf-Proteine spielen eine Rolle in der Rekombination einiger Phagengenome und in der Zirkularisierung eines einzelnen Phagengenoms mit Hilfe von redundanten Enden (Poteete and Fenton, 1983).

Das Genprodukt von *orf46* wies schwache Ähnlichkeiten (identities= 52/128 (40%)) zu einem Einzelstrang-Bindeprotein (Ssb) auf (Meyer and Laine, 1990). Obwohl seine Aminosäuresequenz keine konservierte Domäne beinhaltete, konnten trotzdem andere charakteristische Merkmale anderer Ssb-Proteine identifiziert werden (Lohman and Ferrari, 1994). So wurden ein zentraler Tryptophan-Rest und eine konservierte Abfolge von Tryptophan, Histidin und Arginin (WHR), die an der Bindung von einzelsträngiger DNA beteiligt sind, durch die Aminosäuren an den Positionen 75 und 77-79 ermittelt. Zudem ist der C-terminale Teil des Genprodukts von *orf46* reich an Prolin und Glycin und besitzt zum Ende hin einige saure Aminosäuren. Dieser charakteristische Teil eines Ssb-Proteins spielt vermutlich eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen, die an der Rekombination oder Replikation beteiligt sind.

Obwohl die meisten Genprodukte der Region zwischen *orf51* und *orf40* funktionell eine Rolle bei der Replikation des Bakteriophagen CMP1 spielen könnten, konnte bislang kein „echtes“ Replikationsprotein, z. B. eine Primase oder eine DNA-Polymerase identifiziert werden.

Im Genom von CMP1 gibt es außerhalb der frühen Region noch zwei weitere Gene, die für Proteine codieren, die im DNA-Metabolismus angesiedelt sind. Diese befinden sich beide am anderen Ende des Genoms stromaufwärts des Gens für eine Terminase-Untereinheit und werden in entgegengesetzter Richtung zu den bereits beschriebenen Genen transkribiert. Nach der PSI-BLAST-Analyse codiert *orf2* vermutlich eine HNHc Endonuklease (pfam01844) und *orf7* zeigt in seiner Aminosäuresequenz eine konservierte Region (AS 88-98 RHRX₇₋₈S), die charakteristisch für eine Flavin-abhängige Thymidylat-Synthase ThyX (cl03630) ist (Gorbalenya, 1994; Myllykallio *et al.*, 2002). Die höchste Ähnlichkeit zu ThyX von CMP1 (identities= 111/259 (42%)) zeigte die Thymidylat-Synthase ThyX aus dem Genom des CMP1-Wirts *Cmm* (NCPPB382).

Eine ähnliche Lokalisation dieser beiden Gene konnte auch im Genom des Bakteriophagen P1201 von *Corynebacterium glutamicum* gefunden werden (Chen *et al.*, 2008). Das Gen für die Thymidylat-Synthase liegt hier auch wenige Gene stromaufwärts des Gens für die große Terminase-Untereinheit und auch ein Gen für eine HNHc-Endonuklease konnte in dieser Region identifiziert werden. Das P1201-Genom ist wie bei CMP1 in zwei große Gencluster mit unterschiedlichen Transkriptionsrichtungen aufgeteilt und weist also eine ähnliche Organisation

wie das von CMP1 auf. Die Ähnlichkeiten könnten auf einer Verwandtschaft der beiden Phagen beruhen, die möglicherweise durch die nahe Verwandtschaft der Wirtsbakterien zu erklären ist.

1.3.2. Proteine zur Verpackung des Genoms und Strukturproteine

Nach der Etablierung des Phagen im Wirtsbakterium und dem Beginn der Replikation des Phagengenoms mit Hilfe der Genprodukte der frühen Region folgt die Transkription der „späten Gene“. Diese umfassen Gene für Strukturproteine der Phagenhülle, d. h. für Kopf und Schwanz des Bakteriophagen, und für Proteine, die für die Verpackung des Genoms in die Phagenköpfe verantwortlich sind. Diese Gene befinden sich alle in derselben Orientierung im Bereich zwischen *orf1* bis *orf35*.

In einigen Phagen liegen direkt vor den Genclustern für die Strukturproteine die Gene, die für Proteine für die DNA-Verpackung codieren. Dazu gehören die Terminasen, die allgemein eine hetero-dimere Struktur besitzen. Sie bestehen aus einer kleineren Untereinheit (TerS), die die DNA bindet, und einer großen Untereinheit (TerL) mit einer N-terminalen ATPase-Domäne und einer C-terminalen Endonuklease-Funktion (Rao and Feiss, 2008; Ponchon *et al.*, 2006), die für die Translokation der DNA in die Kapside und die Hydrolyse, z. B. nach *headful*-Mechanismus oder an *pac sites* oder *cos sites* verantwortlich ist.

Auch beim Phagen CMP1 beginnt die „späte Region“ mit einem Gen, das vermutlich die große Untereinheit der Terminase codiert. Die Aminosäuresequenz von *orf11* hat eine Länge von 872 Aminosäuren mit einem errechneten molekularen Gewicht von 97,8 kDa. Die Sequenz weist nach der PSI-BLAST-Analyse zwar nur schwache Übereinstimmungen mit anderen Terminasen (identities=188/366 (51%)) auf, offenbart aber zwei teilweise konservierte Domänen, eine N-terminale Domäne für eine Endonuklease und eine C-terminale Domäne für eine Terminase. Im N-terminalen Bereich konnten zudem eine WalkerA- (AS 18-20) und eine WalkerB-Box (AS 230-235) identifiziert werden, die auf das Vorhandensein einer ATPase-Domäne in dieser Region hinweisen (Walker *et al.*, 1982). Zusätzlich konnten für diesen Bereich der Sequenz Ähnlichkeiten zu verschiedenen Helikasen ermittelt werden, die für die Replikation benötigt werden.

Während die große Untereinheit der Terminase also relativ eindeutig identifiziert wurde, konnte bislang kein Gen für eine putative kleine Untereinheit ermittelt werden. Dies ist auch in vielen anderen Phagengenomen der Fall. Das lässt darauf schließen, dass diese Untereinheit in ihrer Aminosäuresequenz vermutlich keine konservierten Bereiche enthält und sie deshalb selten durch Vergleiche mit Datenbanken identifiziert wird, oder dass in diesen Fällen für die Verpackung der Phagen-DNA nur eine Terminase-Untereinheit benötigt wird.

Das Gen für die große Untereinheit der Terminase liegt oft direkt vor dem Gen für das Portal-Protein, so dass angenommen werden kann, dass *orf12* für ein Portal-Protein codiert. Oft basiert

die Annotation eines Gens für ein Portal-Protein nur auf dieser Annahme und auf Vergleichen mit anderen Phagengenomen, ohne dabei die Korrektheit dieser Annahme experimentell nachzuweisen. Portal-Proteine bilden eine ringförmige Struktur mit einer zwölffachen Symmetrie (Valpuesta und Carracosa, 1994) und dienen u. a. als Startpunkt oder Initiator für die Kapsid-Anordnung und als Verbindung zwischen Kapsid und Schwanzproteinen. Die wichtigste Funktion hat dieses Protein aber bei der Verpackung der Phagen-DNA, welche durch das Zentrum dieses Proteins in einem ATP-abhängigen Prozess in das Innere des Kapsids gelangt (Grimes *et al.*, 2002).

Diese Art von Proteinen ist nicht stark konserviert und variiert auch in seiner Größe zwischen 40 und 90 kDa. Das Genprodukt von *orf12* hat eine Länge von 502 Aminosäuren und somit ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Einen Hinweis auf die mögliche Funktion dieses Proteins liefert das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit zu *orf12*. Xcel_0541 (547 aa, identity= 116/392; 29%) ist ein mögliches Protein eines Prophagen im Wirt *Xylanimonas cellulositytica* DSM 15894 und wurde auch hier als mögliches Portal-Protein annotiert.

Ein Gen, dessen Genprodukt eine eindeutige Funktion zugeteilt werden konnte, ist *orf31*. Es repräsentiert das Gen für das *Tail Tape Measure*-Protein (Tmp) von CMP1, das die Schwanzlänge des Phagen definiert. Es hat eine Länge von 1551 Aminosäuren und ist damit das größte Protein des Phagen CMP1. Tmp hat wie *Tail Tape Measure*-Proteine anderer Phagen auch eine konservierte Region im Zentrum des Proteins (identities=208/421 (49%)). Setzt man eine Länge des Phagenschwanzes von 1,5 Å pro Aminosäurerest voraus (Katsura and Hendrix, 1984), so erhält man einen Phagenschwanz mit der kalkulierten Länge von 232 nm, was wiederum gut mit der bei der Elektronenmikroskopie ermittelten Schwanzlänge korreliert (ca. 245 nm; Echandi and Sun, 1973). Nach einer Analyse der Aminosäuresequenz mit dem TMHMM-Server (Krogh *et al.*, 2001) zur Vorhersage möglicher Transmembrandomänen konnten vier Transmembranhelices im Zentrum des Proteins vorhergesagt werden. Auch bei Tmps anderer Phagen konnten bereits konservierte Transmembranhelices identifiziert werden, deren Anzahl aber sehr variabel ist. Sie könnten am Infektionsvorgang beteiligt sein, indem sie dem Phagenschwanz das Eintauchen in die Cytoplasmamembran des Wirtsbakteriums erleichtern. *Tape Tail Measure*-Proteine anderer Phagen von Gram-positiven Wirten zeigen zudem häufig eine hydrolytische Aktivität gegenüber dem jeweiligen Peptidoglykan des Wirtsbakteriums (Piuri and Hatfull, 2006). Da Gram-positive Bakterien eine wesentliche dickere Peptidoglykanschicht als Gram-negative Bakterien besitzen, ist nach der Adsorption der Phagen an den Rezeptor die Injektion der Phagen-DNA in die Zelle so deutlich erschwert. Eine enzymatische Aktivität innerhalb des Phagenschwanzes bietet dem Phagen so eine Möglichkeit, diese Barriere besser zu überwinden. Die Analyse der

Aminosäuresequenz von Tmp erbrachte aber kein Indiz auf eine mögliche hydrolytische Aktivität des Proteins.

In der Region, die die Gene für die Strukturproteine trägt, fallen noch zwei Gene besonders auf, da die von ihnen codierten Proteine möglicherweise eine enzymatische Funktion besitzen. Das Genprodukt von *orf19* hat eine konservierte Domäne (identities= 81/127 (63%)) für eine putative SGNH-Hydrolase (Akoh *et al.*, 2004) und das Genprodukt von *orf21* besitzt eine Domäne für eine mögliche Glycerophosphodiesterase (identities=38/112 (33%)). Die Funktion dieser Proteine ist, vor allem auch durch die Lokalisation ihrer Gene im Genom, nicht ganz klar, sie könnten allerdings Komponenten des Phagenschwanzes sein, die an der Adsorption oder Injektion der Phagen-DNA beteiligt sind.

Da in den Aminosäuresequenzen von Kopf- und Schwanzproteinen von Phagen nur selten konservierte Bereiche zu ermitteln sind und so auch beim Vergleich der Sequenzen von CMP1 mit den bestehenden Datenbanken nur schwache Übereinstimmungen mit anderen Phagenproteinen auftraten, wurden die strukturellen Proteine mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse nach elektrophoretischer Auftrennung identifiziert (Abb. 14).

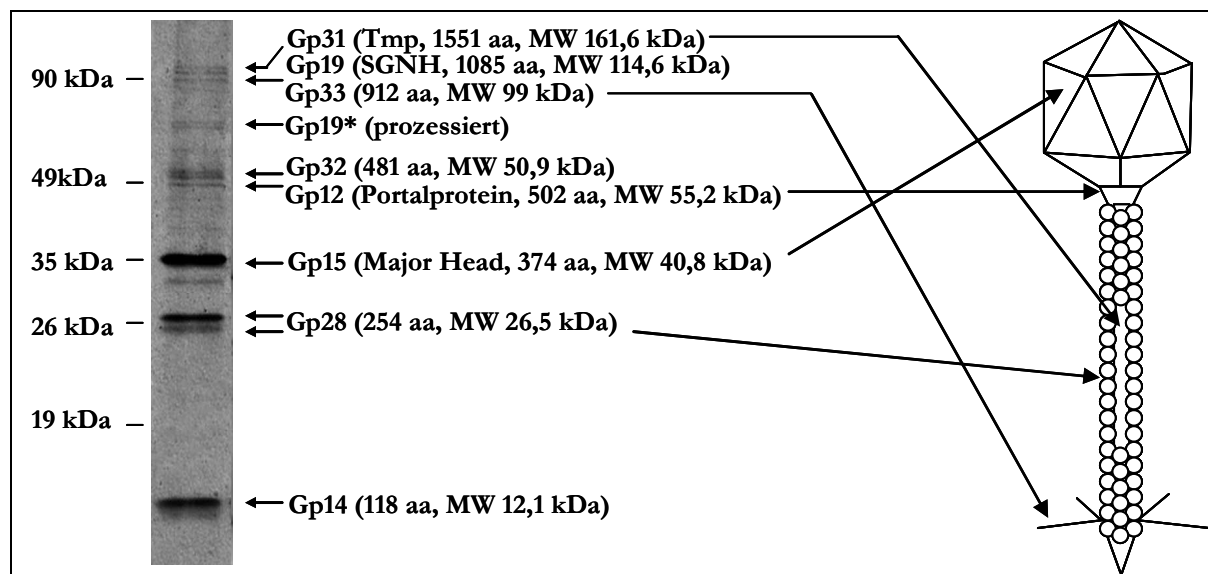


Abb. 14 SDS-PAGE Analyse der Strukturproteine von CMP1. Die mit MalDI-TOF Analyse identifizierten Proteine wurden mit Pfeilen markiert.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die einzelnen Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, gewaschen und anschließend tryptisch verdaut. Die dadurch entstandenen Peptide wurden dann massenspektrometrisch analysiert und mit den Daten in der MASCOT-Datenbank verglichen. Auf diese Weise konnten acht Proteinbanden von CMP1 eindeutig Proteinen der „späten Region“ zugewiesen werden. Unter ihnen sind das *Tape*

Tail Measure-Protein (Tmp, MW 161,6 kDa), das Protein mit der Domäne für eine SGNH-Hydrolase (Gp19, MW 114,6 kDa), mögliche Kapsidproteine (Gp12, Gp14 und Gp15) und einige Schwanzproteine (Gp28, Gp32 und Gp33). Gp19 und Gp28 konnten jeweils ein zweites Mal identifiziert werden, was durch eine posttranslationale Prozessierung der beiden Proteine erklärt werden könnte.

Die Proteinbande, die nach der SDS-PAGE am stärksten hervortritt, ist das Genprodukt von *orf15*, was die Vermutung zulässt, dass es sich bei diesem Protein um das *major head*-Protein handelt, das bei vielen Phagen nach einer SDS-PAGE als die dominanteste Bande erscheint. Das *major head*-Protein bildet die Flächen der Dreiecke im ikosaedrischen Kopf des Phagen. Deshalb werden von diesem Protein sehr viele Kopien benötigt. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit der BLAST-Datenbank ergab die größte Ähnlichkeit von Orf15 zu XcelDRAFT_1821 von *Xylanimonas cellulossilytica*, das eine Mu-ähnliche *major head*-Domäne besitzt. Die zweitstärkste Proteinbande resultiert aus dem Genprodukt von *orf28*. Es repräsentiert vermutlich das *major tail*-Protein, das zudem aufgrund einer möglichen posttranslationalen Prozessierung in zwei Banden im Gel identifiziert werden konnte. Es ist bekannt, dass einige Komponenten des Phagenkapsids nach der Translation für anschließenden Zusammenbau prozessiert werden (Hendrix and Casjens, 1974; Hendrix and Casjens, 1975).

1.3.3. Proteine zur Lyse des Wirtsorganismus

Geschwänzte Phagen lysieren ihre Wirtsbakterien, um die neusynthetisierten Phagen in die Umgebung zu entlassen. Zu diesem Zweck nutzen sie zwei spezielle Proteine: ein Holin, das eine porenähnliche Struktur in der Cytoplasmamembran bildet, um so dem zweiten Protein, dem Endolysin, den Zugang zum Peptidoglykan zu ermöglichen. Das Peptidoglykan wird durch das Endolysin degradiert. Durch die Degradation des Peptidoglykans verliert die Zelle ihre stabilisierende Außenhülle, platzt und entlässt so die neuen Phagen in die Umgebung.

1.3.3.1. Das Holin-Genprodukt des Phagen CMP1

Sequenzvergleiche von *orf37* (109 AS, 11,3 kDa) des Phagen CMP1 mit der BLAST-Datenbank ergaben weder auf DNA- noch auf Proteinebene Homologien mit Holinen anderer Phagen. Holine sind eine sehr heterogene Proteingruppe. Daher sind nur Holine sehr nah verwandter Phagen homolog zueinander. Allerdings ist die Lokalisation des Holin-Gens im Genom bei vielen Phagen konserviert. Sie befinden sich oft ebenso wie *orf37* am Ende des Genclusters für die Strukturproteine. Daher wurde die Aminosäuresequenz dieses ORFs weiter analysiert. Da Holine in die Cytoplasmamembran des Wirtes inserieren, weisen sie alle Transmembrandomänen auf. Mit Hilfe des TMHMM-Servers konnten für das CMP1-Holin drei Transmembrandomänen im

Protein vorhergesagt werden. Dies ist charakteristisch für ein Holin und somit konnte es bei den Klasse I-Holinen eingruppiert werden. Die Aminosäuren 10-32, 39-61 und 66-88 durchspannen dabei die Cytoplasmamembran jeweils in Form einer α -helicalen Domäne (Abb. 15).

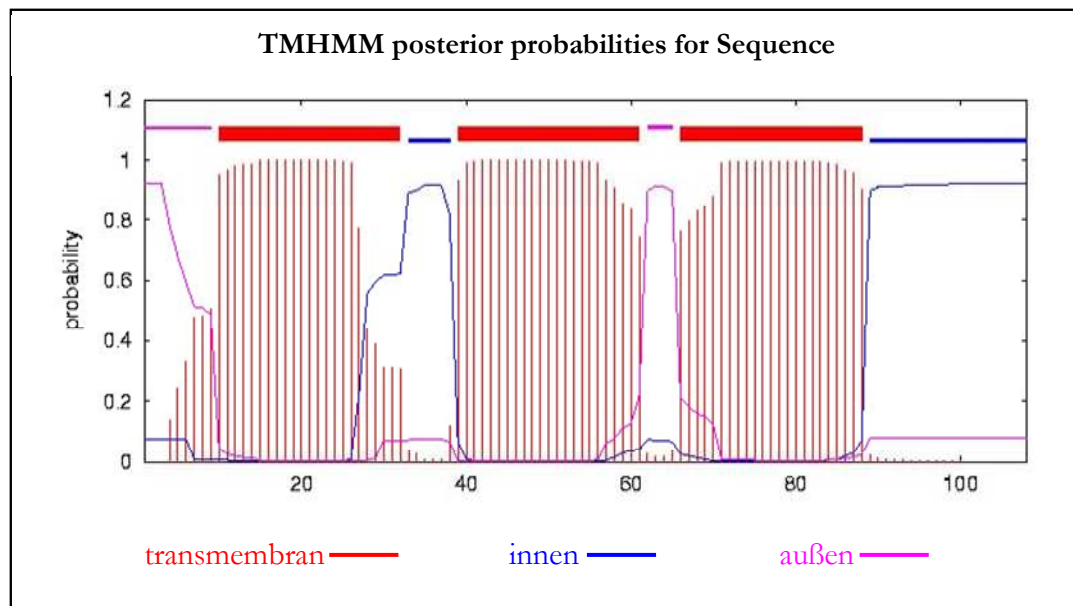


Abb. 15 Sequenzanalyse des Holins von CMP1 auf Transmembrandomänen mittels des CBS Prediction Servers (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

Die Lage des Gens im Genom, die geringe Länge der Aminosäuresequenz und die ermittelten Transmembranhelices lassen es ziemlich sicher erscheinen, dass *orf37* für das Holin codiert. Dem Gen für das Holin folgt ein ORF (*orf38*), der für ein 102 Aminosäuren langes Protein mit einer Transmembranregion (AS 13-15) codiert. Die Funktion dieses hypothetischen Proteins ist nicht ganz klar, vermutlich interagiert es mit dem Holin und spielt eine Rolle bei der Struktur oder Regulation der Porenbildung durch die Holine. Eine ähnliche Organisation des Lyse-Operons wurde auch schon beim Phagen Av-1 von *Actinomyces naeslundii* beschrieben (Delisle *et al.*, 2006). In diesem Fall wurden zwei Gene, *holA* und *holB*, identifiziert, die eine bzw. zwei Transmembranregionen in ihrer Aminosäuresequenz haben. Beide Genprodukte sind einzeln in der Lage, eine *amber*-Mutation im Holin-Gen *S* des Phagen λ Sam7 zu komplementieren, eine Expression beider Gene zusammen resultierte in einer höheren Effizienz bei der Plaquebildung.

1.3.3.2. Das Endolysin-Genprodukt des Phagen CMP1

Homologie-Vergleiche der CMP1-Proteine mit der BLAST-Datenbank ergaben zunächst keinerlei Hinweise auf mögliche Ähnlichkeiten zu Endolysinen anderer Phagen. Da aber die Gene für das Holin und das Endolysin im Allgemeinen ein Operon bilden, wurden die *orfs*, die in der Nachbarschaft des Holin-Gens liegen, näher betrachtet. Aufgrund der Lokalisation dieses ORFs im Genom und der Nähe zum Holin-Gen wurde die Aminosäuresequenz von *orf36*

genauer analysiert. Dabei wies die Aminosäuresequenz schwache Ähnlichkeiten mit der VanY-Domäne einer Carboxypeptidase (e-Value= 2,7, identities= 36/81 (44%)) auf. Aufgrund dieser schwachen Homologie wurde die Aminosäuresequenz zusätzlich mit anderen Sequenzen der Peptidasen-Datenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) verglichen. Bei diesem Vergleich stellte sich heraus, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu der DD-Carboxypeptidase PdcA von *Myxococcus xanthus*, die zur Familie M15B der Metalloendopeptidasen gehört, aufweist.

```

MER005742 - DD-carboxypeptidase pdcA {{Myxococcus xanthus}} (Myxococcus xanthus) [M15.002]
MEROPS Family/Subfamily = M15B
Query: RSNADQQFLVNGWVKRLPGFYAAAPVVGKSNHQPGEAFDIYNWAVVGEAVIK---EEAAKLG-LRRDPSERWHV
      RS A+Q+ L + K G AAP G SNHQ G A D+ N G + + A G +R PSE WHV
Sbjct: RSMAEQEALYRAY-KNGTG-NLAAPPGYSNHQGGIAVDV-NTGGTGTSTYRWANNNAKNGFVRTVPSERPWHV

```

Abb. 16 Ergebnis des Sequenzvergleichs von ORF36 mit der Peptidasen-Datenbank MEROPS.

Dabei bilden drei Aminosäurereste als Metallliganden (His257, Asp264 und His297, in Abb. 16 blau markiert) zusammen mit einem tetrahedral angeordnetem Zn^{2+} -Ion und einem Wassermolekül das katalytisch aktive Zentrum um den Aminosäurerest Glu294 (in Abb. 16 rot markiert). Diese essentiellen Aminosäuren wurden auch in Gp36 von CMP1 identifiziert, daher wurde angenommen, dass es sich um das Endolysin handelt.

Für dieses Endolysin wurde ein Molekulargewicht von etwa 35,4 kDa vorhergesagt. Vermutlich ist es wie andere bereits beschriebene Endolysine auch modular aufgebaut und besitzt eine Domäne zur Zellwand-Erkennung und eine katalytische Domäne, die für die Spaltung des Mureins verantwortlich ist.

1.4. Vergleich der Genome von CMP1 und CN77

Um das Genom von CMP1 in seiner Struktur und Organisation besser mit anderen Sequenzen vergleichen zu können und um weitere spezifische Enzyme für einen möglichen Einsatz beim biologischen Pflanzenschutz identifizieren zu können, wurde das Genom des *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* Phagen CN77 (Cook and Katznelson, 1960; Shirako *et al.*, 1986; Vidaver *et al.*, 1981) partiell sequenziert. Da CMP1 und CN77 beide einen Wirt aus der *Clavibacter*-Gruppe haben und sich beide auch in ihrer Morphologie, Genomgröße und Wurfgröße ähneln, wurde vermutet, dass sich möglicherweise auch ihre Genomorganisation und -sequenz ähneln. Zur Verifikation dieser Vermutung wurden verschiedene Analysen durchgeführt.

Nach einer Hydrolyse der CN77-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente konnten im Vergleich mit

hydrolysierter CMP1-DNA keine ähnlichen Restriktionsmuster erkannt werden (Bachelorarbeit Agnes Borchers).

Eine Southern Blot-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter genomischer DNA von CMP1 bzw. CN77 als Sonden und hydrolysierter DNA von beiden Phagen als Proben offenbarte weder unter stringenten (68°C) noch unter weniger stringenten Bedingungen (50°C) irgendwelche Sequenzähnlichkeiten zwischen CMP1 und CN77 (Bachelorarbeit Agnes Borchers).

Zudem zeigte ein Vergleich der Proteinbandenmuster der Strukturproteine der beiden Phagen nach einer SDS-PAGE keine signifikanten Ähnlichkeiten im Muster der Proteine (Abb. 17).

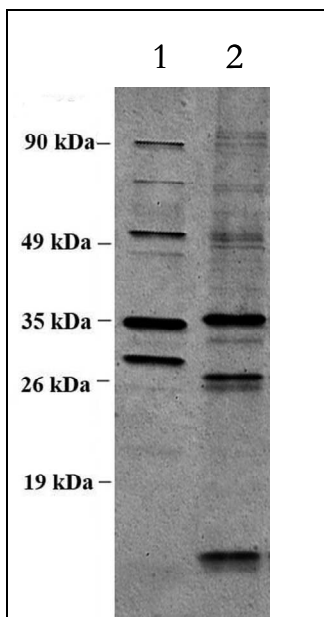


Abb. 17 SDS-PAGE Analyse der Strukturproteine von CMP1 und CN77. Spur 1: Protein-Profil CN77, Spur 2: Protein-Profil CMP1.

Allerdings konnte wie bei CMP1 durch eine zeitabhängige Bal31-Exonuklease-Hydrolyse und anschließender Hydrolyse mit einem Restriktionsenzym gezeigt werden, dass die DNA nicht permutiert ist.

Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente konnten nur zwei DNA-Banden identifiziert werden, die mit zunehmender Bal31-Behandlung degradiert wurden. Diese repräsentieren die Enden des CN77-Genoms (Abb. 18).

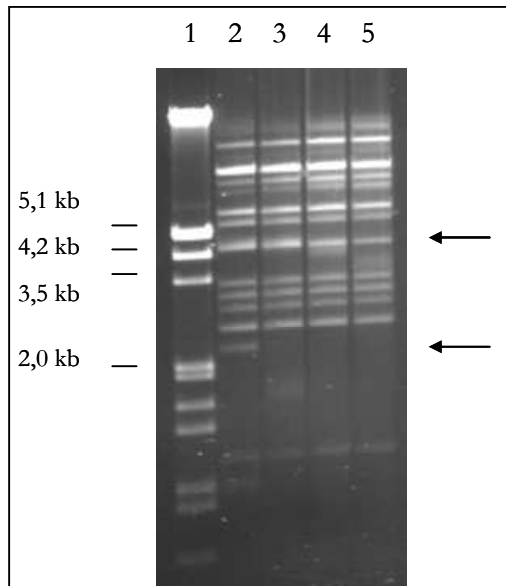


Abb. 18 Zeitabhängige Hydrolyse von CN77-DNA mit Bal31-Exonuklease, anschließende Hydrolyse mit ApaI. Agarosegelelektrophorese, 1% Agarosegel. Spur 1: λ DNA, EcoRI/HindIII, Spur 2-5: CN77-DNA, ApaI, Spur 2: 0min Bal31-Hydrolyse, Spur 3: 15 min Bal31-Hydrolyse, Spur 4: 30 min Bal31-Hydrolyse, Spur 5: 45 min Bal31-Hydrolyse.

Für die Sequenzierung wurde aufgereinigte DNA des Phagen CN77 mit dem Restriktionsenzym SmaI hydrolysiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend in den ebenfalls mit SmaI hydrolysierten Vektor pUC18 inseriert. Bei ca. 20 der nach Ligation und Transformation isolierten Hybridplasmide wurden die Inserts von beiden Seiten mit spezifischen pUC-Primern bei der Firma GATC (Biotech, Konstanz) sequenziert. Die analysierten DNA-Fragmente hatten eine Gesamtlänge von 15,7 kb und einen im Vergleich mit der DNA von CMP1 höheren durchschnittlichen GC-Gehalt von 62,5%. Es konnten 14 ORFs identifiziert werden. Obwohl die beiden Phagen auf Nukleotidsequenz-Ebene keine eindeutigen Ähnlichkeiten zeigten, wurden durch eine PSI-BLAST-Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen für 9 ORFs von CN77 einige, wenn auch mäßige Ähnlichkeiten auf Proteinebene zwischen den Phagen erkannt. So konnten Homologe der CMP1-Genprodukte ORF11-ORF17 und ORF20-21 von CMP1 auch in CN77 eindeutig identifiziert werden. Das Ausmaß an identischen Aminosäuren in diesen Proteinen von CN77 und CMP1 reichte dabei von 24-55%. Alle Genprodukte von CN77, die homolog zu Genprodukten von CMP1 waren, waren späten Genen zuzuordnen. Die dazugehörigen Gene sind auf dem CN77-Genom in der gleichen Reihenfolge wie bei CMP1 angeordnet.

1.5. Vergleich der beiden Lyse-Cluster der *Clavibacter*-Phagen CMP1 und CN77

Während der Annotation eines 3,6 kb großen DNA-Fragments von CN77 konnte die für diese Arbeit sehr interessante lytische Kasette identifiziert werden, die eine ähnliche Organisation wie die im Genom von CMP1 aufweist. Strangaufwärts von diesem potentiellen Operon liegt ein Gen (*orf1*) für ein putatives Strukturprotein, das Ähnlichkeiten zu Gp35 von CMP1 aufweist, dessen Gen ebenfalls direkt vor dem Lyse-Operon von CMP1 liegt. Ähnlich wie bei CMP1 liegt auch bei CN77 am Ende des Lyse-Operons eine relativ starke Sekundärstruktur (-18,9 kcal) in der DNA-Sequenz vor, die vermutlich die Funktion eines Terminators bei der Transkription übernimmt. Ebenso tritt nach dem vermuteten Terminator ein Wechsel in der Transkriptionsrichtung der Gene auf (Abb. 19).

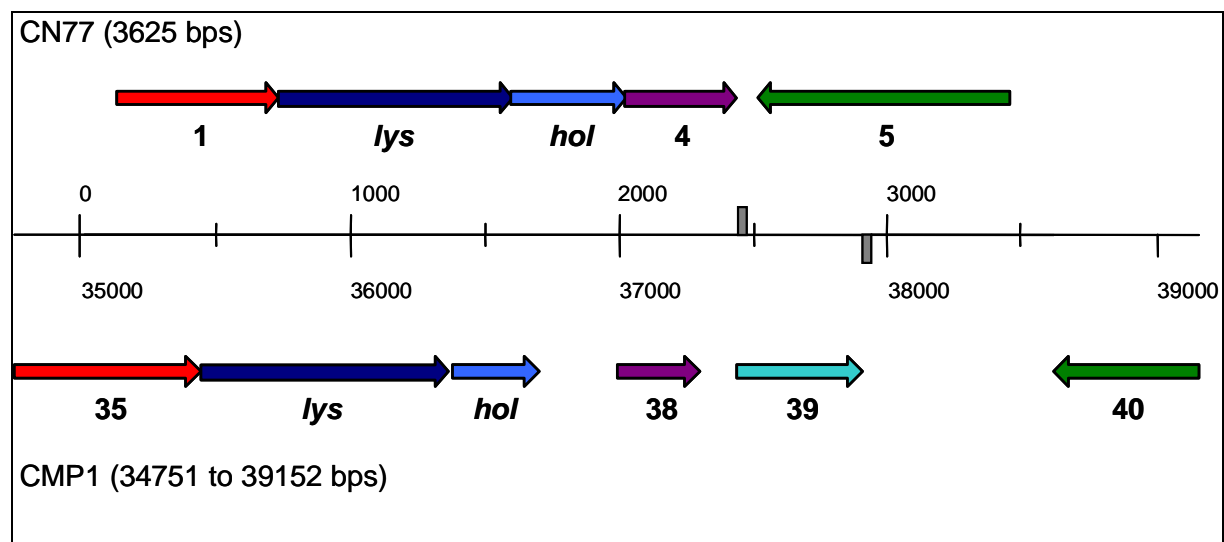


Abb. 19 Lytische Kassetten der *Clavibacter michiganensis*-Phagen CMP1 und CN77. Die lytischen Kassetten beginnen mit dem Gen für das Endolysin und umfassen alle Gene bis zum Terminator. Die Zahlen unter den Pfeilen geben die Nummerierung der Gene in der GenBank-Datenbank wieder. Gleichfarbige Pfeile repräsentieren Gene, deren Genprodukte die gleiche Funktion haben. Putative Terminatoren werden durch graue Kästchen dargestellt.

1.5.1. Das Holin-Genprodukt des Phagen CN77

Auch in der Lyse-Kasette von CN77 folgt auf das Gen für das Endolysin das Gen für das zweite für die Lyse des Wirts essentielle Protein, das Holin. Bei Sequenzvergleichen des vermuteten Holin-Gens des Phagen CN77 mit der BLAST-Datenbank konnten ebenso wie beim Holin-Gen des Phagen CMP1 weder auf DNA- noch auf Proteinebene Homologien mit Holinen anderer Phagen festgestellt werden. Durch die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Hilfe des TMHMM-Servers zur Vorhersage von Transmembranregionen in Proteinen wurden auch für dieses mutmaßliche Holin Transmembrandomänen identifiziert. Im Gegensatz zum Holin von

CMP1 konnte in diesem Fall die eher selten auftretende Anzahl von vier Transmembranregionen ermittelt werden (Young and Bläsi, 1995; Tuohimaa, 2006).

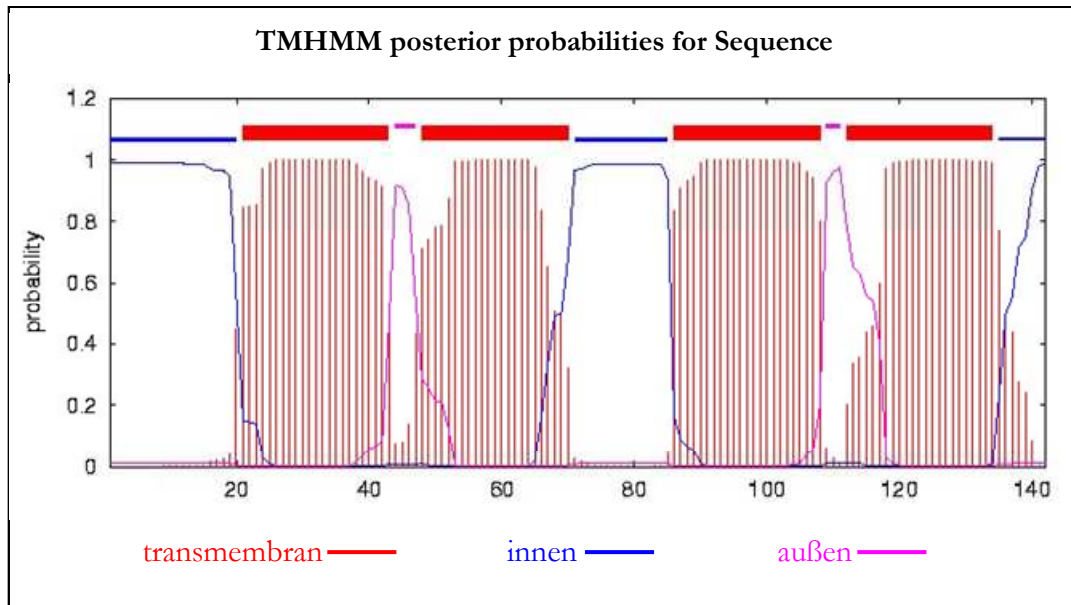


Abb. 20 Sequenzanalyse des *hol*-Gens von CN77 auf Transmembrandomänen mittels des CBS Prediction Servers (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

Die Aminosäuren 21-43, 48-70, 86-108 und 112-134 bilden je eine α -helicale Domäne, die die Cytoplasmamembran durchdringt (Abb. 20). Aufgrund der auffälligen vier Transmembrandomänen innerhalb des Proteins lässt sich dieses Holin nicht in die zwei großen Gruppen der Klasse I- bzw. Klasse II-Holine eingruppiieren. Vier Transmembrandomänen treten meist in der Gruppe der LrgA-Holin-Familie auf, die aber eher in Bakterien zu finden ist. Ein Beispiel für ein solches Holin bei Phagen ist bisher nicht beschrieben worden.

Mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 15,8 kDa ist es auch etwas größer als das etwa 11 kDa große Holin von CMP1.

Stromabwärts lässt sich nach dem Endolysin- und Holin-Gen ebenso wie bei CMP1 (Abb. 19) ein Gen für ein kleines Protein (102 AS, 15,3 kDa) identifizieren, das lediglich eine Transmembranregion (AS 15-34) aufweist.

1.5.2. Das Endolysin-Genprodukt des Phagen CN77

Das erste Gen der Lyse-Kassette des Phagen CN77 ist das Gen für das Endolysin. Eine Analyse mit PSI-BLAST sagte für die abgeleitete Aminosäuresequenz (290 Aminosäuren, 31,9 kDa) eine hochkonservierte Domäne der VanY-Superfamilie der DD-Carboxypeptidasen (e -Value= $2e^{-19}$) im N-terminalen Bereich des hypothetischen Proteins voraus. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Endolysine von CMP1 und CN77 zeigte, dass 39 von 127 (30%) der Aminosäuren identisch und 63 von 127 (49%) ähnlich waren (Abb. 21).

```

Lys-CMP1 : ---MSEMLNRPLEPGCVYIIGMDLQLERRTAAKYLTERRNVFNRKRWITITTYAWGAKRSNADQQLVWGQMKRLPGFYAAPVCKSNHQ : 87
Lys-CN77 : MGYWGYPMGQIIPNDKMAIYRG---CLLRADAAAQAYALQDAYTRAIIGKPLVILEGHI---FDLTRQRYLRNLLSLGRG--NIAAVPCLSNHG : 83
          N P 6Y G L4 AA L T 4 6 I Y R Q 5L N 5 AA G SNH

Lys-CMP1 : PGEARDIYN---WAWVGEAVIKCEAAKLGRRDP---SERQHMDDCSEFSAIDWSILEDNMGLEPREHWMLTRLNDFTWTQGEPGMHED : 170
Lys-CN77 : WGLACDFAAPLNSSGSEEHRRWRQMAPLFCFDWARGKADNPEWHUFEY-CNVVWSRWASLDVTPIDRNDMADITEGQMQRIAVILLDTEIQT : 173
          G A D 642 A G E WHW G P SL 6 6 6 2

Lys-CMP1 : GLGYRLVFDGSRRAAGDARDISAGIRDKLAELKAGAFLMTRMEHIFP-DSACKPRYTTAFDVIIRYEPKQHONTRDEIAGIKEYIEAWAAPA : 260
Lys-CN77 : PLGPRLVK---HALGDALLGQANAWSTAEWPKD--TWDVLDHPLAKMEDCPLKVRIGDVAKYEPLEHQNTRDAIA-----RLGTLQ : 252
          LG RLV4 A GDA 6 1 TAE6 1 6 H 1 G P DV 4YEP EHQNTRD IA 6

Lys-CMP1 : LTSEQILLELAKHIQPFIDEAATLEKWTKAVLQICIRDIPLDAGTPDKK : 306
Lys-CN77 : FIDKQLATIGAGVKEPIDEASLVKTI----VDCVRAIFGRAA---- : 290
          T Q6 6 6 PIDE 66 K6 6 G6R 6F A

```

Abb. 21 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Endolysine von CN77 und CMP1.

Obwohl beide Enzyme vermutlich Peptidasen sind und die katalytische Domäne sich im N-terminalen Bereich befindet, sind die Ähnlichkeiten im C-terminalen Teil der Proteine, der vermutlich für die Bindung der Enzyme an ein Substratmolekül verantwortlich ist, viel ausgeprägter.

Nachdem das Endolysin-Gen des Phagen CN77 eindeutig identifiziert war, wurde die Sequenzierung dieses Phagen nicht weiter verfolgt.

2. Funktionelle Analyse ausgewählter Genprodukte des Phagen CMP1

Nach der Annotation des Genoms von CMP1 konnten die abgeleiteten hypothetischen Genprodukte möglichen funktionellen Gruppen, z. B. Proteine des DNA-Metabolismus, Strukturproteine oder Proteine zur Lyse des Wirtsbakteriums, zugeordnet werden. Generell fiel dabei auf, dass nur wenige dieser Genprodukte signifikante Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufwiesen. Nach der PSI-BLAST-Analyse wurde bei lediglich 13 Genen eine konservierte Domäne identifiziert. Darunter waren u. a. die Gene für drei Nukleasen (*orf2*, *orf49* und *orf50*), eine Thymidylat-Synthase, eine SGNH-Hydrolase und für eine Glycerophosphodiesterase.

Da trotz der identifizierten Domänen die Homologien zu bekannten Proteinen häufig nur sehr schwach ausgeprägt waren, sollte für einige Genprodukte eine biologische Aktivität experimentell nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Gene zunächst über PCR amplifiziert und in einen passenden Expressionsvektor kloniert. Anschließend wurden sie heterolog in *E. coli* überexprimiert, da bisher kein Expressionsvektor für die Expression direkt in *Cmm* vorliegt. Nach einer erfolgreichen Expression sollten die Genprodukte dann möglichst aufgereinigt und danach weiter charakterisiert werden.

Die Effizienz der Translation kann aber auch durch andere Faktoren wie z. B. die *codon usage* maßgeblich beeinflusst werden. Die Häufigkeit der eingesetzten 61 Aminosäure-Codons ist von Organismus zu Organismus verschieden und korreliert mit der Anzahl der entsprechenden tRNAs, d. h. für seltene Codons liegen auch nur wenige tRNAs im Organismus vor (Dong *et al.*, 1996). Der Vektor pSCodon bietet in diesem Fall einen weiteren Vorteil, denn er trägt Gene für fünf tRNAs für in *E. coli* selten auftretende Codons (*ileX*, *proL*, *lenW*, *ghyT* und *argU*), die dieses möglicherweise auftretende Problem beheben können. Beispielsweise wurden im Gen des Endolysins von CMP1 17 seltene Codons und im Gen für das CN77-Endolysin 7 seltene Codons identifiziert, die durch die Nutzung des Expressionsvektors pSCodon1.2 kompensiert werden konnten.

2.2. Klonierung der zu untersuchenden Gene

Die für eine weitere Charakterisierung interessanten Gene (Tab. 4) wurden zunächst über PCR mit Hilfe einer Pwo-Polymerase und spezifisch konstruierten Primern (s. IV 2.3.) amplifiziert. Die Klonierungen folgten immer der gleichen Strategie. Die Primer wurden so gestaltet, dass die PCR-Produkte am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NdeI und am 3'-Ende eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI besaßen. Nach der Amplifikation mit der *proof-reading* Pwo-Polymerase besaßen die amplifizierten DNA-Moleküle *blunt ends* und konnten dadurch in das mit SmaI hydrolysierte Plasmid pK18mob inseriert werden. Nach Ligation und Transformation wurden die isolierten Hybridplasmide mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI hydrolysiert. Die DNA-Fragmente, die die zuvor amplifizierten Gene enthielten, wurden nach einer elektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und anschließend in den mit NdeI und XhoI hydrolysierten Vektor pSCodon1.2 inseriert.

Hyp. Gen	Funktion	Lokalisation im CMP1-Genom	bp	AS	MW (kDa)	Anzahl seltener Codons
<i>bnbc</i>	Endonuklease	1357-1692	336	111	12,8	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0; <i>ileX</i> ATA: 0; <i>ghyT</i> GGA: 2; <i>lenW</i> CTA: 2; <i>proL</i> CCC: 4
<i>ssb</i>	DNA-Einzelstrang-Bindeprotein	43490-44041	552	183	20,3	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0; <i>ileX</i> ATA: 0; <i>ghyT</i> GGA: 2; <i>lenW</i> CTA: 0; <i>proL</i> CCC: 4
<i>erf</i>	DNA-Bindeprotein	45240-46127	888	295	31,9	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0; <i>ileX</i> ATA: 0; <i>ghyT</i> GGA: 5; <i>lenW</i> CTA: 2; <i>proL</i> CCC: 5
<i>exo</i>	Exonuklease	46120-46830	711	236	26,8	<i>argU</i> AGA: 1, AGG: 0; <i>ileX</i> ATA: 0; <i>ghyT</i> GGA: 3; <i>lenW</i> CTA: 0; <i>proL</i> CCC: 5
<i>hel</i>	Helikase	47235-48836	1602	533	59,8	<i>argU</i> AGA: 4, AGG: 1; <i>ileX</i> ATA: 5; <i>ghyT</i> GGA: 8; <i>lenW</i> CTA: 6; <i>proL</i> CCC: 6

<i>bol</i>	Holin	36378-36704	327	108	11,3	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0; <i>ileX</i> ATA: 0; <i>ghyT</i> GGA: 0; <i>lenW</i> CTA: 0; <i>proL</i> CCC: 0
<i>lys</i>	Endolysin	35449-36369	921	306	35,4	<i>argU</i> AGA: 2, AGG: 1; <i>ileX</i> ATA: 1; <i>ghyT</i> GGA: 4; <i>lenW</i> CTA: 5; <i>proL</i> CCC: 4
<i>ugpQ</i>	Glycerophosphodiesterase	19050-19817	768	255	27,7	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 2; <i>ileX</i> ATA: 0; <i>ghyT</i> GGA: 5; <i>lenW</i> CTA: 2; <i>proL</i> CCC: 1
<i>hyd</i>	Hydrolase	14336-17593	3258	1085	114,6	<i>argU</i> AGA: 2, AGG: 4; <i>ileX</i> ATA: 2; <i>ghyT</i> GGA: 17; <i>lenW</i> CTA: 5; <i>proL</i> CCC: 24
<i>end</i>	Endonuklease	46814-47245	435	143	16,6	<i>argU</i> AGA: 3, AGG: 3; <i>ileX</i> ATA: 3; <i>ghyT</i> GGA: 2; <i>lenW</i> CTA: 1; <i>proL</i> CCC: 0
<i>thy</i>	Thymidylat-Synthase	3974-4699	726	241	27,2	<i>argU</i> AGA: 3, AGG: 3; <i>ileX</i> ATA: 3; <i>ghyT</i> GGA: 2; <i>lenW</i> CTA: 1; <i>proL</i> CCC: 0

Tab. 4 Übersicht klonierte Gene von CMP1

2.3. Heterologe Expression ausgewählter Gene von CMP1 in *E. coli*

Für die Expression der CMP1-Gene wurde der *E. coli*-Stamm SE1 mit den entsprechenden Hybridplasmiden transformiert. Logarithmisch wachsende Zellen (Titer $\approx 3\text{-}4 \cdot 10^8/\text{ml}$) wurden dann bei 37 °C für 3 h mit 1 mM IPTG induziert. Nach 60 min wurden jeweils Proben entnommen und das Gesamtprotein isoliert, welches anschließend in einer SDS-PAGE analysiert wurde. Abb. 23 zeigt exemplarisch eine solche Aufarbeitung.

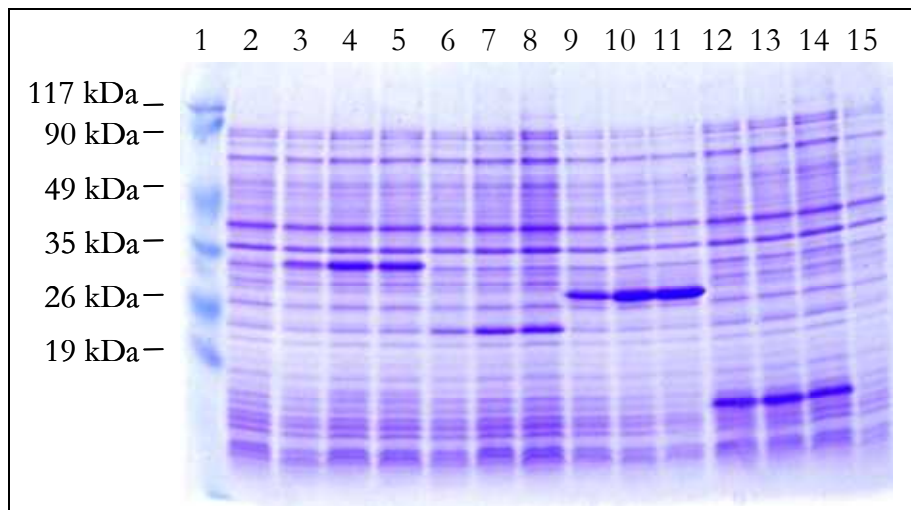


Abb. 23 Überexpression verschiedener Gene von CMP1 in *E. coli* SE1. SDS-PAGE, 17,5% Polyacrylamidgel. Spur 1: Proteinmarker, Spur 2 und 15: Gesamtprotein SE1 pSCodon uninduziert, Spur 3-5: Gesamtprotein SE1 pSCodonLys, Spur 6-8: Gesamtprotein SE1 pSCodonSsb, Spur 9-11: Gesamtprotein SE1 pSCodonExo, Spur 12-14: Gesamtprotein SE1 pSCodonExo. Spur 3, 6, 9, 12: 1 h induziert, Spur 4, 7, 10, 13: 2 h induziert, Spur 5, 8, 11, 14: 3 h induziert.

Im Vergleich mit nicht induzierten Proben war bei allen Stämmen deutlich eine mit der Zeit stärker werdende Proteinbande zu erkennen, die das jeweilige überexprimierte Genprodukt

repräsentiert. Die neu auftretenden Banden stimmten alle mit dem jeweils vorhergesagten molekularen Gewicht der Fusionsproteine überein. Beim Endolysin und Ssb treten nach der Induktion bei 36 kDa bzw. 20 kDa eindeutige Banden auf, und auch bei der Exo- und der HNHc-Endonuklease lassen sich Banden in der Höhe von 27 kDa bzw. 13 kDa erkennen.

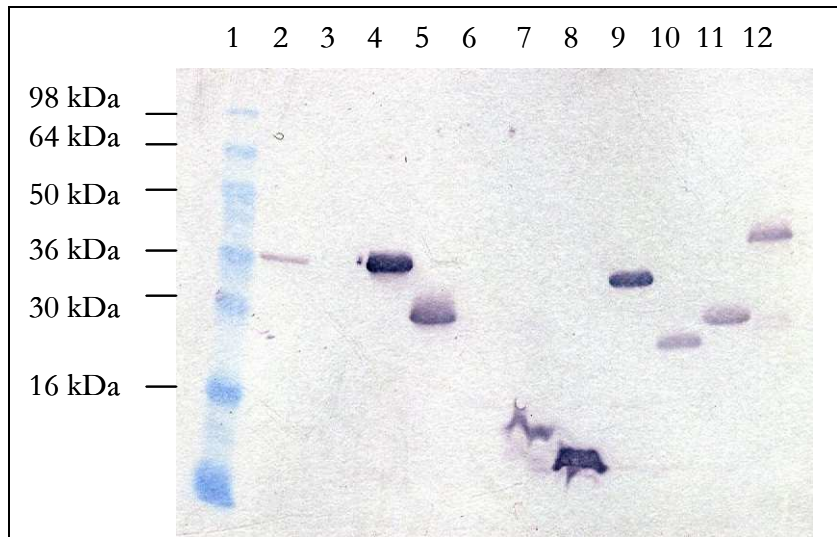


Abb. 24 Western Blot-Analyse in *E. coli* exprimierter CMP1-Gene. Primärer Antikörper Anti-His-Tag, monoklonal aus Maus, Sekundär-Antikörper Anti-Maus –IgG-Alkalische Phosphatase, aus Ziege.

Spur 1: SeeBlue Pre-stained Protein Standard, Spur 2: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonErf, Spur 4: *E. coli* SE1 pSCodonErf, 32 kDa, Spur 5: *E. coli* SE1 pSCodonExo, 27 kDa, Spur 7: *E. coli* SE1 pSCodonHNHc, 13 kDa, Spur 8: *E. coli* SE1 pSCodonHol, 11 kDa, Spur 9: *E. coli* SE1 pSCodonLys, 35 kDa, Spur 10: *E. coli* SE1 pSCodonSsb, 20 kDa, Spur 11: *E. coli* SE1 pSCodonThy, 27 kDa, Spur 12: *E. coli* SE1 pSCherryUgpQ, 38 kDa.

Um die korrekte Fusion der Proteine mit dem His-tag zu überprüfen, wurden die überexprimierten Genprodukte mit einem Antikörper gegen den His-tag durch eine Western Blot-Analyse exemplarisch analysiert (Abb. 24). Dabei stellte sich heraus, dass mit Ausnahme des Genprodukts von *erf* alle vorhergesagten Molekulargewichte der Genprodukte mit den durch Western Blot ermittelten Größen übereinstimmen. Durch die Signale wurde bewiesen, dass die Gene mit dem *his*-tag korrekt fusioniert und exprimiert wurden und die Möglichkeit der Aufreinigung über Affinitätschromatographie besteht.

Nach der erfolgreichen Überexpression mussten die Fusionsproteine zudem auf ihre Löslichkeit überprüft werden, da es bei der Expression von rekombinanten Proteinen oft zur Bildung von *inclusion bodies* kommen kann. Diese Aggregate entstehen durch die fehlerhafte oder unvollständige Faltung der neusynthetisierten Proteine, die somit denaturiert und in biologisch inaktiver Form vorliegen. Für die Überprüfung der Löslichkeit wurden Zellen nach der Induktion mit der French Press lysiert und der Zelleextrakt anschließend zentrifugiert. Überstand und Pellet

der verschiedenen Extrakte wurden dann auf einer SDS-PAGE analysiert (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme des Ssb-Proteins lagen alle überexprimierten Proteine in unlöslicher Form im Pellet vor und eine Charakterisierung der biologischen Funktion war in dieser Form nicht möglich.

Die Renaturierung und Aufreinigung von Proteinen, die in Form von *inclusion bodies* vorliegen, ist ein recht aufwändiger Prozess (Rudolph and Lilie, 1996; Vallejo and Rinas, 2004), der zudem nicht garantiert, dass anschließend auch aktives Protein vorliegt. Zudem geht die Aufarbeitung von *inclusion bodies* auch mit einem hohen Verlust des überexprimierten Proteins von bis zu 75% einher (Datar *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wurde auf eine Aufarbeitung und Renaturierung der *inclusion bodies* verzichtet. Dagegen wurde versucht, durch suboptimale Wachstumsbedingungen, wie z. B. eine Absenkung der Inkubationstemperatur oder eine schwächere Induktion durch geringere Konzentrationen des Induktors IPTG, eine erhöhte Menge nativen Proteins zu erlangen (Schein, 1989). In einigen Fällen war dieser Schritt erfolgreich, so konnte durch eine niedrigere Konzentration an IPTG (0,1 statt 1 mM) und eine niedrigere Inkubationstemperatur (30°C statt 37°C) bei der Expression des Endonuklease-Gens natives und vor allem aktives Protein erhalten werden. Eine weitere, wenig erfolgreiche Strategie bestand darin, osmotischen Stress durch hohe Konzentrationen an Glycin zu erzeugen und so die Aufnahme von Betain in die Zelle zu erleichtern, das für die Stabilisation von Proteinstrukturen und damit indirekt auch für die Löslichkeit von Proteinen förderlich ist (Blackwell and Horgan, 1991).

Die deutlichste Verminderung der Menge an *inclusion bodies* zeigte sich bei der Verwendung des Wirtsstamms „Arctic Express“ (Stratagene). Dieser *E. coli*-Stamm trägt ein Plasmid mit Genen für zwei Kälte-adaptierte Chaperone aus *Oleispira antarctica*, die im Gegensatz zu Chaperonen von *E. coli* auch noch bei Temperaturen von 10-15°C aktiv sind. Die Induktion erfolgte bei diesem Stamm bei 15°C, was zwar zu einer verringerten Menge an synthetisiertem Genprodukt, aber insgesamt zu einem verhältnismäßig höheren Anteil an löslichem Protein führte, das anschließend aufgereinigt und für funktionelle Tests eingesetzt werden konnte.

2.4. Das Ssb-Protein von CMP1

Ssb-Proteine haben essentielle Funktionen bei biologischen Vorgängen an DNA wie Replikation, Rekombination und Reparatur. Sie binden spezifisch und kooperativ an einzelsträngige DNA und decken dabei einige Nukleotide vollständig ab. Die Anzahl variiert dabei z. B. beim Ssb von *E. coli* zwischen 30 und 73 pro Tetramer, je nach Bindungstyp (Lohman und Ferrari, 1994).

Obwohl das Genprodukt von *orf46* in seiner Aminosäuresequenz keine konservierte Domäne für ein Einzelstrang-Bindeprotein zeigte, konnten dennoch charakteristische Merkmale eines solchen

Proteins identifiziert werden (s. Kapitel 1.4.1.). Trotz der fehlenden konservierten Bereiche sollte das Protein dennoch weiter analysiert werden, da es eine wichtige Funktion bei der Replikation haben könnte.

Im Experiment sollte deshalb die kooperative Bindung an Einzelstrang-DNA gezeigt werden. Nach der erfolgreichen Expression eines löslichen rekombinanten Proteins mit einem Molekulargewicht von 20,3 kDa konnte dieses über die Nutzung des fusionierten His-Tags mit Hilfe von Affinitätschromatographie aufgereinigt und für weitere funktionelle Analysen eingesetzt werden.

2.4.1. *Shift assay* mit einzelsträngiger DNA

Für die Überprüfung einer möglichen Einzelstrang-DNA-bindenden Funktion wurde ein EMSA-Test (*Electrophoretic mobility shift assay*) mit einzelsträngiger DNA des Phagen M13 und unterschiedlichen Fraktionen des aufgereinigten Proteins durchgeführt. Durch die Bindung des Proteins an die DNA verändert sich die Mobilität der DNA bei der Gelelektrophorese, so dass nach der Elektrophorese eine deutlich verminderte Laufstrecke im Vergleich zu unbehandelter DNA erkennbar sein sollte.

Das aufgereinigte Protein hatte eine Konzentration von ungefähr 1,5 mg/ml. Die Behandlung der M13-DNA mit dem Ssb-Protein erfolgte bei Raumtemperatur und in NEB-Puffer 1 (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT).

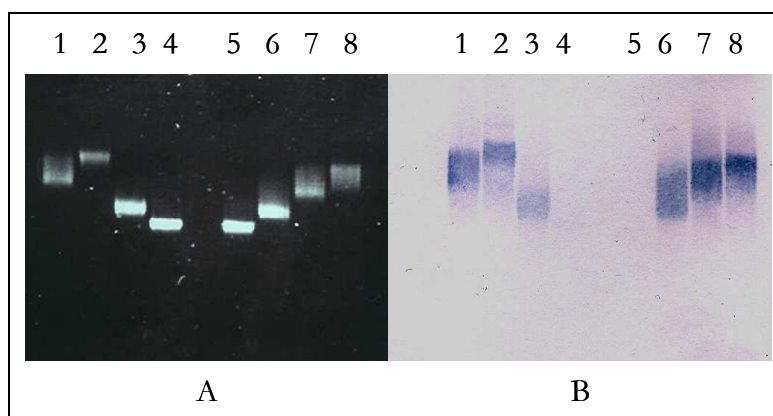


Abb. 25 Bindung des Genprodukts von *orf46* (Ssb) an einzelsträngige zirkuläre DNA des Phagen M13mp18 (7249 bp); A 1% Agarosegel, B Western Blot-Analyse (Primärer Antikörper Anti-His-Tag, monoklonal aus Maus, Sekundär-Antikörper Anti-Maus –IgG-Alkalische Phosphatase, aus Ziege). Spur 1: M13-DNA mit Protein (1 µl Fraktion 2), Spur 2: M13-DNA mit Protein (1 µl Fraktion 4), Spur 3: M13-DNA mit Protein (1 µl Fraktion 6), Spur 4: M13-DNA mit Protein (1 µl Fraktion 8), Spur 5: M13-DNA, Spur 6: M13-DNA mit Protein (0,5 µl Fraktion 2), Spur 7: M13-DNA mit Protein (1 µl Fraktion 2), Spur 8: M13-DNA mit Protein (2 µl Fraktion 2).

Nach der Inkubation der DNA mit dem aufgereinigten Protein konnte nach der Gelelektrophorese eindeutig ein Shift der DNA-Banden im Gel detektiert werden (Abb. 25 A). Steigende Proteinmengen führten zu sukzessiv geringerer Mobilität der DNA. Das spricht für eine unspezifische Bindung vieler Proteinmoleküle an die Einzelstrang-DNA. Doppelsträngige DNA zeigte nach Inkubation mit dem Protein keinen Shift (Daten nicht gezeigt). Durch eine Proteinase K- Behandlung konnte der Shift der Banden verhindert werden.

In einem anschließenden Versuch sollte nachgewiesen werden, dass tatsächlich das Genprodukt von *orf46* für die verminderte Mobilität der M13-DNA verantwortlich ist. Dazu wurden die Proteine aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Vakuumbloiters auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die weitere Analyse erfolgte analog zum Western Blot. Nach der Detektionsreaktion konnte das putative Ssb-Protein aufgrund seines fusionierten His-tags eindeutig auf der Membran identifiziert werden. Da das Ssb-Protein auf der Membran auf gleicher Höhe zu erkennen war wie die DNA-Banden im Agarosegel (Vgl. Abb. 25 A und B), beruht die Veränderung der Laufeigenschaften der eingesetzten M13-DNA also tatsächlich auf der Bindung des aufgereinigten Proteins an die DNA.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass für die Bindung des Proteins an die DNA zweiwertige Ionen nicht benötigt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem scheint das Ssb-Protein sehr hitzestabil zu sein. Nach Inkubation des Proteins für 10 min bei verschiedenen Temperaturen (40-90°C) und anschließendem Einsatz für einen EMSA-Versuch konnte hier kein Unterschied zu einem Ansatz mit unbehandeltem Protein erkannt werden (Daten nicht gezeigt).

Es ist bekannt, dass das Ssb-Protein von *E. coli* in Form eines Tetramers aus vier identischen Untereinheiten vorliegt (Weiner *et al.*, 1975) und kooperative Bindungen mit anderen Ssb-Proteinen unterstützt (Ferrari *et al.*, 1994). Um eine Oligomerisierung des Ssb-Proteins von CMP1 nachzuweisen, wurde aufgereinigtes Ssb-Protein mit Glutaraldehyd behandelt. Dabei reagieren die Aminogruppen von Proteinen mit dem Glutaraldehyd und werden so irreversibel vernetzt. Die quervernetzten Proteine wurden über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulose transferiert und die möglichen durch die Vernetzung neu entstandenen Oligomere über eine Western Blot-Analyse detektiert. Nach der Vernetzungsreaktion mit Glutaraldehyd und anschließender Western Blot-Analyse konnten auf der Nitrocellulose-Membran mehrere Banden identifiziert werden, die bei einem Molekulargewicht von 20,3 kDa für das Monomer der Größe nach möglichen Dimeren, Trimeren und weiteren Oligomeren entsprechen könnten (Abb. 26).

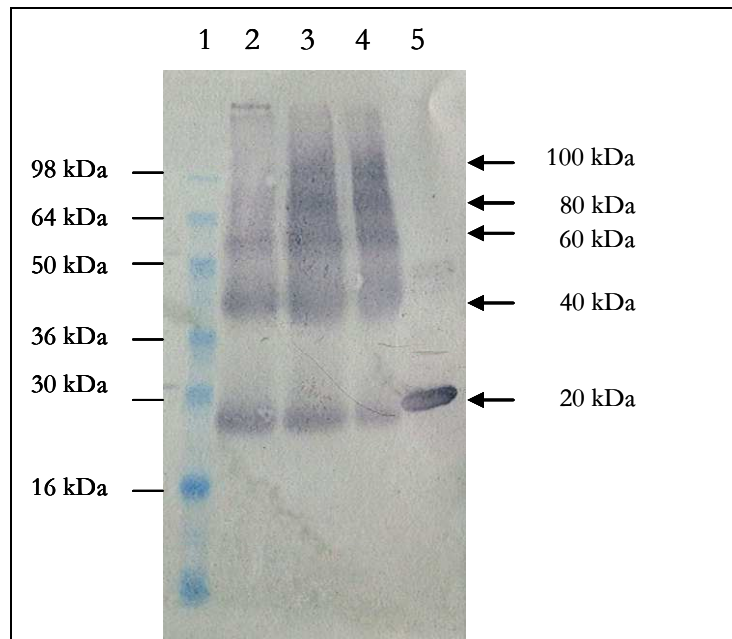


Abb. 26 Western Blot-Analyse nach Glutaraldehyd-Vernetzung von aufgereinigtem Ssb. Primärer Antikörper Anti-His-Tag, monoklonal aus Maus, Sekundär-Antikörper Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase, aus Ziege. Spur 1: SeeBlue Pre-stained Protein Standard, Spur 2: aufgereinigtes Ssb-Protein, vernetzt, Spur 3: aufgereinigtes Ssb-Protein, vernetzt, Spur 4: aufgereinigtes Ssb-Protein, vernetzt, Spur 5: Gesamtprotein *E. coli* SE1 psCodonSsb nach Induktion.

Anhand dieser Versuche konnte eine Funktion des Gp46 von CMP1 als Ssb-Protein eindeutig nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Ssb-Protein von CMP1 ähnlich wie das Ssb-Protein von *E. coli* vermutlich Oligomere bildet.

2.5. Nukleasen des Phagen CMP1

Im Genom von CMP1 konnten mehrere Gene für Nukleasen identifiziert werden, die in unterschiedlichen Regionen lokalisiert sind. Generell haben Nukleasen im Vermehrungszyklus von Phagen viele unterschiedliche Funktionen, u. a. bei der Degradation der Wirts-DNA, bei der Rekombination, z. B. bei der Auflösung von Holliday-Strukturen und beim Ringschluss mit Hilfe terminal-redundanter Enden nach Injektion der DNA in die Wirtszelle, bei der Replikation und Bildung von Konkatemeren oder bei der Verpackung der DNA in die Kapside.

Beim Phagen T7 konnte gezeigt werden, dass eine Endonuklease des Phagen an der Degradation der Wirts-DNA beteiligt ist, deren Nukleotide für die Synthese neuer Phagen-DNA genutzt wird (Powling and Knippers, 1976). Nach Ausschalten des Gens für die Endonuklease konnte eine verringerte Synthese neuer Phagen-DNA beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Endonuklease bei der Degradation der Wirts-DNA eine entscheidende Rolle spielen könnte. Neben einer Endonuklease sind beim Phagen T7 aber auch Exonukleasen am Abbau der Wirts-

DNA beteiligt. Sie degradieren die durch die Endonuklease entstandenen genomischen DNA-Fragmente von den Enden her, wobei Mononukleotide entstehen (Kerr and Sadowski, 1972).

Weitere Beispiele für Phagen-kodierte Endonukleasen zur Degradation bakterieller DNA sind die Endonuklease IV vom Phagen T4 und die Endonuklease I von T7 (Center *et al.*, 1970). Über eine Differenzierung zwischen Wirts- und Phagen-DNA durch Nukleasen ist bisher wenig bekannt. Für geradzahlige T-Phagen konnte allerdings gezeigt werden, dass durch den Austausch von Cytosin gegen 5' Hydroxymethylcytosin die Phagen-DNA vor der Degradation durch die eigenen Endonukleasen geschützt wird (Wyatt and Cohen, 1953), da die 5' Hydroxymethylcytosin-Reste glykosyliert werden können (Lehmann and Pratt, 1960) und die Restriktion und der nukleolytische Abbau so verhindert werden können.

Neben ihren Aufgaben bei der Degradation des Wirtsgenoms spielen Nukleasen auch bei der Replikation des Phagen-genoms eine große Rolle. Phagen-genome werden wie beim Phagen Lambda häufig über den *rolling circle*-Mechanismus repliziert (Takahashi, 1977), für dessen Initiation ein Einzelstrangbruch notwendig ist, der wiederum durch eine spezifische Endonuklease eingefügt wird. Zur Bildung von Replikationsintermediaten in Form von Konkatemeren werden ebenfalls Proteine mit endonukleolytischer Aktivität benötigt. Die Konkatemere beim Phagen T7 entstehen beispielsweise durch die Freilegung komplementärer Einzelstränge im Bereich der terminalen Redundanzen zweier DNA-Moleküle durch Nukleasen (Dreiseikelman and Wackernagel, 1978). Beim Phagen T4 werden die Konkatemere über Rekombination gebildet. Eine ähnliche Funktion besitzen Nukleasen auch bei einem möglichen rekombinativen Ringschluss eines einzelnen DNA-Moleküls nach Injektion von Phagen-DNA, z. B. beim Phagen P1, zum Schutz vor bakteriellen Exonukleasen beteiligt. Auch hier wird durch Endonukleasen eine Freilegung komplementärer Einzelstränge im Bereich der terminalen Redundanzen bewirkt..

Ein Beispiel für eine sequenzspezifische Rekombination ist die Integration eines temperenten Phagen (z. B. Lambda) ins Wirtsgenom. Hier haben spezifische Endonukleasen (Integrasen) eine entscheidende Funktion, da an den *attachement-sites* zunächst Einzelstrangbrüche in die Wirts- bzw. Phagen-DNA eingefügt werden müssen, bevor die Phagen-DNA ins Wirtsgenom integriert werden kann (Groth and Calos, 2004). Durch die Interaktionen der Einzelstränge beider *attachement sites* entsteht die Holliday-Struktur (Holliday, 1964; Hadden *et al.*, 2007). Diese Überkreuzung der Einzelstränge muss durch eine Spaltung mit Hilfe von Endonukleasen aufgelöst werden, bevor die Stränge wieder ligiert werden können.

Auch bei der Verpackung der Konkatemere in die Phagenkapside werden Proteine mit einer Nuklease-Aktivität benötigt. Beim Phagen λ übernimmt diese Funktion die Terminase, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht. Die große Untereinheit besitzt eine ATPase für den

Transport der DNA in die Capside und eine Domäne mit Endonuklease-Aktivität, die an den *cos* sites Einzelstrangbrüche verursacht und dabei 12 bp lange *sticky ends* erzeugt (Yang *et al.*, 1997). Die kleine Untereinheit ist für die Organisation des gesamten Verpackungsapparats zuständig (Catalano *et al.*, 1995).

Endonukleasen können Bakteriophagen ebenso als eigene Restriktionsenzyme dienen, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch erkennen und hydrolysieren können. Der Phage P1 besitzt z. B. ein Typ III Restriktions- und Modifikationssystem (Iida *et al.*, 1983).

2.6. Die Endonukleasen von CMP1

In der frühen Region des CMP1-Genoms codiert eines der ersten Gene (orf50, *end*) wahrscheinlich eine Endonuklease. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Gens konnte eine konservierte Domäne für eine Endonuklease identifiziert werden. Das Protein besitzt eine mäßige Ähnlichkeit (identities= 59/144 (40%)) zu einer HNHc Endonuklease-Domäne, die oft in Proteinen zu finden ist, die eine DNA-bindende oder -hydrolysierende Funktion haben. Für das Protein End wurde ein Molekulargewicht von 16,6 kDa vorhergesagt.

Der Phage CMP1 besitzt noch ein weiteres Gen für eine HNHc-Endonuklease, das für ein Protein von etwa 12,8 kDa codiert. Dieses Gen (orf2, *hnhc*) ist an einer ungewöhnlichen Stelle lokalisiert, nämlich stromaufwärts der Gene für die Strukturproteine ganz am linken Ende des Genoms. Bei seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz konnte ebenfalls eine konservierte HNHc-Domäne (e-Value= $4e^{-8}$, identities= 39/61 (63%)) identifiziert werden.

Beide Genprodukte, Gp2 und Gp50, könnten eine Rolle bei der Replikation der DNA des Phagen CMP1 spielen. Zur weiteren Charakterisierung wurden beide Gene kloniert, exprimiert, ihre Genprodukte aufgereinigt und ihre vorhergesagte Endonuklease-Funktion überprüft. Im weiteren Verlauf werden nur Ergebnisse für die Analyse von Gp50 exemplarisch vorgestellt, da die Ergebnisse für beide Proteine nahezu identisch waren.

2.6.1. Die Aktivität des Gp50 von CMP1

Der einfachste Nachweis endonukleolytischer Aktivität ist die Überführung einer *supercoiled*-DNA in die *open circle* Form durch die Einführung eines Einzelstrangbruchs. Dieser Test wurde verwendet, um die Endonuklease-Aktivität der Genprodukte Gp2 und Gp50 (End) zu analysieren.

Dazu wurde pUC13-DNA mit einer der beiden aufgereinigten Endonukleasen (ca. 50 ng) für eine Stunde bei 30°C in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) inkubiert. Nach 10, 20, 30 und 60 min wurden Proben genommen, die anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese analysiert wurden (Abb. 27).

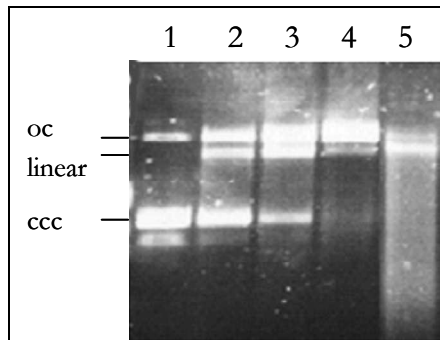


Abb. 27 Überprüfung der Endonuklease-Aktivität von Gp50 an *supercoiled* Plasmid-DNA (oc=*open circle*, ccc=*supercoiled*). Agarosegelelektrophorese, 1% Agarosegel. Inkubation von pUC13-DNA mit End bei 37°C. Spur 1: pUC13-DNA ohne Zugabe von End, Spur 2: 10 min Inkubation, Spur 3: 20 min Inkubation, Spur 4: 30 min Inkubation, Spur 5: 60 min Inkubation.

Nach der Gelelektrophorese konnte die Nukleaseaktivität des Proteins Gp50 in Form einer Konformationsänderung der DNA erkannt werden. In der Abb. 27 ist zu erkennen, dass die Konzentration der *supercoiled*-DNA-Bande im Laufe der Zeit abnimmt, während die Bande, die die *open circle*-Form repräsentiert, zunimmt. Schon nach 10 min konnte man einen deutlichen Unterschied zur unbehandelten DNA erkennen. Es ist zudem eine dritte Bande auf Höhe linearer DNA zu sehen. Nach einer Stunde lag fast die gesamte DNA in linearer Form bzw. bereits noch weiter degradiert vor, was in dem „Schmier“ in Spur 5 zu erkennen ist. In diesem Bereich sind keine spezifischen Banden zu erkennen, was ein Hinweis auf eine unspezifische Spaltung der DNA ist.

Durch diesen Versuch konnte die nukleolytische Aktivität des aufgereinigten Enzyms eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem konnte durch die Wiederholung des Versuchs bei verschiedenen Temperaturen (26-42°C) und Verwendung verschiedener Puffer gezeigt werden, dass die Aktivität des Enzyms bei 37°C am höchsten ist und die Anwesenheit zweiwertiger Ionen für die Aktivität unbedingt notwendig ist (Daten nicht gezeigt).

Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen sollte noch untersucht werden, ob diese Endonuklease von CMP1 an der Degradation der Wirts-DNA beteiligt ist. Dafür wurde Gesamt-DNA von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB3123 isoliert und im Vergleich mit pUC13-DNA im folgenden Versuch eingesetzt. Es wurden dabei unterschiedliche Mengen an Enzym zusammen mit der jeweiligen DNA in NEB-Puffer 3 für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente.

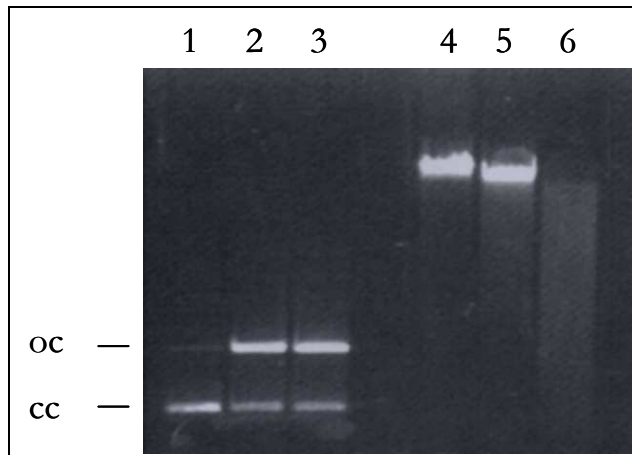


Abb. 28 Degradation von *Cmm*-DNA durch die Endonuklease von CMP1. Inkubation 2 h bei 37°C. Agarosegelelektrophorese, 0,8 % Agarosegel. Spur 1: pUC13-DNA, Spur 2: pUC13-DNA +1 µl Endonuklease, Spur 3: pUC13-DNA +2 µl Endonuklease, Spur 4: *Cmm* NCPPB3123 Gesamt-DNA, Spur 5: *Cmm* NCPPB3123 Gesamt-DNA +1 µl Endonuklease, Spur 6: *Cmm* NCPPB3123 Gesamt-DNA +2 µl Endonuklease.

In Abb. 28 ist die Degradation der *Cmm*-DNA klar in Form von „Schmier“ in Spur 6 zu erkennen, in der keine spezifischen Banden zu erkennen sind. Zudem sieht man deutlich, dass eine Konformationsänderung bei der pUC-DNA von superhelikaler zu *open circle*-DNA stattgefunden hat. Ebenso zeigt sich trotz identischer Behandlung ein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Substraten. Während die pUC-DNA nach der Konformationsänderung unter diesen Bedingungen noch nicht weiter abgebaut wurde und in Form von zwei scharfen Banden zu erkennen ist, scheint die chromosomale DNA von *Cmm* im gleichen Zeitraum stärker degradiert worden zu sein. Hier sind keine ausgeprägten Banden mehr zu erkennen. Die Endonuklease von CMP1 könnte also tatsächlich am Abbau der Wirts-DNA beteiligt sein. Für eine eindeutige Aussage müssten aber weitere Experimente durchgeführt werden.

Da Gp50 unspezifisch sowohl *supercoiled*-DNA als auch lineare DNA hydrolysiert, handelt es sich also tatsächlich um eine Endonuklease. Dabei fügt sie Einzelstrangbrüche, so genannte *nicks*, in doppelsträngige DNA ein, wodurch die *supercoiled* DNA in die relaxierte *open circle* Form überführt wird und die chromosomale DNA, sobald einige *nicks* eingefügt wurden, degradiert wird.

2.7. Die Aktivität des Gp51 von CMP1

Das Genprodukt von *orf49* zeigte Ähnlichkeiten zu einer DnaQ-ähnlichen 3'-5' Exonuklease (identities= 138/229 (60%)), die vor allem in der *proofreading*-Untereinheit von DNA-Polymerasen auftritt. Deshalb sollte dieses Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 26,8 kDa als Gegenstand einer Bachelorarbeit auf eine mögliche nukleolytische Aktivität hin untersucht werden.

Nachdem das Gen kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert werden konnte, wurde die Exonuklease über Affinitätschromatographie aufgereinigt und für verschiedene Analysen eingesetzt (Pfeifenschneider, 2009). Der optimale Test für einen Exonuklease-Nachweis wäre die Bildung säurelöslicher Nukleotide von radioaktiv markierter DNA. Hier wurde der Einfachheit halber aber die Degradierung linearer DNA im Agarosegel verfolgt. Als Substrat für die mögliche Exonuklease von CMP1 wurde DNA des Phagen T7 gewählt. Diese DNA (39937 bp) ist linear doppelsträngig und hat doppelsträngige *blunt ends*. Durch den Abbau des Substrats von den Enden her wird die DNA kürzer und die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel wird erhöht.

Ähnlich wie bei der Analyse der Aktivität der Endonuklease wurden zunächst die optimalen Versuchsbedingungen für weitere Tests ermittelt. Dazu wurde die Aktivität der Exonuklease in verschiedenen Puffern und bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

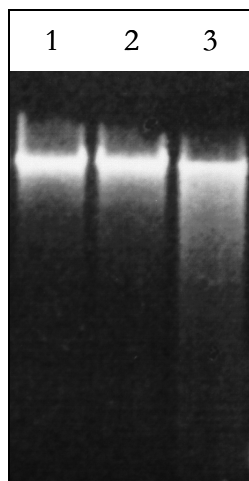


Abb. 29 Degradation von T7-DNA durch die Exonuklease von CMP1. Agarosegelelektrophorese, 0,8% Agarosegel. Inkubation von T7-DNA mit Exonuklease für 1h in NEB-Puffer 3. Spur 1: 25°C, Spur 2: 30°C, Spur 3: 37°C (Pfeifenschneider, 2009).

Erste Aktivitätstests zeigten, dass die Zugabe zweiwertiger Ionen für die Aktivität essentiell ist und die Veränderung der Ionenkonzentration im Puffer (0-150 mM NaCl) keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität hat. Im Bereich von 25-37°C zeigte sich die höchste Aktivität bei 37°C (Abb. 29).

Die Inkubation der T7-DNA mit dem Enzym führte dazu, dass die DNA in der Agarosegelelektrophorese nicht mehr als distinkte Bande vorliegt, sondern in Form von „Schmier“ keine spezifische Banden bildet. Dies resultiert aus den unterschiedlich langen DNA-Molekülen, die durch die Degradation der T7-DNA von den Enden her entstehen. Da bei einem Einsatz von *supercoiled*-DNA als Substrat für das Enzym keine Aktivität nachgewiesen werden

konnte (Daten nicht gezeigt), kann man daraus schließen, dass die T7-DNA von den Enden her degradiert wurde.

Bei allen Experimenten lag ähnlich wie in Abb. 29 ein Großteil der eingesetzten DNA nach der Inkubation mit dem Enzym noch intakt vor, was zum einen auf die geringe Menge an eingesetztem Enzym zurückzuführen ist und was zum anderen auf eine mögliche Prozessivität der Exonuklease schließen lassen könnte. Da das gereinigte Protein sehr gering konzentriert war, konnte keine Sättigung der DNA-Enden mit Proteinmolekülen erreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nukleolytische Aktivität von Gp51 tatsächlich der einer Exonuklease entspricht.

2.8. ThyX von CMP1

Auch unter den „späten Genen“ konnten nach Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen Genprodukte identifiziert werden, die konservierte Domänen für bereits bekannte Proteine besaßen.

orf7 nimmt hier eine besondere Rolle ein, da sein Genprodukt (241 Aminosäuren, MW 27,3 kDa) eine konservierte Domäne, die sich über die gesamte Länge des Protein erstreckt, mit Ähnlichkeiten zu einer Flavin-abhängigen Thymidylat-Synthase ThyX (e-Value = $4e^{-45}$, identities = 139/242 (57%)) besitzt und somit trotz seiner eher untypischen Lokalisation im Genom eine Rolle im DNA-Metabolismus spielen könnte. Zudem hat dieses Genprodukt von allen hypothetischen CMP1-Proteinen die höchste Ähnlichkeit zu einem bereits bekannten Protein, das in diesem Fall das ThyX von *Cmm* und *Cms* ist. Auch der *Rhodococcus*-Phage ReqiPoco6 (Summer *et al.*, 2011) und der *Mycobacterium*-Phage Myrna besitzen ein Gen für eine mögliche Thymidylat-Synthase.

Es sind zwei verschiedene Formen von Thymidylat-Synthasen in Mikroorganismen bekannt, ThyA (EC 2.1.1.45) und ThyX (EC 2.1.1.148). Beide Enzyme sind in der Lage, dUMP zum DNA-Baustein dTMP (Thymidylat) umzuwandeln. Dabei wird durch die Thymidylat-Synthase und die dabei ebenso benötigte Dihydrofolat-Reduktase die Base Thymin auf der Nucleosid-Monophosphat-Stufe durch Methylierung von dUMP gebildet. ThyA und ThyX bedienen sich dabei aber verschiedener Mechanismen. Während bei ThyA Methylen-Tetrahydrofolat sowohl als Methylgruppen-Donor als auch als Quelle für die Reduktionsäquivalente dient und somit Dihydrofolat als Nebenprodukt der Reaktion entsteht (Myllykallio, 2002), ist ThyX auf FAD als Cofaktor angewiesen und ist auch nur an reduzierten Pyrimidin-Nukleotiden aktiv.

Das CMP1-Genprodukt ThyX von *orf7* gehört nach Vorhersage der konservierten Domänen zu der Gruppe der ThyX-Enzyme.

2.8.1. Herstellung von *E. coli thyA*-Mutanten und Komplementation durch ThyX

Es wurde bereits beschrieben, dass ThyX eine *thyA*-Mutation komplementieren kann (Ulmer *et al.*, 2008). Daher sollte diese Fähigkeit als Grundlage für die Überprüfung der Aktivität des Proteins ThyX von CMP1 dienen. *E. coli* besitzt statt eines Gens für eine Thymidylat-Synthase ThyX wie beim Phage CMP1 ein Gen für ein ThyA (Belfort *et al.*, 1983). In *E. coli* SE1 sollte im folgenden Versuch eine *thyA*-Mutation erzeugt werden, die nach Überexpression des *thyX*-Gens von CMP1 komplementiert werden sollte.

Bakterienkulturen, die in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Trimethoprim und Thymin angezogen wurden, enthalten eine hohe Anzahl an Zellen, die nicht in der Lage sind, Thymin zu synthetisieren. Diese Mutanten wachsen auf festen Nährmedien in Anwesenheit von Trimethoprim deutlich schneller als die ursprünglichen Stämme. Deswegen ist diese Methode zur Isolation von *thyA*-Mutanten Erfolg versprechend.

Der für den folgenden Versuch durch die beschriebene Methode erzeugte *E. coli* SE1 *thyA*-Stamm wurde zunächst mit dem Hybridplasmid pSCodonThy transformiert. Eine Kultur dieses Stamms wurde in TBY mit Thymin (10 µg/ml) bei 37°C bis zur log-Phase inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in TBY gewaschen und auf vier Proben aufgeteilt. Während ein Ansatz für die Negativkontrolle ohne jeglichen Zusatz blieb, wurden in die drei weiteren Kulturen entweder Thymin (10 µg/ml) oder IPTG (0,08 mmol) oder beides hinzugegeben. Anschließend wurden die Kulturen weiter bei 37°C inkubiert und das Wachstum der Zellen über 5 h photometrisch und mikroskopisch verfolgt.

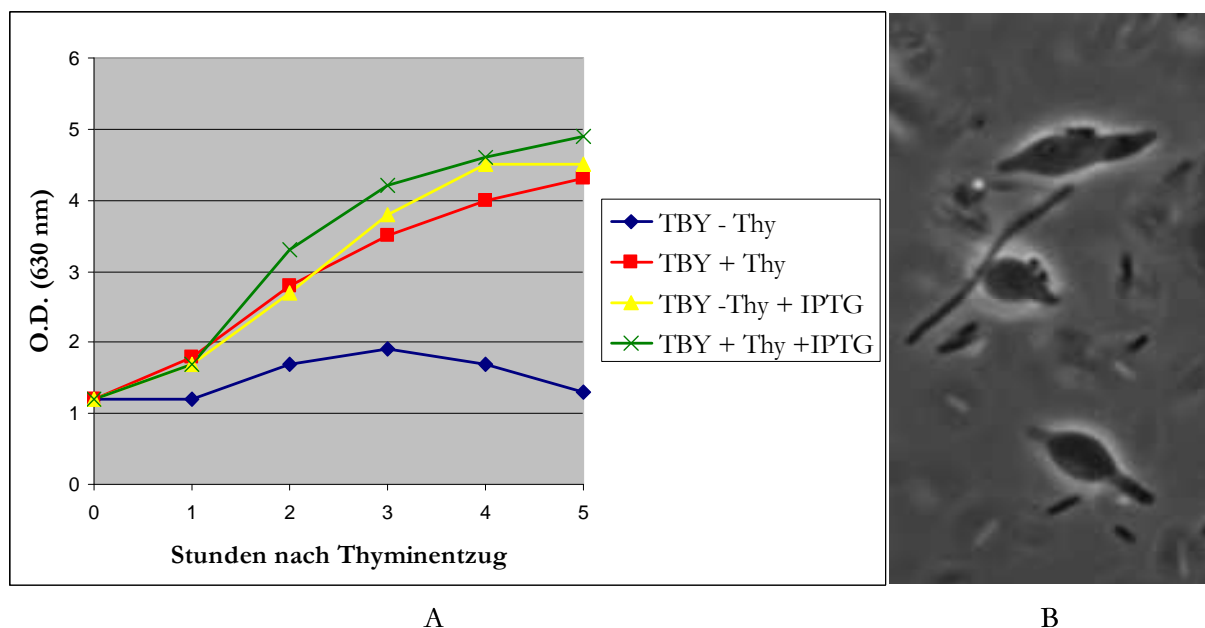


Abb. 30 Komplementation der *thyA* Mutation von *E. coli* SE1 durch ThyX von CMP1 (A) und mikroskopische Aufnahme der *E. coli* SE1 *thyA*-Zellen (630x Vergrößerung) (B) nach 5 Stunden Inkubation ohne Zugabe von Thymin (Thy) (thyminloser Tod).

Die Kultur im thyminfreien Medium zeigte ein eindeutig reduziertes Wachstum gegenüber den übrigen Kulturen (Abb. 30 A). Neben der niedrigeren Zelldichte konnte unter dem Mikroskop auch das Phänomen des „thyminlosen Todes“ beobachtet werden. Die Zellen (Abb. 30 B) bildeten Filamente und zeigten bauchige Ausstülpungen in der Mitte der Zelle, was vermutlich auf einen Defekt bei der Zellteilung hinweist. Thymin-Mangel blockiert die DNA-Synthese und induziert die SOS-Antwort und kann somit Brüche in der DNA hervorrufen, die zum Zelltod führen (Barner and Cohen, 1954; Kuong and Kuzminov, 2010).

Die Kultur, der Thymin hinzugegeben wurde, zeigte dieses Phänomen nicht. Sie erreichte wie erwartet die stationäre Phase ihres Wachstums mit einer hohen Zelldichte. Auch die Zellen, bei denen durch Zugabe von IPTG die Expression des *thy*-Gens von CMP1 induziert wurde, zeigten ohne Thymin-Zugabe ein normales Wachstumsverhalten mit Erreichen der stationären Phase und keinen Defekt in der Zellteilung.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass ThyX des Phagen CMP1 eine *thyA*-Mutation in *E. coli* komplementieren kann, wodurch auch die Aktivität und die vorhergesagte Funktion des exprimierten Genprodukts bestätigt werden konnte.

3. Genprodukte von CMP1 und CN77 zur möglichen Eliminierung von *Clavibacter*

Durch die Sequenzierung und die anschließende Annotation konnten Gene identifiziert werden, deren Genprodukte möglicherweise für den biologischen Pflanzenschutz von Tomatenpflanzen vor *Clavibacter*-Infektionen eingesetzt werden könnten. Besonders interessant sind dabei die Enzyme, die bei der Infektion bzw. Injektion der Phagen-DNA in die Bakterienzelle dem Phagenschwanz das Durchdringen des bakteriellen Peptidoglykans ermöglichen (Moak and Molineux, 2004; Briers *et al.*, 2008), und Proteine des Lyse-Operons, deren essentielle Aufgabe die Lyse des Wirts zur Freisetzung der Phagennachkommenschaft ist. Ebenso könnten Proteine wie EPS-Depolymerasen von Phagen (Adams and Park, 1956) dazu eingesetzt werden, Bakterien durch die Degradation ihrer Exopolysaccharid(EPS)-Schicht angreifbarer für bakteriozide Substanzen zu machen oder auf diese Weise vielleicht die Kolonisation zu verhindern.

Die Exopolysaccharidschicht von Bakterien hat mehrere Funktionen, u. a. können in ihr Nährstoffe, Wasser und Ionen gebunden werden, die von den Bakterien genutzt werden können. Zudem dient das EPS bei phytopathogenen Bakterien auch der Kolonisierung der Wirtspflanzen. Durch Mutationen, die die EPS-Synthese verhindern, verlieren z. B. einige Bakterien ihre Fähigkeit zur Kolonisierung der Pflanzen (Bellemann und Geider, 1992). Eine weitere wichtige Funktion ist der Schutz der phytopathogenen Bakterien vor den Abwehrmechanismen der Pflanzen. Die EPS-Schicht schützt Bakterien z. B. vor oxidativem Stress und anderen Substanzen

der pflanzlichen Abwehr, kann aber z. T. auch verhindern, dass die Bakterien von der Wirtszelle erkannt werden (Romeiro *et al.*, 1981; Kiraly *et al.*, 1997).

Bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (Fulkerson, 1960) und *Rhizobium meliloti* (Niehaus *et al.*, 1993) führt die Reduktion der EPS-Produktion zudem zu einer schwächeren Virulenz. Somit könnte eine EPS-Depolymerase ein aussichtsreicher Kandidat für eine mögliche Anwendung beim biologischen Pflanzenschutz darstellen.

Eindeutig identifiziert wurden im Genom der beiden *Clavibacter*-Phagen nur die Endolysin-Gene. Deshalb wurden diese Genprodukte im Hinblick auf eine spätere Anwendung genauer charakterisiert.

3.1. Die Endolysine von CMP1 und CN77

Sowohl im Genom des *Cmm*-Phagen CMP1 als auch im Genom des *Cmm*-Phagen CN77 konnten nach bioinformatischer Analyse der Genomsequenz die Lyse-Kassetten, die aus einem Holin (*hol*)- und einem Endolysin-Gen (*lys*) bestehen, identifiziert werden. Endolysine sind die Enzyme, die die Zellwand degradieren. Folglich sind sie Erfolg versprechende Kandidaten für einen Einsatz im biologischen Pflanzenschutz.

Die Endolysine von CMP1 und CN77 haben ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 34,8 kDa (LysCMP1) bzw. 31,9 kDa (LysCN77). Während die Aminosäuresequenz des hypothetischen CMP1-Endolysins nur schwache Ähnlichkeiten zu einer Metallo-Endopeptidase mit einer VanY-Domäne aufwies (e-Value= 2,7), konnte für das hypothetische CN77-Endolysin eine konservierte VanY-Domäne (e-Value= $2e^{-19}$, Identities= 57/138 (42%)) im N-terminalen Bereich des Proteins detektiert werden. Die Anwesenheit einer solchen Domäne lässt vermuten, dass beide Endolysine spezifische Peptidasen sind. Vergleiche der Aminosäuresequenzen mit der Datenbank MEROPS (Rawlings *et al.*, 2010) ergaben eine Zugehörigkeit der beiden Endolysine zur Familie der M15-Metallopeptidasen (Wright, 2004). Da die Domäne nur im N-terminalen Teil des Proteins identifiziert wurde, kann vermutet werden, dass auch die Endolysine der beiden *Clavibacter*-Phagen einen modularen Aufbau mit zwei unterschiedlichen Domänen aufweisen.

Um diese Vermutung experimentell zu bestätigen, wurden die beiden Endolysin-Gene zunächst amplifiziert, kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert.

3.2. Expression und Aufreinigung der rekombinanten Endolysine von CMP1 und CN77

Nach der Klonierung der beiden *lys*-Gene und der Transformation von *E. coli* Arctic Express mit den entstandenen Hybridplasmiden wurden log-Zellen des jeweiligen Stamms mit 1 mM IPTG über Nacht bei 15°C induziert. In Extrakten induzierter Zellen konnten deutlich zwei Proteinbanden identifiziert werden, die in der nicht induzierten Probe nicht auftraten. Das

Protein der oberen Bande hatte die erwartete Größe von ca. 35 kDa und repräsentiert vermutlich das rekombinante Endolysin, während das kleinere Protein eine Größe von ca. 16 kDa hat (Abb. 31, A).

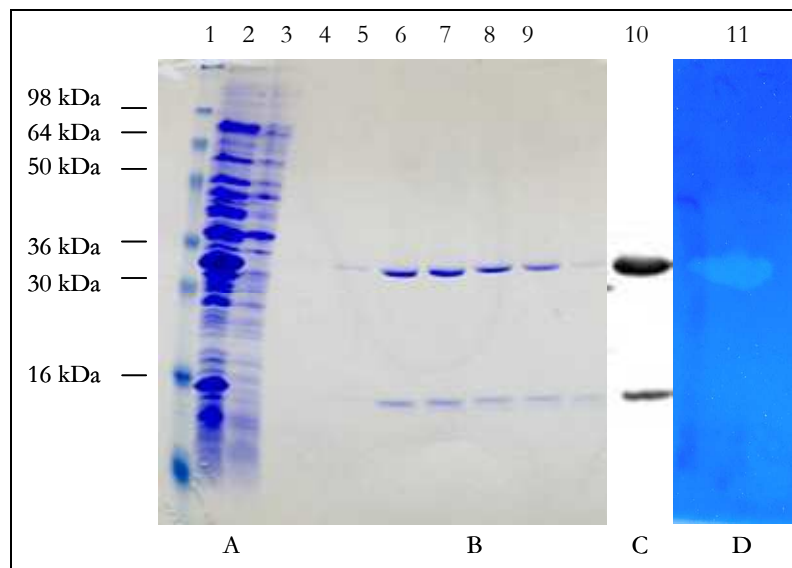


Abb. 31 Überexpression (A) und Aufreinigung des rekombinanten Endolysins von CMP1 (B) (Coomassie-Färbung), Western Blot-Analyse (C), Zymogramm-Analyse mit *Cmi*-Zellen (D). SDS-PAGE, 17,5% Polyacrylamidgel. Spur 1: SeeBlue Pre-stained Protein Standard, Spur 2: Gesamtprotein *E. coli* Arctic Express pSCodonLysCMP1 (induziert), Spur 3: Gesamtprotein *E. coli* Arctic Express pSCodonLysCMP1 (nicht induziert), Spuren 4-9: über His-tag aufgereinigtes LysCMP1, Eluate 2-7, Imidazolgradient (20-300 mM), Spur 10: über His-tag aufgereinigtes LysCMP1, Eluat 3 (Primärer Antikörper Anti-His-Tag, monoklonal aus Maus, Sekundär-Antikörper Anti-Maus –IgG-Alkalische Phosphatase, aus Ziege), Spur 11: Gesamtprotein *E. coli* Arctic Express pSCodonLysCMP1 (induziert).

Nach der Überprüfung der Löslichkeit des Endolysins wurde das Protein über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach der Aufreinigung konnten kaum Kontaminationen durch andere Proteine nachgewiesen werden, allerdings tauchte auch hier die vorher bereits beschriebene, kleinere Proteinbande auf (Abb. 31, B). Die Co-Elution des 16 kDa großen Proteins mit dem Endolysin konnte auch durch Veränderungen der Elutionsbedingungen (Steilheit des Imidazol-Gradienten, pH-Gradient statt Imidazol-Gradient) nicht verhindert werden. Zudem ergab das 16 kDa-Protein auch ein Signal im Western Blot, so dass es sich um den C-terminalen Anteil des Lys-Proteins handeln müsste. Daher wurde vermutet, dass es sich bei diesem kleineren Protein, das nach der Expression des *lys*-Gens parallel zum Endolysin auftritt, um ein Abbauprodukt des Endolysins handelt. Für die weitere Analyse wurde diese Bande aus dem Polyacrylamid-Gel isoliert, gewaschen und tryptisch verdaut. Anschließend wurden die entstandenen Peptide massenspektrometrisch analysiert und mit der MASCOT-Datenbank verglichen, um einen Hinweis auf die Herkunft des Proteins zu erlangen.

```

1 MSENLRPLE PGCVYIGQMD LQLKRRATAK YLTLRRNVFN RTKRWITITY
51 AYGAKRSNAD QQFLVNGWNK RLPGFYYAAP VGKSNHQPGE AFDIYNWAWV
101 GEAVIKKEEA KLGLRRDPSE RWHWNDDGSE PSAIDWSLLE DNMGLEPREEH
151 VMLTRLNDFW TQGEPMHED GLGYRLVRDG SRAAGDARDI SAGIRDKIAE
201 LEKAGAFLNT RMEHIFPDSA GKPRYTTAFD VIRYEPKEHQ NTRDEIAGIK
251 EYIEAMAAPA LTSEQILELA KHIQPIDEEA IIEKVTKAVL QGIRDIFLDA
301 GTPDKK

```

Abb. 32 Vergleich der über Massenspektrometrie analysierten Peptide des 16 kDa Proteins mit der MASCOT-Datenbank (identifizierte Peptide sind rot markiert).

Die identifizierten Peptide stimmten beim Vergleich mit der Aminosäuresequenz aller CMP1-Proteine ausschließlich mit dem C-terminalen Teil des Endolysins von CMP1 überein (Abb. 32). Das Auftreten dieses Proteinfragments des Endolysins lässt sich durch verschiedene Hypothesen erklären. Es könnte sich um eine Proteolyse durch unspezifische Proteasen in *E. coli* handeln, bei der das Endolysin partiell degradiert wird. Dies ist aber unwahrscheinlich, da nur eine spezifische Bande auftritt und weitere Abbauprodukte nicht nachgewiesen wurden. Möglicherweise könnte das Endolysin auch prozessiert werden, so dass nach der Translation ein Teil des Proteins abgespalten wird. Da das *lys*-Gen heterolog in *E. coli* exprimiert wurde und die für die Prozessierung notwendigen Enzyme von *Cmm* fehlen, müsste es sich um eine Autoprozessierung handeln. Dies ist unwahrscheinlich, da wie bereits erwähnt keine weiteren unerwarteten Proteinbanden auftreten, die abgespaltene Proteinfragmente repräsentieren würden.

Am wahrscheinlichsten ist ein möglicher Translations-Restart innerhalb der Nukleotidsequenz des Endolysin-Gens, der für die Synthese des kleineren Proteins verantwortlich ist. Aufgrund dieser Hypothese wurde die DNA-Sequenz des Gens ein weiteres Mal untersucht und so eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz innerhalb des Gens identifiziert, die einen Hinweis auf eine mögliche Expression des C-terminalen Teils des Endolysins unabhängig vom Rest des Gens liefert. Diese Sequenz liegt vier Nukleotide stromaufwärts von einem möglichen ATG-Startcodon, das seinerseits im Leseraster des gesamten Endolysins liegt (Abb. 33). Der Abstand der potentiellen Shine-Dalgarno-Sequenz zum ATG ist so allerdings sehr gering. Der optimale Abstand beträgt 7-9 Nukleotide.

MfeI				RBS						
...GCA	ATT	GAT	TGG	TCT	CTT	TTG	GAG	GAT	AAC	ATG...
... A	I	D	W	S	L	L	E	D	N	M ...
aa 133		135		137		139		141		143

Abb. 33 Zentraler Bereich des *lys*-Gens von CMP1 mit einer möglichen Ribosomenbindestelle (RBS) und einem möglichen ATG-Startcodon.

Ein Translationsstart an dieser Stelle würde ein 166 AS langes Protein ergeben, das möglicherweise die Binde-Domäne des CMP1-Endolysins beinhaltet. Es ist bislang aber nicht bekannt, ob diese Stelle für einen Neustart der Translation nur in *E. coli* oder auch in *Clavibacter* erkannt wird. Bisher wurde eine getrennte Expression einer einzelnen Domäne eines Endolysins in der Literatur noch nicht beschrieben und es ist unklar, welche Funktion diese haben könnte.

Eventuell könnte aber eine ortsspezifische Mutagenese zur Entfernung der Shine-Dalgarno-Sequenz oder des ATG-Startcodons die Aufreinigung des vollständigen Proteins erleichtern und die Verunreinigung mit der Bindedomäne, die das Protein unter Umständen kompetitiv hemmt, verhindern. Da es die Möglichkeit zur Expression in *Clavibacter* nicht gab, konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei der separaten Expression der Bindedomäne um ein Artefakt in *E. coli* handelt.

Auch bei der Expression des *lys*-Gens von CN77 konnte nach Induktion im Rohextrakt eine eindeutige Überexpression detektiert werden. Das errechnete Molekulargewicht des Endolysins von ca. 31,9 kDa stimmt mit der Größe des neu synthetisierten Proteins überein (Abb. 34, A). Allerdings zeigten sich hier im Gegensatz zur Expression des *lys*-Gens von CMP1 keine zusätzlich exprimierte Proteine im Gel. Nach der Überprüfung der Löslichkeit des Proteins wurde das rekombinante Endolysin von CN77 ebenfalls über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Eine SDS-Gelelektrophorese der eluierten Fraktionen zeigte, dass das Protein eindeutig angereichert wurde (Abb. 34, B). Allerdings sind neben dem gewünschten Protein noch drei weitere Banden zu erkennen, die aber bei der Western Blot-Analyse keine Signale ergaben. Hier handelt es sich also wahrscheinlich um Kontaminationen mit Proteinen aus *E. coli*.

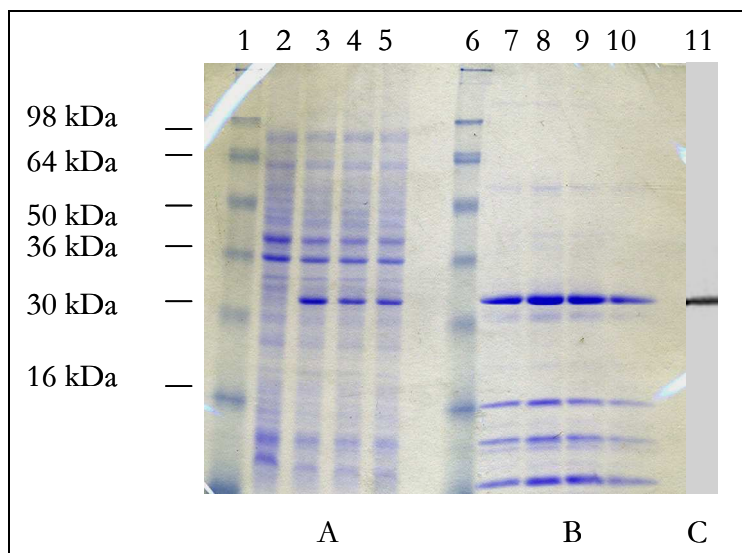


Abb. 34 Überexpression (A), Aufreinigung und Western Blot-Analyse (C) des rekombinanten Endolysins von CN77 (B). SDS-PAGE, 17,5% Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung. Spur 1: SeeBlue Pre-stained Protein Standard, Spur 2: Gesamtprotein *E. coli* Arctic Express pSCodonLysCN77 (nicht induziert), Spuren 3-5: Gesamtprotein *E. coli* Arctic Express pSCodonLysCN77 (induziert), Spur 6: SeeBlue Pre-

stained Protein Standard, Spuren 7-10: über His-tag aufgereinigtes LysCN77, versch. Eluate, Imidazolgradient (20-300 mM), Spur 11: über His-tag aufgereinigtes LysCN77 (Primärer Antikörper Anti-His-Tag, monoklonal aus Maus, Sekundär-Antikörper Anti-Maus –IgG-Alkalische Phosphatase, aus Ziege).

3.3. Biologische Aktivität der Endolysine

Nach der Aufreinigung der in *E. coli* heterolog exprimierten Endolysine sollte nun die Aktivität der Genprodukte untersucht werden. Da *Clavibacter michiganensis* zu den Gram-positiven Bakterien gehört, kann man erwarten, dass exogen hinzugegebenes Endolysin die Zellen von außen lysieren kann. Dieses Phänomen wird oft auch als „*lysis from without*“ bezeichnet (Abedon, 2011). Der Begriff „*lysis from without*“ wurde ursprünglich verwendet, um die Lyse von Wirtsbakterien nach Infektion mit einer sehr hohen Multiplizität an Phagen zu beschreiben. Dabei kommt es zur Lyse, ohne dass eine erfolgreiche Infektion und Phagenvermehrung stattgefunden hat. Die Zellen werden vorzeitig durch Lysozyme der Phagenschwänze lysiert (Delbrück, 1940).

In ersten Versuchen wurde festgestellt, dass die gereinigten Endolysine nur gering konzentriert und schwach aktiv waren. Auch nach Dialyse der eluierten Fraktionen zur Entfernung des Imidazols konnte keine gesteigerte Aktivität detektiert werden. Deshalb wurden die meisten Aktivitätsuntersuchungen mit Rohextrakten durchgeführt. Dabei wurde immer ein Rohextrakt von *E. coli* Arctic Express pSCodon als Negativkontrolle mitgeführt, um Enzymaktivitäten durch *E. coli*-Proteine auszuschließen. Die Versuche wurden stets bei Raumtemperatur und mit *Clavibacter*-Kulturen derselben OD durchgeführt. Die Aktivität der Enzyme wurde so nur qualitativ gezeigt. Die spezifische Aktivität ($\Delta\text{OD}/\text{mg}$ Enzym) konnte auf diese Weise leider nicht bestimmt werden.

Induzierte *E. coli*-Zellen wurden zur Gewinnung des Rohextraktes aus der Kultur sedimentiert, anschließend mit Hilfe der French Press lysiert und der Extrakt durch Zentrifugation geklärt. Dieses Rohlysate wurde für die Aktivitätstests eingesetzt. Dazu wurden zunächst Proben des Rohlysates auf Weichagar mit log-Zellen von *Cmm* getropft. Nach Inkubation über Nacht konnte anschließend in der Tropfzone eine deutliche Aufklärung im Bakterienrasen detektiert werden (Abb. 35).

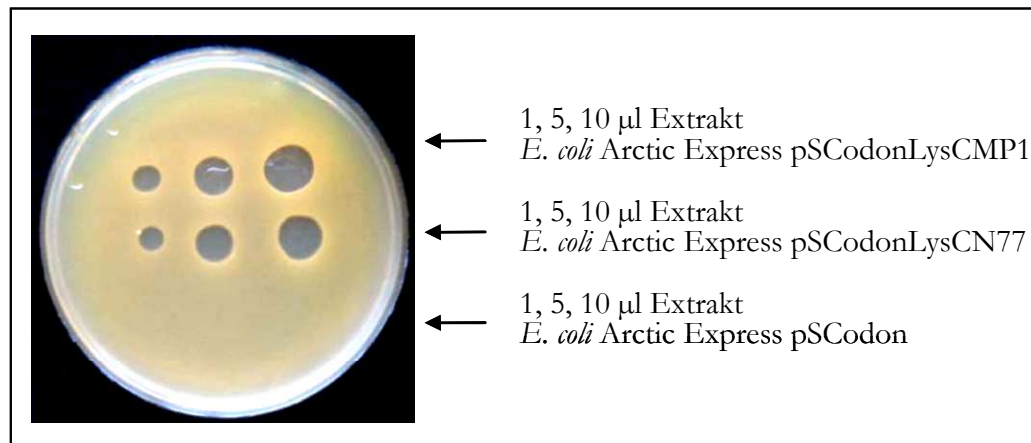


Abb. 35 Überprüfung der Aktivität der Endolysine von CMP1 und CN77 im Agardiffusionstest mit *Cmm* NCPPB3123.

Dabei zeigten sowohl das Endolysin von CMP1 als auch das Endolysin von CN77 einen deutlichen Effekt in Form einer Aufklärung im Bakterienrasen. Das Rohlysate aus einem *E. coli*-Stamm, der nur den Vektor pSCodon trug, zeigte keinen Effekt auf die *Cmm*-Zellen. Tests mit den aufgereinigten Endolysinen ergaben auch Höfe, obgleich diese auch wesentlich kleiner und trüber waren. Mit diesem Testverfahren kann nicht unterschieden werden, ob die Bakterienzellen durch die Endolysine tatsächlich lysiert werden oder ob es nur zu einer Wachshemmung kommt. Um die lytische Aktivität der beiden Endolysine zu verifizieren, wurden Indikatorstämme (*Cmm* NCPPB3123, *Cmm* NCPPB7173, *Cmi* NCPPB1109 und *Cmt* NCPPB7295) in der exponentiellen Wachstumsphase mit Zellextrakten von *lys*-exprimierenden *E. coli*-Zellen in TBY inkubiert und die Abnahme der optischen Dichte für 30 min bei Raumtemperatur bei OD₆₀₀ photometrisch verfolgt. Als Probenvolumen wurden 1 ml der jeweiligen Bakteriensuspension und 30 µl Rohlysate eingesetzt. Alle Versuche wurden mit verschiedenen Extrakten mindestens drei Mal wiederholt. Da die Enzymkonzentrationen in den Extrakten nicht immer gleich hoch waren, waren die absoluten Werte nicht gleich, aber der Verlauf der einzelnen Kurven zueinander konnte reproduziert werden. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf für jeden Versuch jeweils eine Messung exemplarisch dargestellt.

Als Indikator wurden nicht nur die Wirtsstämme der Phagen CMP1 und CN77, sondern auch weitere *Clavibacter*-Subspezies wie *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*) oder *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (*Cmt*) eingesetzt, um das Wirtsspektrum bzw. die Spezifität der Endolysine zu ermitteln. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit *Cmm*-Zellen ohne Zugabe von Endolysin eingesetzt.

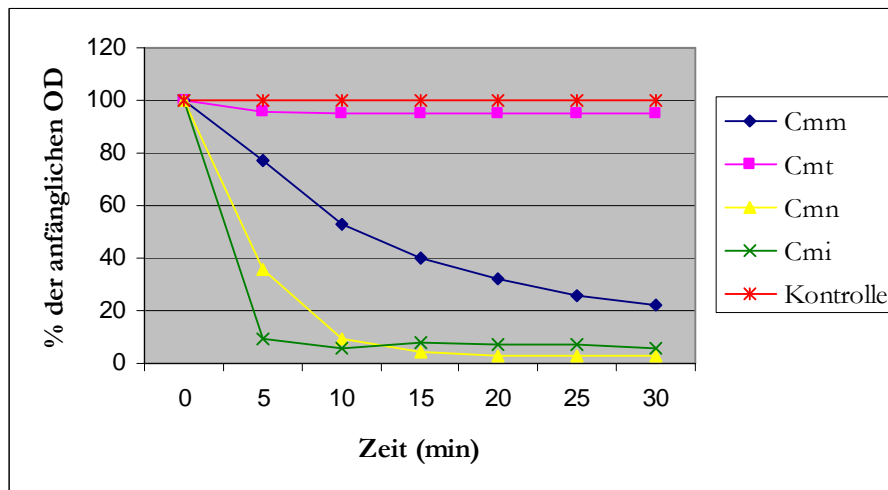


Abb. 36 Lyseaktivität des Endolysins von CMP1 gegenüber verschiedenen *Clavibacter michiganensis*-Subspezies.

In Abb. 36 lässt sich anhand der Abnahme der optischen Dichte deutlich die lytische Aktivität des CMP1- Endolysins erkennen. Allerdings gab es Unterschiede bei der Aktivität mit den unterschiedlichen Stämmen als Substrat. Bereits nach fünf Minuten sind nur noch weniger als 20 Prozent der eingesetzten *Cmi*-Zellen vorhanden. Einen ähnlichen Effekt hat dieses Endolysin auch auf *Cmn*-Zellen, allerdings läuft die Lyse dieser Zellen etwas langsamer ab. *Cmm*-Zellen werden auch sukzessiv lysiert, so dass am Ende des Versuchs nur noch ca. 20% der anfänglichen OD gemessen werden konnte. *Cmt*-Zellen scheinen durch das CMP1-Endolysin nicht lysiert zu werden, da die OD dieses Ansatzes nicht abnimmt und wie die Negativ-Kontrolle über den gesamten Versuchszeitraum konstant bleibt. In einem weiteren Versuch wurde die Aktivität des Endolysins von CN77 gleichermaßen analysiert. Auch hier wurde als Kontrolle ein Ansatz mit *Cmm*-Zellen ohne Zugabe von Endolysin eingesetzt.

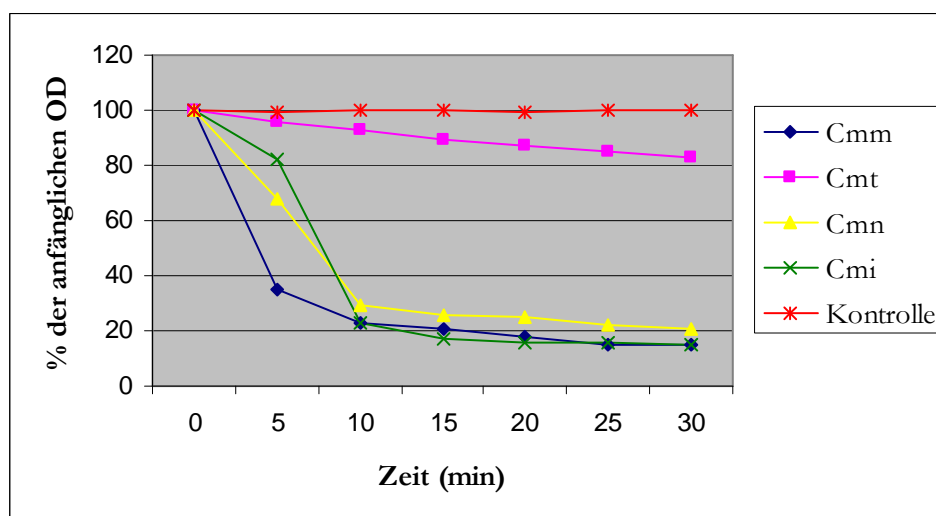


Abb. 37 Lyseaktivität des Endolysins von CN77 gegenüber verschiedenen *Clavibacter michiganensis*-Subspezies.

Abb. 37 zeigt ähnlich wie im vorherigen Diagramm eindeutig die lytische Aktivität des untersuchten Endolysins. Bereits nach fünf Minuten sind mehr als 60% Prozent der *Cmm*-Zellen und auch schon 30% der *Cmn*-Zellen lysiert. Nach 10 min sind ca. 80% der Zellen aller Stämme mit Ausnahme von *Cmt* lysiert.

Im Vergleich lässt sich erkennen, dass beide Endolysine sowohl *Cmn* und *Cmm* als auch *Cmi* lysieren. Dabei scheint *Cmi* am sensitivsten zu sein, da in den Versuchen diese Zellen am schnellsten lysierten. *Cmt* dagegen wird vom CMP1-Endolysin gar nicht und vom CN77-Endolysin nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen lysiert. Die auffälligen Unterschiede in der Lyse der *Clavibacter michiganensis*-Subspezies durch die beiden Endolysine können verschiedene Ursachen haben. Sie könnten zum einen auf unterschiedlichen Zellwandstrukturen der verschiedenen Subspezies zurückzuführen sein. Laut Literaturdaten (Kandler und Schleifer, 1972) sind aber zumindest die Grundbausteine der Zellwände identisch. Kleinere Modifikationen wie z. B. Acetylierungen an der Diaminobuttersäure sind aber nicht ausgeschlossen (z. B. bei *Cmi*). Eine weitere Erklärung könnte im Zugang des Enzyms zur Zellwand liegen. Möglicherweise verhindern z. B. EPS-Auflagerungen auf der Zelloberfläche den Angriff des Endolysins von außen, so dass das Endolysin nicht binden und lytisch wirksam sein kann. Die OD nahm in den Versuchen oft zunächst sehr schnell ab und sank bis auf ein bestimmtes Niveau ab, das anschließend aber konstant blieb. Eine komplette Lyse aller Zellen konnte nie erreicht werden. Dies lässt vermuten, dass eventuell andere Komponenten der Zellhülle, die eventuell nur in bestimmten Wachstumsphasen vorliegen, die Aktivität der Endolysine zulassen oder verhindern (Steen *et al.*, 2003).

Das Endolysin von CN77 scheint bei ähnlicher Konzentration eine höhere Aktivität als das CMP1-Endolysin zu besitzen. Dies lässt sich möglicherweise mit der gleichzeitigen Anwesenheit des 16 kDa großen Proteins, das die einzelne Bindedomäne vom CMP1-Endolysin repräsentiert, begründen. Eventuell blockiert es potentielle Bindestellen für das intakte Endolysin und hemmt so die Aktivität kompetitiv.

3.4. Biochemische Eigenschaften der Endolysine

Nachdem bereits Unterschiede der beiden Endolysine in der Spezifität gegenüber verschiedenen *Clavibacter*-Subspezies festgestellt werden konnten, sollten noch weitere Eigenschaften der beiden Endolysine untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der Enzyme unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Ziel war dabei die Optimierung der Versuchsbedingungen für eine möglichst hohe Aktivität der Enzyme auch im Hinblick auf den Einsatz beim biologischen Pflanzenschutz.

Da Vergleiche der Aminosäuresequenzen der beiden Endolysine mit der MEROPS-Datenbank zu der Vermutung führten, dass es sich bei den beiden Endolysinen um Zink-Metallopeptidasen handelt, wurde als erstes die mögliche Abhängigkeit der Aktivität von zweiwertigen Ionen wie z. B. Zn^{2+} untersucht. Dazu wurde zu verschiedenen Versuchsansätzen 25 mM EDTA als Chelator hinzugegeben. In diesem Versuch wurde *Cmm* als Indikatorstamm eingesetzt. Die Abnahme der OD_{600} wurde nach Zugabe des Endolysins photometrisch verfolgt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit *Cmm*-Zellen, dem weder Endolysin noch EDTA hinzugefügt wurde.

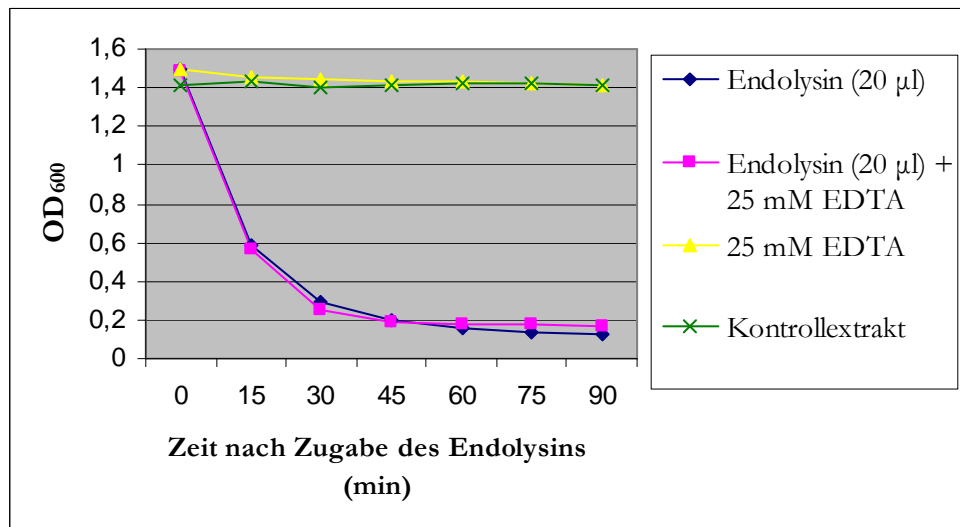


Abb. 38 Abhängigkeit der lytischen Aktivität des CMP1-Endolysins von zweiwertigen Ionen. *Cmm*-Zellen wurden zunächst sedimentiert und in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 50 mM NaCl, ± 25 mM EDTA und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Endolysin.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass durch EDTA die Aktivität des CMP1-Enzyms nicht gehemmt wird (Abb. 38). In der Probe, der neben dem Endolysin zusätzlich EDTA hinzugegeben wurde, konnten dieselbe lytische Aktivität und Abnahme der optischen Dichte detektiert werden wie in Ansätzen ohne EDTA. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung des Endolysins von CN77 mit *Cmm* als Substrat erhalten werden. Zweiwertige Ionen werden für die Aktivität der Enzyme also wahrscheinlich nicht benötigt. Eine Erhöhung der Aktivität durch Zugabe von zweiwertigen Ionen (2 mM $ZnCl_2$ oder 10 mM $MgCl_2$) war ebenfalls nicht festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Um eventuell die Aktivität der Enzyme noch zu steigern, wurde das pH-Optimum der beiden Enzyme bestimmt. Dazu wurden 1 ml Indikatorzellen (*Cmm* für CMP1 und *Cmm* für CN77, $OD_{600}=1$) sedimentiert und in 1 ml Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl mit unterschiedlichen pH-Werten zwischen 4,8 und 9,5, 50 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert.

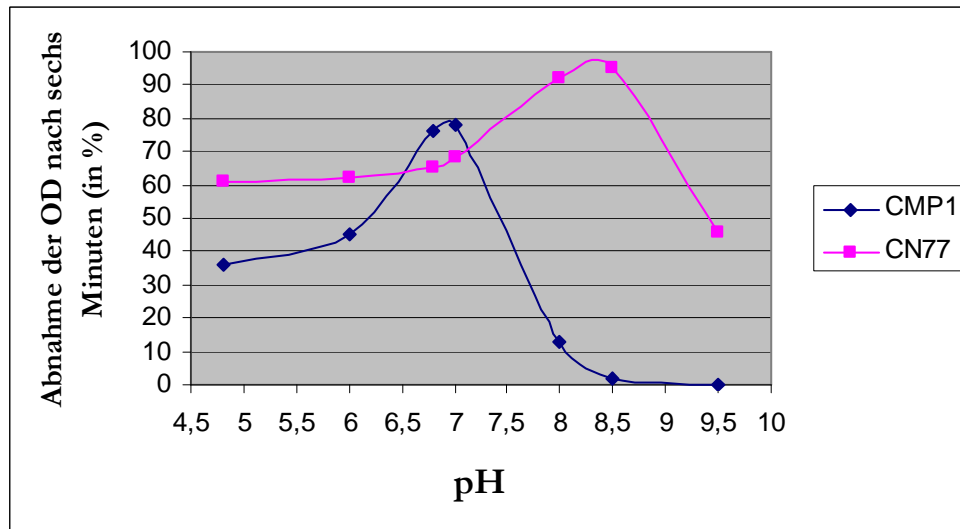


Abb. 39 Abhängigkeit der lytischen Aktivität der Endolysine von CMP1 und CN77 vom pH-Wert. Indikatorzellen wurden in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol) mit verschiedenen pH-Werten resuspendiert und anschließend mit Endolysin für 12 Minuten inkubiert. Die Lyse der Zellen wurden photometrisch verfolgt.

Anschließend wurde Endolysin zu den Proben hinzugefügt und die Abnahme der optischen Dichte photometrisch verfolgt. Die Daten im Diagramm (Abb. 39) entsprechen den ermittelten Werten 6 min nach Zugabe der Endolysine. Zu diesem Zeitpunkt waren die meisten Zellen schon lysiert.

Anhand dieses Versuchs konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Enzyme verschiedene pH-Optima aufweisen. Während das Endolysin von CMP1 seine höchste Aktivität im neutralen Bereich um pH 7 zeigt, ist das CN77-Endolysin im pH-Bereich von 8-9 am aktivsten. Beide Enzyme zeigen aber ebenfalls eine Aktivität im leicht sauren Bereich von pH 7-5. Bei beiden Endolysinen war zu beobachten, dass die Aktivität stark nachließ, sobald das Optimum überschritten wurde. Dieses Phänomen konnte auch bereits bei Endolysinen von anderen Phagen gezeigt werden. Dabei zeigten diese ihre höchste Aktivität im pH-Bereich zwischen 5 und 7 und verloren außerhalb dieses Bereichs schnell ihre Aktivität (Loeffler *et al.*, 2003; Yoong *et al.*, 2004). Eine Ausnahme bildet hier PlyPH, ein Protein mit lytischer Aktivität gegen *Bacillus anthracis*. Es zeigte über den Bereich von pH 4 – 10,5 eine hohe enzymatische Aktivität (Yoong *et al.*, 2006).

Die Aktivität des Endolysins von CMP1 bei leicht saurem pH-Wert war von entscheidender Wichtigkeit für den weiteren Verlauf dieser Arbeit, denn dies ist eine Voraussetzung für die Nutzung des Endolysins zur Biokontrolle von *Cmm* in einer transgenen Tomate.

Damit z. B. eine Endolysin-exprimierende Tomatenpflanze erfolgreich in der Abwehr von *Cmm* ist, muss das Endolysin im Xylemsaft der Pflanze aktiv sein, um die Bakterien bei einer möglichen Infektion direkt eliminieren zu können. Xylemsaft von Tomatenpflanzen hat einen

pH-Wert von 5,5-6 und ist damit leicht sauer (White *et al.*, 1981). Damit würde das Endolysin von CMP1 aufgrund seines pH-Optimums vermutlich aktiver sein als das CN77-Endolysin. Um zu analysieren, ob das CMP1-Endolysin tatsächlich auch in Xylemsaft aktiv ist, wurde dieser aus 4 Wochen alten Tomatenpflanzen isoliert. Stationäre Zellen aus 1 ml Kultur eines *Cmm*-Indikatorstamms wurden sedimentiert und anschließend in Xylemsaft bzw. Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 5,7, 50 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach Zugabe des Endolysins wurde die Abnahme der optischen Dichte wieder photometrisch verfolgt.

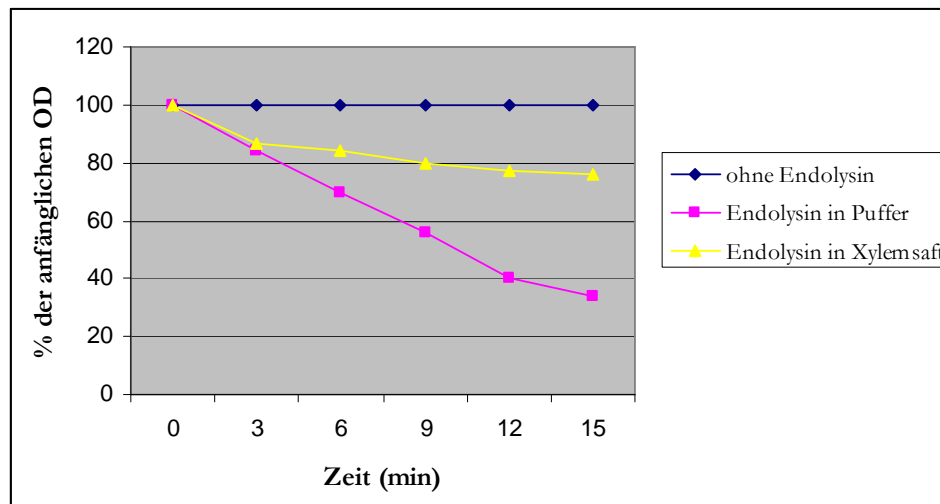


Abb. 40 Lytische Aktivität des CMP1-Endolysins in Xylemsaft von Tomatenpflanzen. Sedimentierte Indikatorzellen wurden in Xylemsaft bzw. Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 5,7, 50 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend mit Endolysin inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt.

Die Ergebnisse (Abb. 40) zeigen deutlich, dass das Endolysin auch im Xylemsaft aktiv ist, allerdings ist die Aktivität im Vergleich zu dem Reaktionspuffer deutlich reduziert. Die Ursachen dafür sind unklar. Möglicherweise spielt die Zusammensetzung des Xylemsafts dabei eine entscheidende Rolle.

3.5. „Module-shuffling“ und Konstruktion von Chimär-Endolysinen

Wie in der Einleitung in Kapitel 3.4.2. beschrieben bestehen Endolysine von Phagen mit Gram-positiven Wirten meistens aus zwei unterschiedlichen Domänen für die Substraterkennung bzw. die Spaltung des Peptidoglykans. Dieser modulare Aufbau der Phagen-Endolysine bietet die Möglichkeit, durch den Austausch einzelner Proteindomänen die Aktivität, Stabilität oder Expressionsrate der Endolysine zu optimieren. In der Literatur wurde auch die Hypothese aufgestellt, dass Bakteriophagen sich durch den modularen Aufbau von Proteinen und der damit verbundenen Möglichkeit zur Konstruktion neuer Chimär-Proteine besser an Mutationen und Veränderungen der Umgebung anpassen können (Díaz *et al.*, 1991). Der Austausch von einzelnen

Domänen ist also ein Phänomen, das auch natürlich vorkommen kann. Ein Beispiel dafür kann beim *Streptococcus*-Phagen Dp-I beobachtet werden. Sein Endolysin Pal scheint intergenerischen Ursprungs zu sein, da die N-terminale Domäne starke Ähnlichkeiten zur N-terminalen Domäne einer Mureinhydrolase des *Lactococcus*-Phagen BK5T (Mahanivong *et al.*, 2001) aufweist, während die C-terminale Domäne den Cholin-bindenden Domänen von Endolysinen von *Streptococcus*-Phagen ähnelt (Sheehan *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2000).

Der Austausch von Domänen wurde bereits bei einigen Autolysinen und Phagen-Endolysinen erfolgreich durchgeführt (Díaz *et al.*, 1990, Croux *et al.*, 1993), wobei die einzelnen Domänen anschließend ihre Funktion behielten, aber z. B. die Spezifität verändert wurde. Durch die Konstruktion eines chimären Endolysins gegen *Staphylococcus aureus* konnte im Vergleich zu den ursprünglichen Proteinen die Löslichkeit des Endolysins nach der heterologen Expression deutlich gesteigert werden (Manoharadas *et al.*, 2009). Alcántara *et al.* (2007) konstruierten aus Domänen der Lysozyme von T7 und K11 Chimär-Lysozyme, deren Aktivität und Thermostabilität höher als die der ursprünglichen Enzyme waren. Außerdem gibt es Beispiele für Endolysine, deren lytische Aktivität nach dem Verlust der Bindedomäne erhöht wurde (Loessner *et al.*, 1998; Baba and Schneewind, 1996). Die Optimierung von lytischen Proteinen im Hinblick auf ihre Spezifität, Stabilität und Aktivität ist also durchaus möglich.

Mittels eines „*module-shufflings*“ der beiden Endolysine von CMP1 und CN77 sollte auch hier der Beantwortung der Fragen nach der Ursache der hohen Spezifität, der Steigerung der Aktivität oder der Konstruktion eines Chimär-Endolysins mit mehreren katalytischen Domänen dienen.

3.5.1. Analyse der Nukleotidsequenzen der Endolysin-Gene von CN77 und CMP1

In Kapitel 3.2. wurde bereits beschrieben, dass bei der Expression des *lys*-Gens von CMP1 neben dem erwarteten Endolysin auch noch ein weiteres Protein separat exprimiert wurde, das vermutlich die C-terminale Domäne des Endolysins zur Bindung an das Substrat, in diesem Fall das Peptidoglykan, repräsentiert. Für den N-terminalen Bereich konnte durch eine PSI-BLAST-Analyse eine katalytische Domäne vorhergesagt werden.

In den Nukleotidsequenzen der beiden Endolysin-Gene konnte jeweils ein weiteres ATG-Startcodon im Zentrum des Gens identifiziert werden, das auch im gleichen Leseraster des eigentlichen Startcodons liegt. Vor diesen beiden Startcodons liegt jeweils eine mögliche Ribosomenbindestelle (5'...AGGA...3') und eine Schnittstelle des Restriktionsenzym MfeI (Abb. 41).

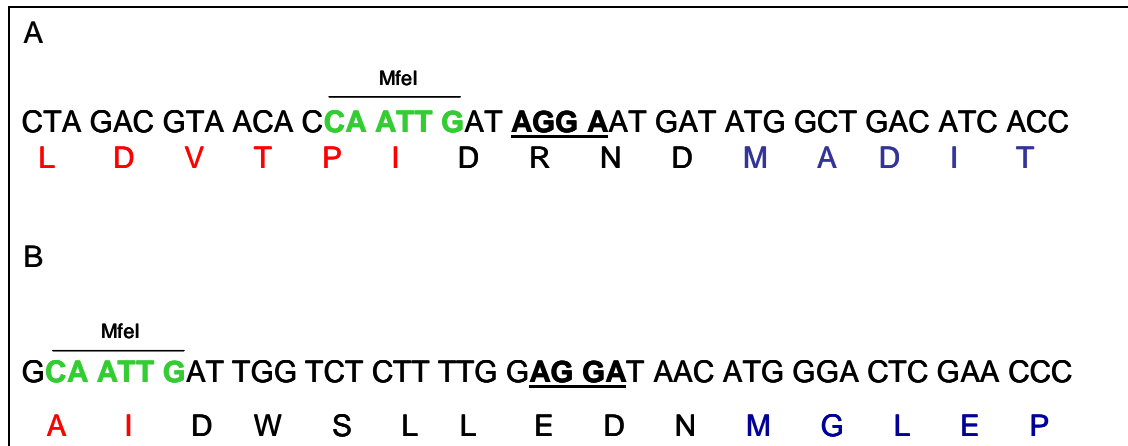


Abb. 41 Analyse der Nukleotidsequenzen der beiden Endolysin-Gene (A CN77, B CMP1) im Bereich zwischen den beiden potentiellen Domänen. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym MfeI wurde grün, Aminosäuren der jeweiligen katalytischen Domänen wurden rot und Aminosäuren der jeweiligen Bindedomäne wurden blau markiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass die Bindedomäne zur Substratbindung des CMP1-Endolysins bei Aminosäure 143 und die des CN77-Endolysins bei Aminosäure 151 beginnen könnte.

3.5.2. Spezifische Markierung von *Clavibacter* durch ein Fusionsprotein aus der Peptidoglykan-bindenden Domäne und GFP

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die MfeI/XhoI-Abschnitte der beiden *lys*-Gene von CMP1 und CN77 die jeweilige Bindedomäne kodieren, wurden diese mit dem *egfp*-Gen fusioniert. Anschließend sollte überprüft werden, ob eine spezifische Bindung der Bindedomäne an *Clavibacter*-Zellen mikroskopisch nachweisbar ist.

Für die Klonierung wurde zunächst das Gen für das eGFP aus dem Plasmid pGEMegfp (M. Flügel) mit Hilfe von Primern so amplifiziert, dass es anschließend gegen die katalytischen Domänen in pSCodonLysCMP1 bzw. pSCodonLysCN77 ausgetauscht werden konnte. Für die Expression der beiden Fusionsproteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21 mit den auf diese Weise neu konstruierten Hybridplasmiden transformiert. Die Induktion der log-Zellen erfolgte anschließend mit 1 mM IPTG bei 25°C. Induzierte Zellen fluoreszierten unter UV-Licht deutlich grün.

Nach der Induktion konnte in einem SDS-Gel eine deutliche Überexpression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zellen der induzierten Kulturen wurden sedimentiert und anschließend mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Die beiden Fusionsproteine aus dem Rohextrakt wurden anschließend über Affinitätschromatographie angereichert.

Im Folgenden sollte durch Fluoreszenzmikroskopie die spezifische Bindung an *Clavibacter*-Zellen gezeigt werden. Für die Tests wurden *Clavibacter michiganensis*-Zellen zunächst auf einem Objektträger über Hitzeeinwirkung fixiert und anschließend mit den aufgereinigten Fusionsproteinen inkubiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung nicht gebundener Proteine wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Nach der Inkubation mit dem Fusionsprotein GFP-BCMP1 konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt werden, dass einige *Cmm*- und *Cmm*-Zellen grün fluoreszierten (Abb. 42). Zur Kontrolle, dass das eGFP-Protein nicht unspezifisch an die Zellen bindet, wurden die Zellen auch mit eGFP wie beschrieben behandelt. Hier konnte keine Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

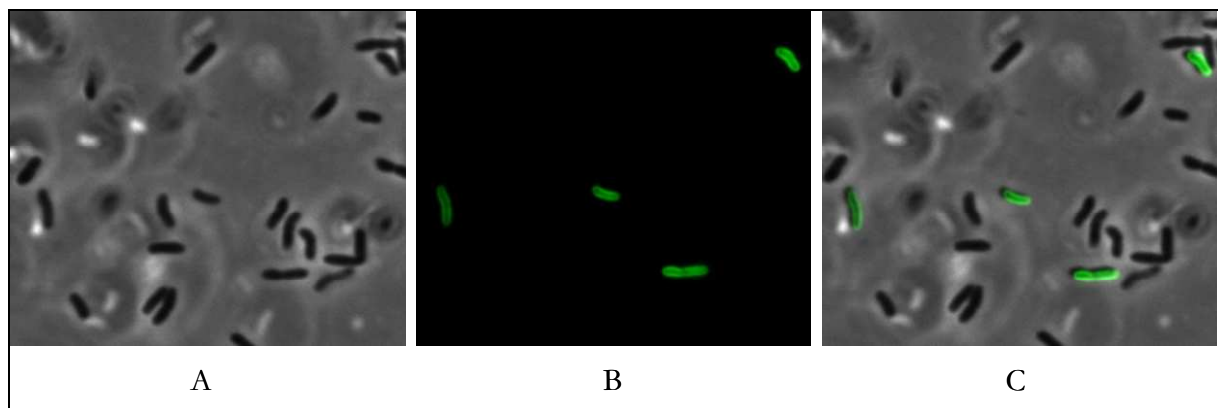


Abb. 42 *Cmm*-Zellen nach Inkubation mit GFP-BCMP1 (630x Vergrößerung) (A Durchlicht-Aufnahme, B Fluoreszenz-Aufnahme, C Overlay).

Dadurch konnte eindeutig die Funktion dieser Domäne des Endolysins, nämlich die Bindung an das Peptidoglykan, nachgewiesen werden. Allerdings fluoreszierten nicht alle Zellen, sondern nur ein geringer Anteil, der dafür aber sehr stark. Bei der Expression des Fusionsproteins war wie beim intakten Endolysin wiederum eine Co-Expression des 16 kDa Proteins, also der Bindedomäne, zu erkennen. Die einzelne unmarkierte Bindedomäne könnte also die Anfärbung der Zellen durch das Fusionsprotein verschlechtern. Allerdings würde man dann erwarten, dass alle Zellen, zumindest schwach fluoreszieren. Dass einige Zellen stark und andere gar nicht fluoreszieren, muss also eine andere Ursache haben. Das Protein könnte nach einem kooperativen Mechanismus binden, allerdings müsste dann durch eine Steigerung der Proteinkonzentration auch eine Sättigung aller Zellen mit dem Protein erreicht werden. Das konnte im Experiment nicht beobachtet werden. Wie schon in Kapitel 3.3. beschrieben könnten sich die fluoreszierenden Zellen in einem anderen physiologischen Zustand befinden als die übrigen nicht markierten Zellen (z. B. kurz vor oder nach der Zellteilung). Komponenten der Zelloberfläche könnten je nach Zustand der Zelle die Bindung des Proteins erlauben oder verhindern (Steen *et al.*, 2003).

Zu dieser Hypothese würde auch eine weitere Beobachtung passen, dass bei einigen *Clavibacter*-Zellen nur kleine Bereiche der Zellen angefärbt waren. Diese lagen zumeist im Bereich der so genannten *snapping division* oder an den Zellpolen (Abb. 43).

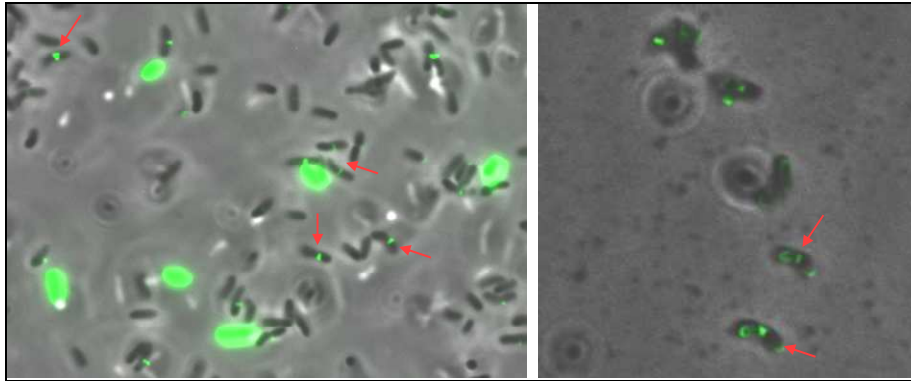


Abb. 43 Partielle Anfärbung von *Cmm*-Zellen (630x Vergrößerung) mit GFP-BCMP1 im Bereich der „*snapping division*“.

Die bevorzugte Bindung von GFP-BCMP1 an diese Regionen ist vermutlich auf Modifikationen oder Besonderheiten der Zellwand in diesem Bereich zurückzuführen. Nach Inkubation von *Cmm*- und *Cmn*-Zellen mit GFP-BCN77 konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Allerdings fiel im Vergleich auf, dass nach der Behandlung von Zellen mit GFP-BCN77 ähnlich wie nach Inkubation mit GFP-BCMP1 wenige Zellen sehr stark fluoreszierten, dafür im Vergleich aber insgesamt mehr Zellen schwach fluoreszierten (Abb. 44). Dies ist vermutlich auf den fehlenden inhibitorischen Effekt der zweiten exprimierten Bindedomäne ohne GFP-Fusion zurückzuführen. Hier konnten ebenso Regionen der Zellen identifiziert werden, an die das GFP-Fusionsprotein bevorzugt bindet. Diese Beobachtungen wurden auch schon bei ähnlichen Versuchen mit anderen Bakterien gemacht (Loessner *et al.*, 2002, Pritchard *et al.*, 2004).

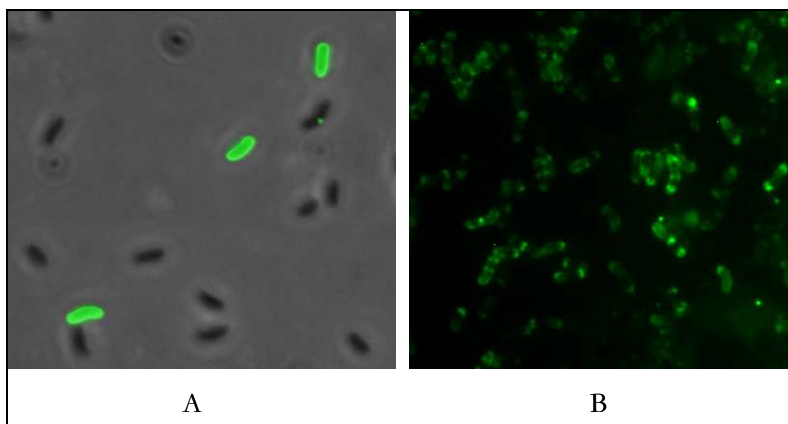


Abb. 44 *Cmn*-Zellen (630x Vergrößerung) nach Inkubation mit GFP-BCMP1 (A, Overlay-Bild) und GFP-BCN77 (B, Fluoreszenz-Aufnahme).

Anschließend wurde versucht, durch verschiedene Behandlungen der Zellen (TCA, Aceton, SDS) die Anzahl der fluoreszierenden Zellen zu erhöhen. Die verschiedenen Substanzen, mit denen die Zellen gewaschen wurden, sollten dabei die Möglichkeit zur Bindung der Fusionsproteine erhöhen. Die Behandlung von Zellen mit SDS sollte Zellwand-assoziierte Proteine entfernen, die Behandlung mit Trichloressigsäure (TCA) wurde durchgeführt, um Zellwand-Polymere wie z. B. Teichonsäuren zu beseitigen (Steen *et al.*, 2003). Diese Versuche führten aber nicht zu einer gesteigerten Bindung des Proteins.

Die Bindung der beiden Proteine an das Peptidoglykan von *Cmt* konnte ebenfalls gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Es konnten nach der Inkubation mit den jeweiligen Proteinen fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden, allerdings war deren Anzahl ähnlich wie bei *Cmm* und *Cmn* sehr gering. Schon bei fraktionierten Ausstrichen der einzelnen Subspezies lassen sich auf TBY-Nährmedium eindeutige Unterschiede zwischen den Subspezies erkennen. *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (*Cmt*) lässt sich sehr schlecht von den Agarplatten lösen und in Flüssigmedium resuspendieren, während bei den anderen Subspezies dies problemlos gelingt. Passend zu diesen Beobachtungen wird *Cmt* auch kaum durch die Endolysine lysiert. Die Zugänglichkeit des Peptidoglykans von außen ist in diesem Fall vermutlich durch die Bildung von Exopolysacchariden oder anderen Oberflächenpolymeren für die Endolysine nicht gegeben, wodurch diese nicht binden und enzymatisch aktiv sein können.

Als weitere Kontrollen wurden auch andere Bakterienstämme (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* und *Rathayibacter iranicus*) mit den beiden Fusionsproteinen behandelt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bei keinem Stamm konnten dabei fluoreszierende Zellen identifiziert werden. In Mischpräparaten mit morphologisch unterschiedlichen Bakterien konnten nur fluoreszierende coryneforme *Clavibacter*-Zellen identifiziert werden. Es war angedacht worden, die Markierung mit den Fusionsproteinen als Testsystem zur Identifizierung oder Separierung von *Clavibacter* zu nutzen, wie es bereits in der Literatur für andere pathogene Bakterien beschrieben wurde (Kretzer *et al.*, 2007; Schmelcher *et al.*, 2010). Da die Markierung aber unvollständig blieb, ist diese Anwendung nicht möglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass, wie in anderen Fällen beschrieben, ein Fusionsprotein aus GFP und Bindedomäne nicht geeignet ist, um *Clavibacter* eindeutig zu identifizieren. Zum anderen ist damit auch eine zuverlässige Therapie mit dem gereinigten Enzym unwahrscheinlich geworden. Trotz relativ hoher Stabilität könnte die Oberflächenbeschaffenheit der Wirtsbakterien eine schnelle und quantitative Eliminierung verhindern. Allerdings haben die Experimente die Vorhersage der Bindedomänen als richtig bestätigt.

3.5.3. Klonierung und Expression der Derivate von CN77- und CMP1-Endolysingenen

Nachdem im vorherigen Experiment geklärt worden war, dass durch die MfeI-Schnittstelle die kodierenden Bereiche von katalytischer und Peptidoglykan-bindender Domäne getrennt werden können, wurde ein „*module-shuffling*“ durchgeführt. Dazu wurden die bereits bestehenden Hybridplasmide pSCodonLysCMP1 und pSCodonLysCN77 mit MfeI und XhoI hydrolysiert. Anschließend wurden die entstandenen Fragmente, die die Bindedomäne beinhalteten, in das jeweils andere hydrolysierte Plasmid inseriert. Zudem wurden auch die einzelnen Domänen der beiden Gene kloniert. Eine Übersicht über die Konstrukte zeigt die Tabelle 5.

Für die Klonierung der katalytischen Domänen wurde das DNA-Fragment mit der Bindedomäne durch eine MfeI/XhoI-Spaltung deletiert. Die *sticky ends* wurden für die anschließende Ligation durch eine Behandlung mit Exonuklease VII entfernt. Für die Konstruktion der Plasmide, die nur den Teil des Gens, der für die Bindedomäne codiert, tragen sollten, wurden nach der Deletion (MfeI/NdeI) des Fragments mit der katalytischen Domäne die *sticky ends* vor der Ligation durch die T4 DNA Polymerase aufgefüllt.

Protein	Gen (bp)	Anzahl AS (mit His-Tag)	MW (kDa)	Enthaltene Domänen	seltene Codons
LysCMP1	942	314	35,9	Katalytische und Bindedomäne CMP1	<i>argU</i> AGA: 2, AGG: 1, <i>ileX</i> ATA: 1, <i>glyT</i> GGA: 4, <i>leuW</i> CTA: 5, <i>proL</i> : CCC 4
BCMP1	516	172	19,5	Bindedomäne CMP1	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0, <i>ileX</i> ATA: 0, <i>glyT</i> GGA: 2, <i>leuW</i> CTA: 1, <i>proL</i> : CCC 3
KCMP1	417	139	16,2	Katalytische Domäne CMP1	<i>argU</i> AGA: 2, AGG: 1, <i>ileX</i> ATA: 1, <i>glyT</i> GGA: 2, <i>leuW</i> CTA: 4, <i>proL</i> : CCC 1
LysCN77	894	298	32,9	Katalytische und Bindedomäne CN77	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 2, <i>ileX</i> ATA: 0, <i>glyT</i> GGA: 2, <i>leuW</i> CTA: 1, <i>proL</i> : CCC 2
BCN77	444	148	16,0	Bindedomäne CN77	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 1, <i>ileX</i> ATA: 0, <i>glyT</i> GGA: 0, <i>leuW</i> CTA: 0, <i>proL</i> : CCC 1
KCN77	453	151	17,1	Katalytische Domäne CN77	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0, <i>ileX</i> ATA: 0, <i>glyT</i> GGA: 2, <i>leuW</i> CTA: 1, <i>proL</i> : CCC 1
KCMP1-BCN77	858	286	32,1	Katalytische Domäne CMP1 und Bindedomäne CN77	<i>argU</i> AGA: 2, AGG: 3, <i>ileX</i> ATA: 1, <i>glyT</i> GGA: 2, <i>leuW</i> CTA: 4, <i>proL</i> : CCC 2
KCN77-BCMP1	978	326	36,8	Katalytische Domäne CN77 und Bindedomäne CN77	<i>argU</i> AGA: 0, AGG: 0, <i>ileX</i> ATA: 0, <i>glyT</i> GGA: 4, <i>leuW</i> CTA: 2, <i>proL</i> : CCC 4

Tab. 5 Übersicht Konstrukte nach „*module-shuffling*“.

Die Überprüfung der Plasmidkonstrukte in der Agarosegelelektrophorese ergab, dass alle Plasmide Insertionen der erwarteten Größe trugen (Abb. 45).

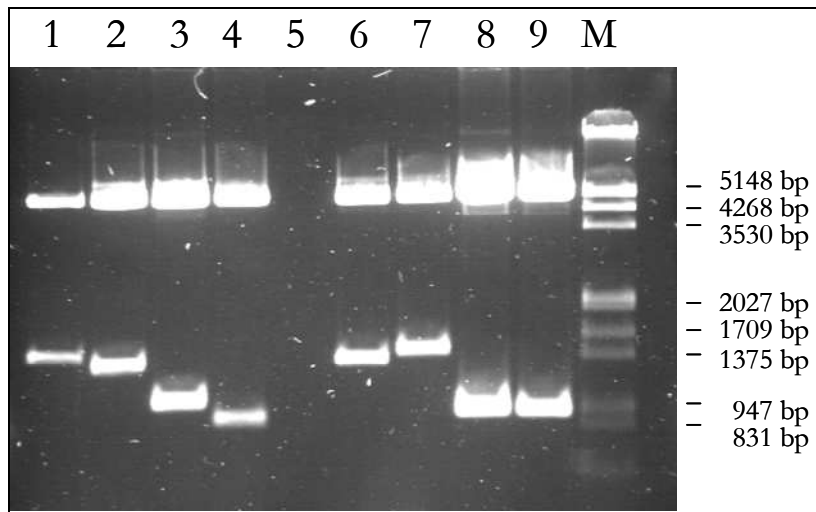


Abb. 45 Plasmidkonstrukte nach „*module shuffling*“. DraIII/BgIII-Spaltung der Hybridplasmide. Agarosegel 0,8%. Spur 1-4, 6-9: 5249 bp Vektoranteil pSCodon. Spur 1: pSCodonLysCMP1, 1433 bp; Spur 2: pSCodonKCMP1-BCN77, 1349 bp; Spur 3: pSCodonBCMP1, 1036 bp; Spur 4: pSCodonKCMP1, 908 bp; Spur 6: pSCodonLysCN77, 1385 bp; Spur 7: pSCodonKCN77-BCMP1, 1469 bp; Spur 8: pSCodonBCN77, 952 bp; Spur 9: pSCodonKCN77, 944 bp.

Für die Expression wurde zunächst der Stamm *E. coli* SE1 mit diesen Hybridplasmiden transformiert. Nach der Induktion und nachfolgender Analyse des Gesamtproteins konnten mit Ausnahme der einzelnen Bindedomäne von CN77 (BCN77) alle Genprodukte identifiziert werden (Abb. 46). Zudem fiel auf, dass bei dem Genprodukt KCN77-BCMP1 ähnlich wie beim CMP1-Endolysin die Bindedomäne separat exprimiert wurde.

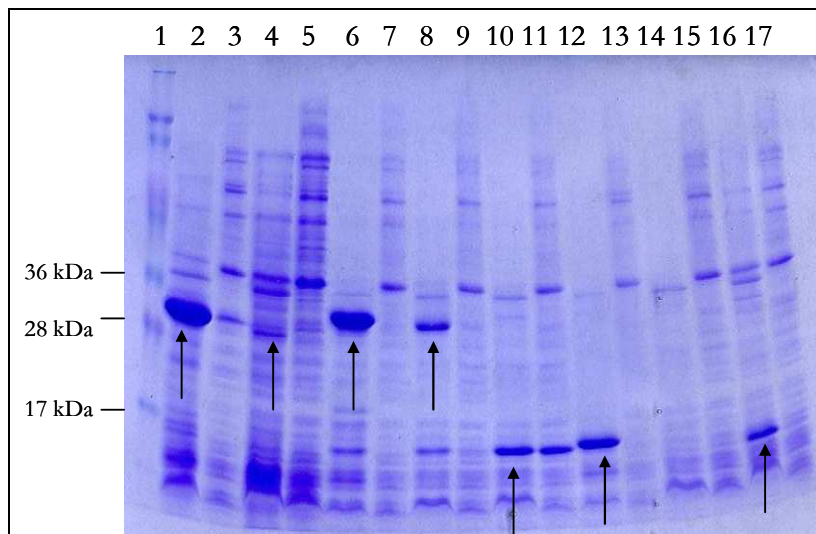


Abb. 46 Analyse des Gesamtproteins nach Expression verschiedener Endolysin-Gene. SDS-PAGE, 17,5% Polyacrylamidgel, Coomassie-Färbung. Spur 1: peqGOLD Protein Marker V, Spur 2:

Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonKCMP1-BCN77, Spur 3: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonKCMP1-BCN77, Spur 4: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonLysCN77, Spur 5: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonLysCN77, Spur 6: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonLysCMP1, Spur 7: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonLysCMP1, Spur 8: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonKCN77-BCMP1, Spur 9: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonKCN77-BCMP1, Spur 10: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonBCMP1, Spur 11: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonBCMP1, Spur 12: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonKCMP1, Spur 13: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonKCMP1, Spur 14: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonBCN77, Spur 15: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonBCN77, Spur 16: Gesamtprotein *E. coli* SE1 pSCodonKCN77, Spur 17: Überstand Rohextrakt *E. coli* SE1 pSCodonKCN77.

Bei der Überprüfung der Löslichkeit der Proteine wurde festgestellt, dass die Bindedomäne von CMP1 (BCMP1) in löslicher Form vorlag und diese für weitere Tests direkt eingesetzt werden konnte. Alle anderen Proteine lagen in Form von *inclusion bodies* vor und konnten demnach nicht direkt für Aktivitätstests eingesetzt werden. Eine Western Blot-Analyse zeigte außerdem, dass alle Konstrukte den fusionierten His-tag besitzen.

3.5.4. Die Aktivität der neu kombinierten Endolysine

Nach der erfolgreichen Expression in *E. coli* wurde die Aktivität der Chimär-Proteine überprüft. Dazu wurden Zellen der *Clavibacter*-Subspezies wie bereits beschrieben mit den unterschiedlichen Proteinen inkubiert und die Abnahme der optischen Dichte anschließend photometrisch verfolgt. In einigen Fällen wurde beschrieben, dass die einzelne katalytische Domäne eines Endolysins ohne Bindedomäne für die Spaltung des Peptidoglykans ausreicht (Low *et al.*, 2005). Für die katalytischen Domänen von CMP1 und CN77 konnte dieses Phänomen nicht bestätigt werden. Nach Behandlung von *Clavibacter*-Zellen mit den beiden Proteinen konnte keine Abnahme der optischen Dichte registriert werden (Daten nicht gezeigt). Die Endolysine von CMP1 und CN77 scheinen also auf ihre Bindedomänen angewiesen zu sein, um katalytisch wirksam zu sein. Nach Zugabe der beiden neu konstruierten Chimär-Endolysine zu verschiedenen *Cm*-Subspezies konnte allerdings eine lytische Aktivität nachgewiesen werden.

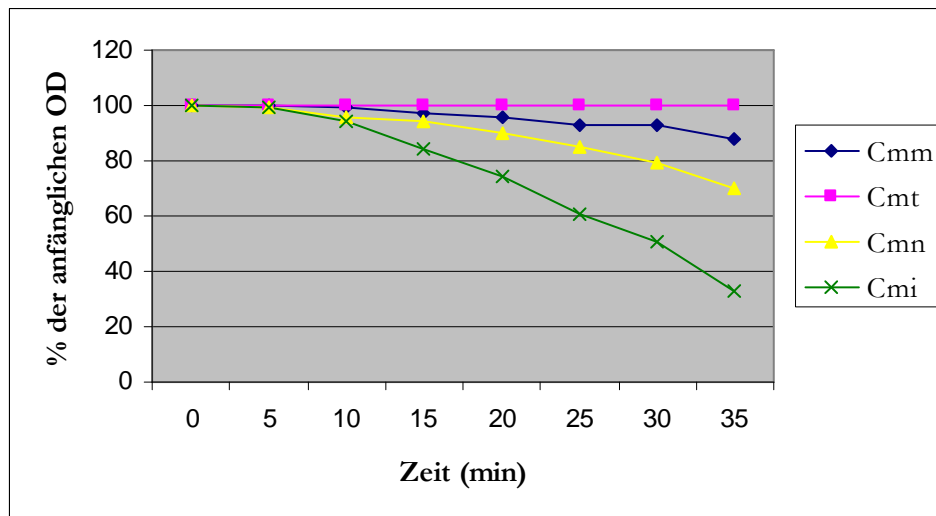


Abb. 47 Lyse verschiedener *Clavibacter michiganensis*-Subspezies durch das neu konstruierte Endolysin KCMP1-BCN77. Sedimentierte Indikatorzellen wurden in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 5,7, 50 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend mit Endolysin inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt.

In Abb. 47 lässt sich eindeutig erkennen, dass das Hybridprotein aus der katalytischen Domäne von CMP1 und der Bindedomäne von CN77 aktiv ist. Die Aktivität ist wie bei den nativen Proteinen je nach Indikatorstamm mehr oder weniger stark. *Cmi* scheint am sensitivsten auf die Wirkung des Enzyms zu sein, während *Cmt* nicht beeinflusst wird. Zudem sieht man deutlich, dass die Lyse erst verzögert beginnt. Eine gesteigerte Aktivität gegenüber den nativen Proteinen konnte mit dem Hybridprotein nicht erreicht werden.

Bei der Analyse der Aktivität von KCN77-BCMP1 mit der katalytischen Domäne von CN77 und der Bindedomäne von CMP1 konnte eine deutlich höhere Aktivität ermittelt werden. Auch in diesem Fall stellte sich *Cmi* als am sensitivsten heraus, so dass nach 10 min schon 70% der Zellen lysiert waren. Bei *Cmn* sieht man zumindest eine Abnahme der OD um 20%. Überraschenderweise konnte bei *Cmm* ähnlich wie bei *Cmt* keinerlei lytische Aktivität detektiert werden (Abb. 48).

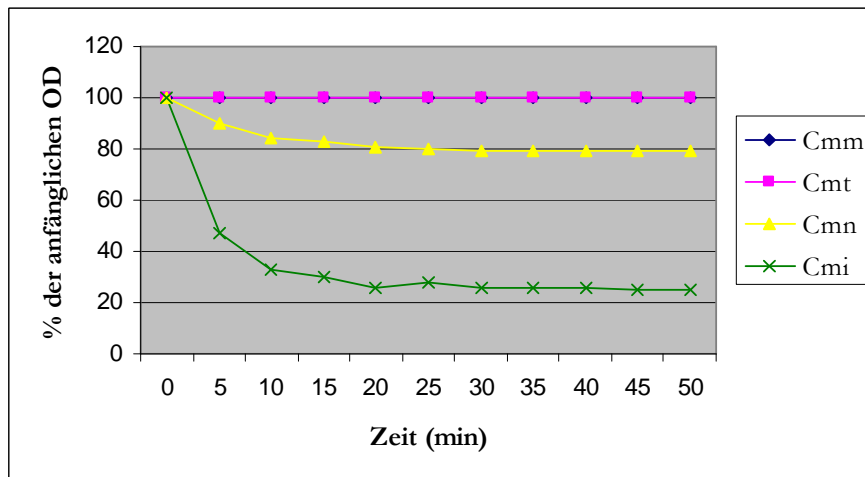


Abb. 48 Lyse verschiedener *Clavibacter michiganensis*-Subspezies durch das neu konstruierte Endolysin KCN77-BCMP1. Sedimentierte Indikatorzellen wurden in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 5,7, 50 mM NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend mit Endolysin inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt.

Im Agardiffusionstest hingegen konnte auch mit *Cmm* als Indikator eine leichte Aktivität nachgewiesen werden, d. h. es entstanden in der Tropfzone leicht aufgeklärte Höfe. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht. In dieser Zeit wachsen die Indikatorbakterien zu einem Bakterienrasen aus. Die photometrischen Tests dagegen wurden mit Zellen in der späten log-Phase oder in der stationären Phase über eine kurze Zeitspanne durchgeführt. Möglicherweise ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass das Enzym seine Wirkung nur während bestimmter Teilungsphasen der Zellen entfalten kann (Vgl. Kapitel 3.3.) (Pritchard *et al.*, 2004).

Die Experimente zeigten, dass das „*module shuffling*“ zu aktiven Chimärproteinen führt, die Aktivität dieser Proteine ist im Vergleich mit den nativen Proteinen aber deutlich niedriger. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche nur mit den ursprünglichen Endolysinen durchgeführt.

3.5.5. Einfluss der Bindedomäne BCMP1 auf die Aktivität des Endolysins nach exogener Zugabe

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Bindedomäne allein auch eine lytische Aktivität besitzt und ob sie, wenn sie zum intakten Endolysin hinzugegeben wird, wie in Kapitel 3.3. vermutet eher kompetitiv hemmt. Dazu wurden *Cmm*-Zellen mit je 30 μ l Endolysin und/oder BCMP1 inkubiert und die optische Dichte wurde über einen Zeitraum von 130 min photometrisch verfolgt. Der Test wurde 3x wiederholt, wobei sich die Ergebnisse stark ähnelten. Im Folgenden wird eine Messung exemplarisch dargestellt.

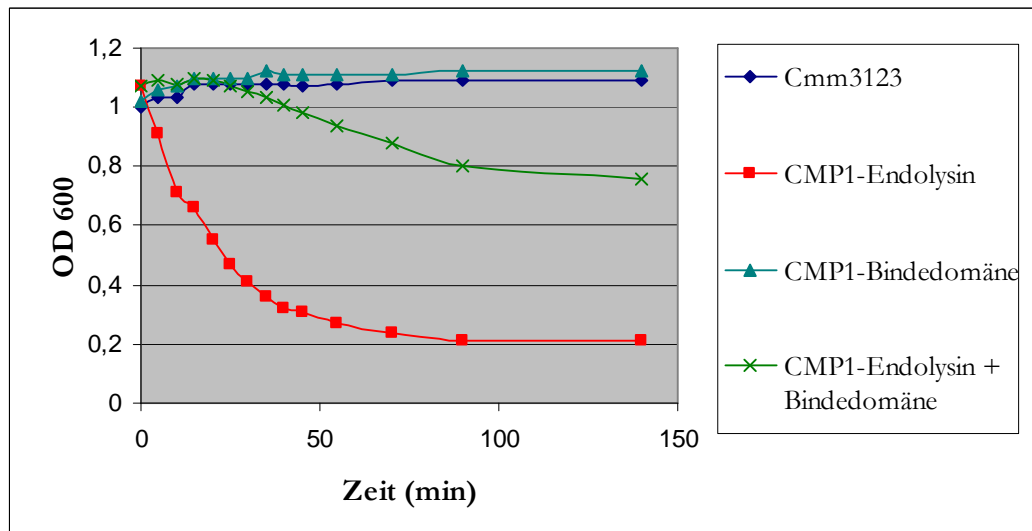


Abb. 49 Überprüfung einer möglichen katalytischen Aktivität der Bindedomäne des CMP1-Endolysins.

In Abb. 49 lässt sich erkennen, dass die alleinige Zugabe von BCMP1 keine Abnahme der optischen Dichte bewirkt, sie bleibt konstant. Die Zugabe von CMP1-Endolysin lässt die optische Dichte dagegen deutlich sinken. Werden die Zellen sowohl mit BCMP1 als auch mit dem intakten Endolysin von CMP1 behandelt, so lässt sich eine andere Beobachtung machen. Die optische Dichte bleibt zunächst konstant und nimmt erst nach einer deutlichen Verzögerung von ca. 30 Minuten ab. Am Ende des Versuchs ist die optische Dichte nur auf ca. 80% gesunken, während die der Probe mit dem Endolysin allein auf ca. 20% gesunken ist. Derselbe Effekt konnte anschließend auch bei dem Endolysin von CN77 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Bindedomänen scheinen also die Endolysine kompetitiv zu hemmen, da sie vermutlich die zugänglichen Bindestellen im Peptidoglykan für die Bindung des kompletten Endolysins blockieren. Das bekräftigt die Annahme, dass das 16 kDa-Protein die vergleichsweise geringe Aktivität des CMP1-Endolysins verursacht.

3.5.6. Potentielle Bedeutung einer separaten Bindedomäne

In der Literatur wurde das Auftreten einer separaten Bindedomäne bei einem Endolysin bisher nicht beschrieben, deshalb kann über den möglichen Zweck nur spekuliert werden.

Phagen müssen unterschiedliche Strategien entwickeln, um nach der Lyse der Wirtsbakterien und Freisetzung der Nachkommenschaft neben einer Neuinfektion aber gleichzeitig auch das Überleben der Wirtsbakterien zu ermöglichen. Würden die Wirtsbakterien durch eine zu große Nachkommenschaft des Phagens sofort eliminiert, könnte sich auch der Phage in der nächsten Generation nicht mehr weiter vermehren. Aus diesem Grund besitzen Phagen mit Wirten in einem eher nährstoffarmen Milieu eine kleine *burst size* mit einer geringen Nachkommenschaft. Dadurch wird gewährleistet, dass das Wirtsbakterium nicht direkt eliminiert wird, sondern es

weiterhin die Chance auf eine weitere Vermehrung hat. Zu diesen Phagen zählen z. B. auch der *Clavibacter*-Phage CMP1 oder der *Xylella*-Phage Xfas53 (Summer *et al.*, 2010), deren Wirtsbakterien im relativ nährstoffarmen Xylem von Pflanzen beheimatet sind. Während die Überlebenschancen der Wirtsbakterien auf diese Weise durch die geringe *burst size* des Bakteriophagen erhöht werden, könnte auch durch die Expressionsrate und die Struktur der Endolysine eine Regulation erfolgen. Durch die starke lytische Aktivität des Endolysins trotz relativ geringer Ausbeute an löslichem Protein nach Expression in *E. coli* wurde gezeigt, dass vermutlich für die Lyse der Bakterien nur wenige Moleküle ausreichen. Nach der Lyse der Wirtsbakterien müssen die Phagen-Nachkommen die Chance der erneuten Infektion von Bakterien haben. Deshalb muss gewährleistet sein, dass das freigesetzte Endolysin die potentiellen Wirtsbakterien nicht schon vorher lysiert. Das könnte durch verschiedene Mechanismen gewährleistet werden – niedrige Expressionsrate, kurze Halbwertszeit oder starke Bindung an das Peptidoglykan der produzierenden Zelle.

Die Halbwertszeit scheint im Fall der beiden Endolysine von CMP1 und CN77 nicht gering zu sein. Diese Beobachtung konnte auch bereits bei anderen Endolysinen gemacht werden (Loeffler *et al.*, 2003; Deutsch *et al.*, 2004). Die beiden Endolysine scheinen relativ stabil zu sein, da auch nach längerer Lagerung von mehr als zwei Wochen bei 4°C noch eine lytische Aktivität zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Auch in Phagenlysaten, die mehrere Monate bei 4°C gelagert wurde, konnten bei der Ermittlung des Phagen-Titers, bei denen Verdünnungen des Lysats ausplattiert wurden, eine eindeutige lytische Aktivität, aber keine Bildung einzelner Plaques festgestellt werden. Auf den Nicht-Wirtsstämmen *Cmn* und *Cmi* konnten ebenfalls Hemmhöfe registriert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit vom Endolysin verursacht werden. In den Phagenlysaten scheint also noch eine große Menge an freiem Endolysin vorhanden zu sein. Diese beiden Beobachtungen zeigen, dass die Halbwertszeit bei diesen beiden Enzymen scheinbar recht hoch und die Stabilität der Proteine ohne kompletten Aktivitätsverlust über einen längeren Zeitraum bei 4°C gewährleistet ist.

Endolysine von Phagen mit Gram-positiven Wirten zeigen meist einen modularen Aufbau mit einer katalytischen Domäne und einer Domäne zur Substraterkennung und -bindung. Briers *et al.* (2009) zeigten, dass die Bindung der Bindedomäne eines Endolysins vom *Pseudomonas* Phagen KZ144 an das Peptidoglykan sehr stark und nahezu irreversibel ist. Loessner stellte die Hypothese auf, dass die Bindedomäne nicht nur die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat gewährleistet, sondern zudem dafür sorgt, dass nicht zu viel Endolysin bei der Lyse in die Umgebung gelangt (2005). Da Gram-positive Bakterien durch exogene Zugabe von Endolysin lysiert werden können, würde zu viel Endolysin in der Peripherie eines lysierten Bakterium auch weitere Zellen gefährden, die dann vom Phagen nicht mehr zur Infektion und Weitervermehrung

genutzt werden könnten. Die gleichzeitige Inkubation von *Clavibacter*-Zellen mit den Endolysinen und dem gekürzten CMP1-Endolysin, das nur noch die C-terminale Bindedomäne beinhaltete, führte zu einer vergleichsweise verzögerten Lyse der Bakterien. Vermutlich werden durch das gekürzte Endolysin zugängliche Bindestellen im Peptidoglykan besetzt, so dass es zu einer kompetitiven Hemmung des intakten Endolysins kommt. Die Fragen nach dem Zweck, den die separate Expression der C-terminalen Domäne möglicherweise erfüllt, oder der Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieses Proteins in *Clavibacter* konnten bisher nicht beantwortet werden. Es könnte aber in einem Mechanismus zur Verhinderung einer vorzeitigen Lyse von potentiellen Wirtsbakterien involviert sein.

Die gezeigte Stabilität des Endolysins, die Aktivität nach der Aufreinigung und die hohe Wirtsspezifität sind gute Voraussetzungen für einen Einsatz im biologischen Pflanzenschutz. Allerdings wäre der Einsatz eines Endolysin-Präparats aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur Selbstreplikation mit einem sehr hohen Material- und Arbeitsaufwand für die Produktion verbunden. Deshalb scheint in diesem Fall die Konstruktion einer transgenen Tomatenpflanze, die ein Endolysin-Gen konstitutiv exprimiert, geeigneter zu sein.

3.6. Spezifität der Endolysine

Für den Einsatz im biologischen Pflanzenschutz spielt die Wirts- bzw. Substratspezifität des jeweiligen Endolysins eine entscheidende Rolle. Durch das Enzym soll nur das zu bekämpfende Bakterium eliminiert werden, andere Bakterien sollen nicht beeinträchtigt werden, so dass die mikrobielle Gemeinschaft und das ökologische Gleichgewicht nicht zu stark gestört werden. Deswegen ist die Wirkungsweise des Endolysins hier entscheidend. Lysozyme spalten die glykosidischen Bindungen in den Kohlenhydratketten des Peptidoglykans, die in allen Bakterien sehr ähnlich aufgebaut sind, und wirken daher sehr unspezifisch. Endopeptidasen hingegen spalten die Peptidbindungen, die für die Quervernetzung der Kohlenhydratketten sorgen. Aufgrund der Interpeptidbrücken in Gram-positiven Bakterien und der damit auch verbundenen höheren Variabilität der Peptidbindungen weisen Phagen von Gram-positiven meist eine spezifische Endopeptidase auf, während Phagen von Gram-negativen Wirten für die Spaltung der Peptidoglykanschicht oft eher unspezifische Lysozyme nutzen.

Im weiteren Verlauf sollte die Spezifität der beiden Endolysine untersucht werden. Dazu wurden Endolysin-haltige Rohextrakte auf Indikatorplatten mit verschiedenen Stämmen getropft. Insgesamt wurden 46 Stämme (Tab. 7, s. Anhang) aus unterschiedlichen Gattungen und mit unterschiedlichen Zellwandtypen untersucht. Dabei wurde versucht, möglichst viele relativ nah zu *Clavibacter* verwandte Stämme zu überprüfen. Ein großer Teil der Indikatorstämme stammte daher aus der Gruppe der *Microbacteriaceae* (Tab. 6).

Stamm	Lyse durch CMP1- Endolysin	Lyse durch CN77-Endolysin	Mureintyp
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB3123	+	+	B2 γ (D- und L- DAB)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB382	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2579	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> CS7	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i> NCPPB1109	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i> ATCC33566	-	(+)	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i> LMG7295	-	(+)	
<i>Leifsonia aquatica</i> DSM20146	-	-	B2 γ (L-DAB)
<i>Rathayibacter iranicus</i> NCPPB2253	-	-	
<i>Rathayibacter rathayi</i> NCPPB2980	-	-	
<i>Rathayibacter tritici</i> NCPPB1857	-	-	
<i>Okibacterium</i> sp.*	-	-	B2 α
<i>Frigoribacterium</i> sp.*	-	-	B1 α
<i>Microbacterium</i> sp.*	-	-	B2 β
<i>Aureobacterium</i> sp.*	-	-	
<i>Curtobacterium</i> sp.*	-	-	

Tab. 6 Aktivität der Endolysine auf verschiedenen *Microbacteriaceae*-Stämmen ((+)= sehr schwach, * = Umweltsolate K.-H. Gartemann, DAB = Diaminobuttersäure).

Vier von fünf Subspezies von *Clavibacter michiganensis* wurden von den Endolysinen lysiert. Lediglich *Cmt* wurde vom Endolysin von CMP1 nicht beeinflusst. Bei einer Behandlung mit dem Endolysin von CN77 konnte zumindest eine schwache Reaktion beobachtet werden (Tab. 6). Bei allen weiteren getesteten Stämmen konnte keine Lyse registriert werden. Im Vergleich mit dem Einsatz der *Clavibacter*-Phagen, die nur auf ihrem eigentlichen Wirtstamm Plaques bilden, zeigt sich hier also bereits, dass die Endolysine bei einem Einsatz beim Pflanzenschutz einen weiteren Bereich mit mehreren *Clavibacter*-Stämmen bekämpfen könnten.

Da das Endolysin das Peptidoglykan degradiert, muss die scheinbar hochspezifische Wirkung der beiden Endolysine auf der unterschiedlichen Zellwandstruktur der einzelnen Bakteriengattungen – bzw. arten zurückzuführen sein. Bislang wurde angenommen, dass die fünf *Clavibacter*-Subspezies keine Unterschiede in ihrer Zellwandstruktur aufweisen. Die Zellwandstruktur von *Clavibacter michiganensis* wurde als Zellwandtyp B2 γ beschrieben (Sasaki *et al.*, 1998, Schleifer und Kandler, 1972). Die in Tab. 6 eingetragenen verschiedenen Zellwandtypen wurden von Kandler und Schleifer definiert. Die genaue Beschreibung des Zellwandtyps von *Clavibacter* erfolgt in Kapitel 3.7. Trotz der angenommenen gleichen Zellwandstruktur wird *Cmt* nicht vom CMP1-Endolysin, aber vom CN77-Endolysin lysiert. *Rathayibacter iranicus*, ein naher Verwandter von

Clavibacter, der auch den B2 γ -Zellwandtyp aufweist, allerdings anstatt L- und D-Diaminobuttersäure nur das L-Isomer beinhaltet, wurde ebenfalls nicht lysiert. Die einzigen anderen Spezies mit demselben Zellwandtyp wie *Clavibacter michiganensis* (B2 γ mit L- und D-DAB) sind Mitglieder der Gattung *Leifsonia* (Evtushenko *et al.*, 2000). Beim Test der Endolysine auf *Leifsonia aquatica* konnte bei beiden Endolysinen keine Aktivität festgestellt werden. Das lässt vermuten, dass *Clavibacter* und *Leifsonia* zwar den gleichen Zellwandtyp besitzen, die Strukturen aber nicht komplett identisch sind und sie sich durch vermutlich geringe Modifikationen unterscheiden, die aber für eine potentielle Spaltung durch die Endolysine relevant sind. Da die Aktivität an ganzen Zellen gemessen wurde und nicht an gereinigten Zellwänden ist nicht auszuschließen, dass die Resistenz gegen das Endolysin darauf beruht, dass das Enzym sein Substrat nicht erreichen kann.

Erste Versuche mit dem Phagen CMP1 hatten gezeigt, dass dieser nur auf wenigen *Cmm*-Stämmen Plaques bildet. Auf Indikatorplatten mit *Cmm*-Eigenisolaten aus Proben aus Deutschland oder Isolaten, die aus Israel zur Verfügung gestellt wurden, konnte keine Plauebildung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um zu zeigen, dass diese verschiedenen *Cmm*-Stämme aber vom Endolysin lysiert werden, wurde das Endolysin darauf getropft. Dabei wurden alle ohne Ausnahme von den beiden Endolysinen lysiert. Auch bei den *Cmm*-Stämmen wurden 10 verschiedene Stämme analysiert, hier wurden ebenfalls alle lysiert.

Im Verlauf dieses Versuchs wurden auch Umweltisolate (K.-H. Gartemann) untersucht, die laut Literatur (Kandler und Schleifer, 1972) in verschiedene Gattungen der *Microbacteriaceae* eingruppiert wurden und andere Zellwandtypen (z. B. B2 α und B2 β) besitzen. Diese wurden alle nicht von den Endolysinen lysiert. Aus diesem Grund war es auch nicht überraschend, dass andere Gram-positive Stämme wie z. B. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* oder *Corynebacterium glutamicum*, die alle den Zellwandtyp A besitzen (Kandler und Schleifer, 1972), nicht von den Endolysinen lysiert wurden.

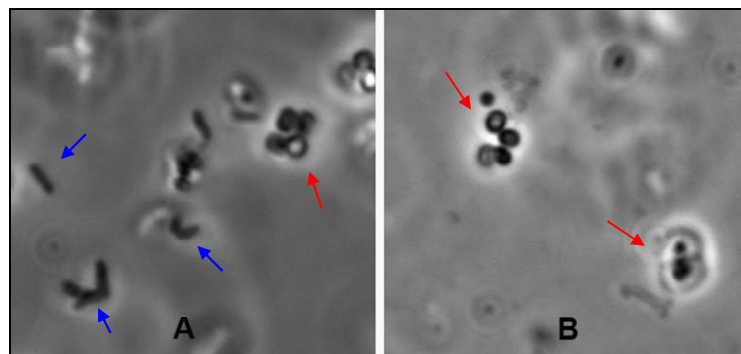


Abb. 50 Mikroskopische Aufnahme (630x Vergrößerung) von *Cmm*- und *Micrococcus*-Zellen vor (A) und nach (B) Zugabe von CMP1-Endolysin (rote Pfeile markieren *Micrococcus*-Zellen, blaue Pfeile markieren *Cmm*-Zellen).

Wenn unterschiedliche Stämme gemischt wurden, konnte nach Zugabe von Endolysin die selektive Eliminierung von *Clavibacter* beobachtet werden (Abb. 50). Auf Gram-negative Stämme wie z. B. *E. coli*, *Pseudomonas putida* oder *Aeromonas hydrophila* hatten die beiden Enzyme erwartungsgemäß keinen Effekt (Tab. 7, s. Anhang).

Aus den Ergebnissen dieser Versuche lässt sich schließen, dass die Enzyme offenbar eine hohe Spezifität aufweisen und die Aktivität der beiden Endolysine auf die Subspezies von *Clavibacter michiganensis* limitiert ist. Von außen zugegeben haben sie keinen Effekt auf andere Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme und würden so bei einem Einsatz die bakterielle Gemeinschaft nicht negativ beeinflussen. Damit sind sie für einen potentiellen Einsatz beim biologischen Pflanzenschutz geeignet.

3.7. Bestimmung der Schnittstelle des Endolysins von CMP1 im Peptidoglykan von *Cmm*

Die Endolysine von CMP1 und CN77 lysieren sehr spezifisch nur Mitglieder der Gattung *Clavibacter*. Alle Subspezies von *Clavibacter michiganensis* besitzen den Zellwandtyp B2 γ , der nur selten auftritt. In diesem Versuch sollte geklärt werden, wo genau das Endolysin das Peptidoglykan spaltet.

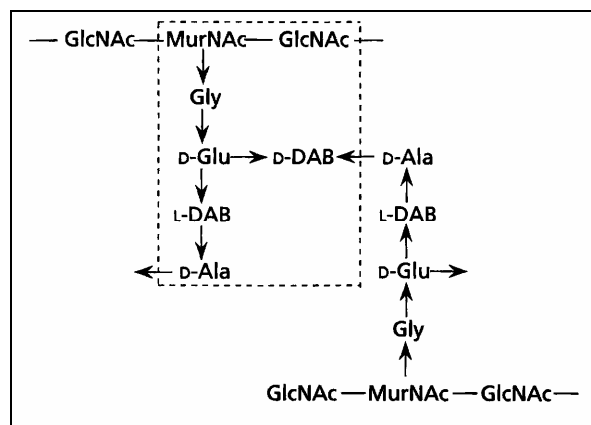


Abb. 51 Fragment der Primärstruktur des Zellwandtyps B2 γ (aus Sasaki *et al.*, 1998) (MurNAC: N-Acetylmuraminsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Ala: Alanin; DAB: Diaminobuttersäure; Gly: Glycin; Glu: Glutaminsäure). Die gestrichelte Box markiert einen Grundbaustein der Zellwand.

TypB-Peptidoglykan hat eine charakteristische Interpeptidbrücke, die D-Glutaminsäure in Position 2 des einen mit D-Alanin in Position 4 des anderen quervernetzenden Peptids verbindet (Fiedler and Kandler, 1973). Eine weitere Unterteilung dieses Peptidoglykantyps erfolgt über die Komponenten in der Interpeptidbrücke und in den Peptiduntereinheiten. Die Einteilung des *Clavibacter*-Peptidoglykans in den Typ B2 γ erfolgte aufgrund eines D-Diaminosäure-Rests, in diesem Fall D-Diaminobuttersäure (D-DAB), in der Interpeptidbrücke (=B2) und aufgrund eines L-Diaminobuttersäure-Rests an Position 3 der Peptiduntereinheit (=B2 γ) (Abb. 51).

Für die Analyse der potentiellen Schnittstelle der Endolysine wurde zunächst das Peptidoglykan von *Cmm* in Zusammenarbeit mit der DSMZ in Braunschweig aufgereinigt. Dazu wurden *Cmm*-Zellen mit Hilfe von Glasperlen in einer Zelmühle aufgeschlossen. Nach einigen Zentrifugations- und Waschschrinen wurde die Rohfraktion zunächst mit Trypsin und nach weiteren Waschschrinen mit SDS behandelt, bis nach Entfernen des restlichen SDS das Peptidoglykan gereinigt vorlag. Durch die Trypsin- und SDS-Behandlung sollten Proteine, die in der Zellhülle lokalisiert sind, vom eigentlichen Peptidoglykan getrennt werden.

Zur Überprüfung der Reinheit des isolierten Peptidoglykans wurde eine Totalhydrolyse (4 N HCl, 100 °C, 16 h) des aufgereinigten *Cmm*-Peptidoglykans durchgeführt. Die Identifikation der einzelnen Bestandteile erfolgte über ein Papierchromatogramm (Rhuland *et al.*, 1955).

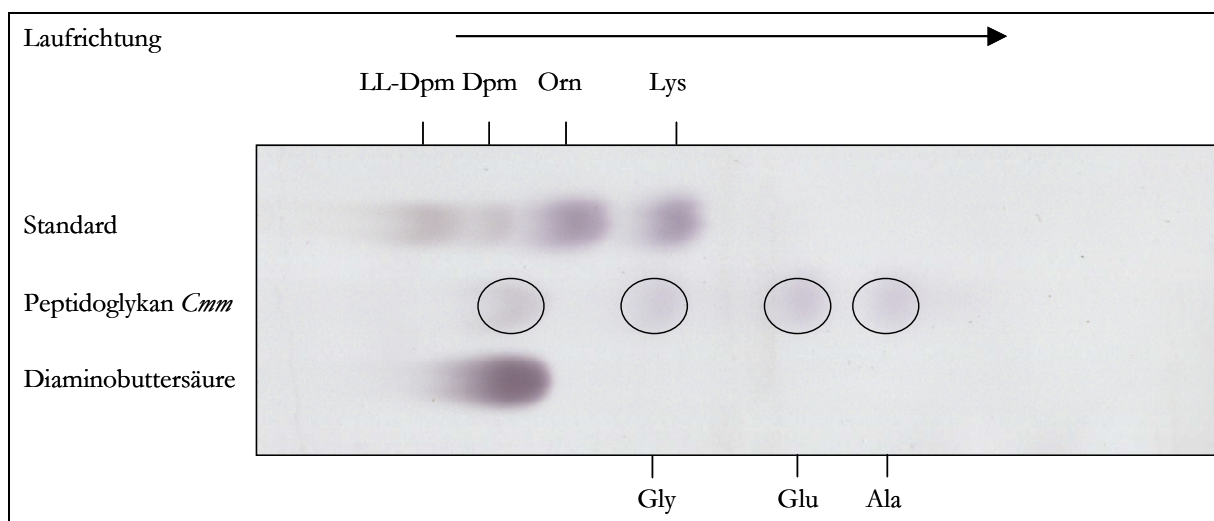


Abb. 52 Rhuland-Chromatogramm des Hydrolysates (4N HCl, 100°C, 16h) von *Cmm*-Peptidoglykan, Spur 1: Standard mit LL-Dimaminopimelinsäure (LL-Dpm), meso-Dimaminopimelinsäure (Dpm), Ornithin (Orn) und Lysin (Lys), Spur 2: Hydrolysat *Cmm*-Peptidoglykan, Spur 3: Diaminobuttersäure.

Abb. 52 zeigt, dass in dem Hydrolysat des *Cmm*-Peptidoglykans wie zu erwarten keine Diaminopimelinsäure, dafür aber eindeutig Diaminobuttersäure vorhanden ist. In der Spur der Probe sind Flecken zu erkennen, die von links nach rechts Diaminobuttersäure, Glycin, Glutaminsäure und Alanin repräsentieren. Bei einer Kontamination der Probe mit anderen Proteinen würden rechts vom Alanin weitere Flecken erscheinen. Durch Farbe (rot) und Laufverhalten (fast an der Lösungsmittelfront) würden dabei besonders Leucin und Isoleucin auffallen, die deshalb als Indikator für Protein-Kontamination verwendet werden. Diese treten in dieser Probe nicht auf. Es konnte also die Reinheit des aufgearbeiteten Peptidoglykans gezeigt werden, das somit für die Bestimmung der genauen Schnittstelle des Endolysins eingesetzt werden konnte.

3.7.1. Massenspektrometrische Analyse des *Cmm*-Peptidoglykans

Für die Bestimmung der Stelle im Peptidoglykan, an der die Phagen-Endolysine enzymatisch wirksam werden, musste zunächst die Struktur einer Untereinheit des Peptidoglykans analysiert werden. Diese besteht aus zwei Disacchariden mit je einem N-Acetylglucosamin und einer N-Acetylmuraminsäure, die über die für den Zellwandtyp B2 γ charakteristischen Peptidstämme quervernetzt werden. Um eine solche Untereinheit zu erhalten, wurde das isolierte Peptidoglykan mit Mutanolysin aus *Streptomyces globisporus* (Sigma) hydrolysiert (Fliss *et al.*, 1991), das die glykosidischen Bindungen im Peptidoglykan spaltet. Bei einer vollständigen Hydrolyse würde man so ein Molekül erhalten, das aus den Disacchariden zweier Ketten besteht, die durch die Peptide quervernetzt sind.

In einer weiteren Probe wurde das Peptidoglykan zusätzlich mit dem aufgereinigten Endolysin von CMP1 hydrolysiert. Die für die massenspektrometrische Analyse entsalzten Proben wurden zusammen mit Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix für glykosylierte Peptide auf Stahlträger getropft und nach dem Kristallisieren massenspektrometrisch analysiert.

Nach der massenspektrometrischen Analyse konnten eindeutige Unterschiede zwischen den beiden Peptidoglykan-Proben festgestellt werden (Abb. 53).

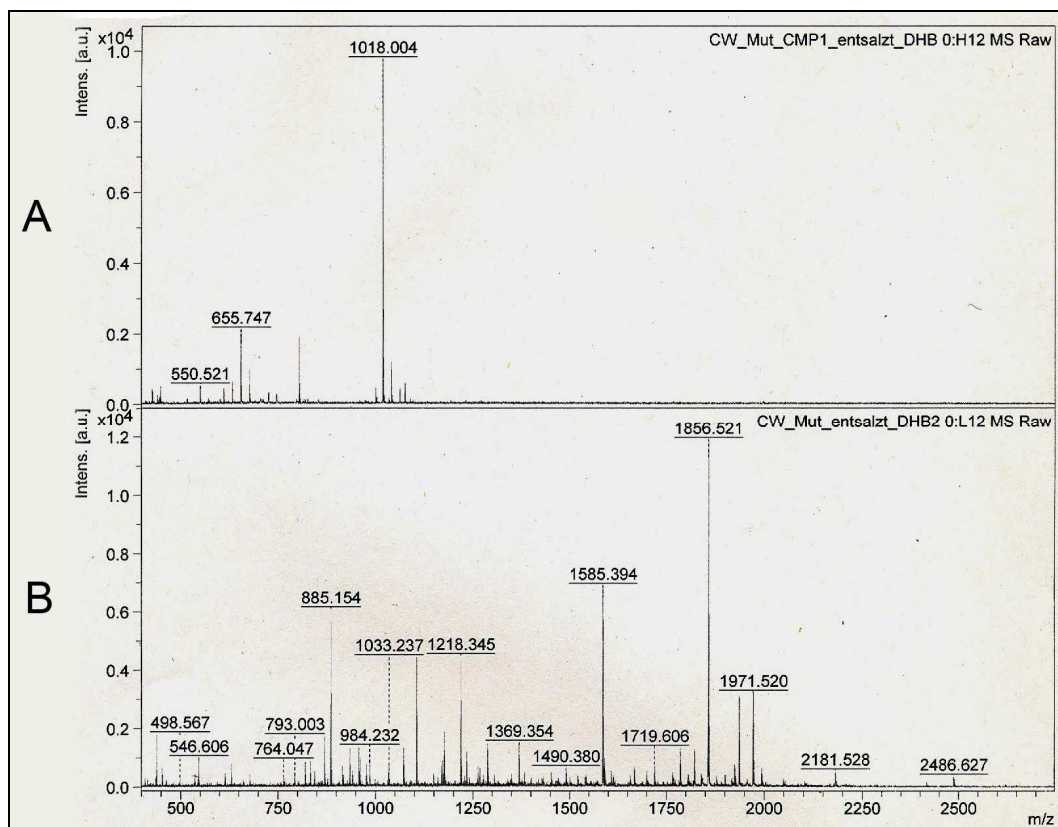


Abb. 53 Massenspektrometrische Analyse der hydrolysierten Peptidoglykanproben. Probe A wurde mit Mutanolysin und dem Endolysin von CMP1 behandelt, Probe B wurde nur mit Mutanolysin behandelt. Die Abbildung zeigt das Massenspektrum im positiven Ionenmodus.

In der Probe, in der das Peptidoglykan mit zwei Enzymen hydrolysiert wurde (Abb. 53, A), treten nur Signale unterhalb von 1100 Da auf. Die in Probe B dominanten Signale von ca. 1856 Da und ca. 1585 Da sind hier nicht zu detektieren. Daher wurde angenommen, dass es sich bei diesen beiden Molekülen um die erwähnten Peptidoglykan-Untereinheiten handeln könnte, die nach der Behandlung mit dem Endolysin von CMP1 hydrolysiert wurden. Anhand der vorgeschlagenen Struktur des *Cmm*-Peptidoglykans von Kandler und Schleifer (1972) wurde das Molekulargewicht einer möglicherweise nach Hydrolyse mit Mutanolysin auftretenden Peptidoglykan-Einheit ermittelt (Abb. 54).

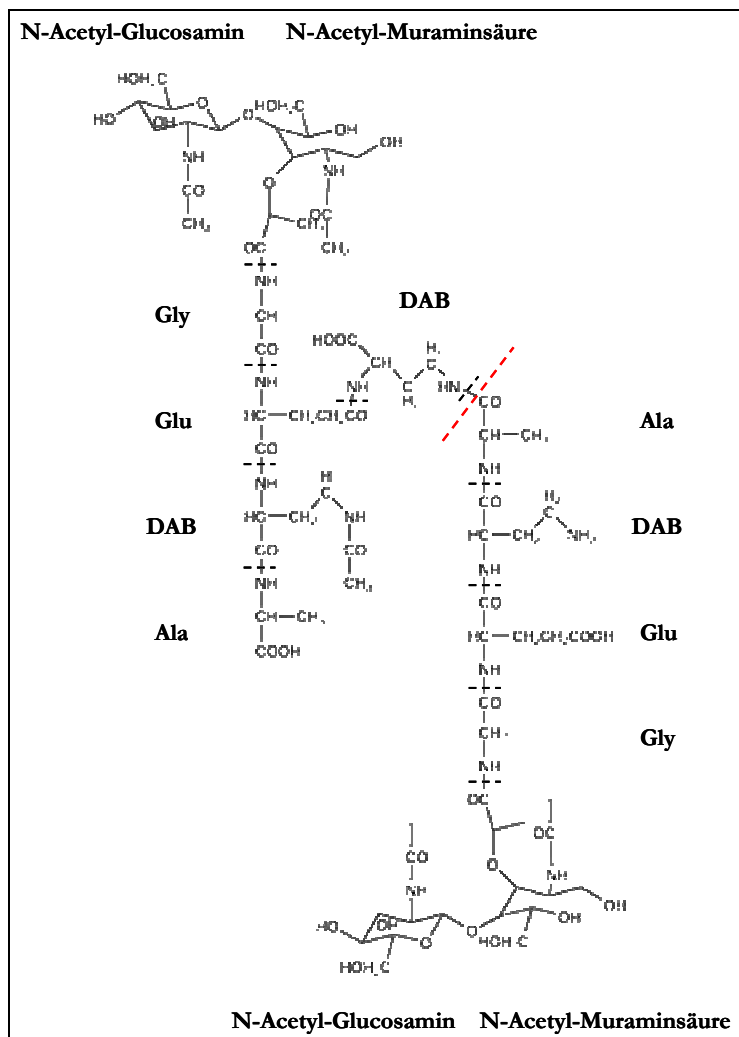


Abb. 54 Von Kandler und Schleifer ermittelte Struktur einer quervernetzten *Cmm*-Peptidoglykan-Untereinheit. In dieser Abbildung liegt die N-Acetyl-Muraminsäure in ihrer offenkettigen Form vor, die Diaminobuttersäure (DAB) des linken Peptidstamms liegt acetyliert vor. Die rot gestrichelte Linie markiert die mögliche Schnittstelle des Endolysins, der linke Teil des Moleküls hätte dann eine Größe von etwa 1017 Da.

Diese hätte ein Molekulargewicht von 1857,79 Da unter Berücksichtigung eines Natrium-Ions bei einer Messung im positiven Modus. Ein Signal, das ungefähr diese Größe aufweist, lässt sich nach

der massenspektrometrischen Analyse (Probe B, Abb. 53) nachweisen, allerdings entspricht es trotz genauer Eichung des Massenspektrometers nicht exakt dem erwarteten Molekulargewicht. Diese Abweichung konnte trotz mehrmaliger Wiederholung der Messung und Variation der Messparameter nicht vermindert werden. Somit kann also keine zuverlässige Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei diesem Signal tatsächlich um die erwartete Struktur handelt und ob diese vorgeschlagene Struktur der Peptidoglykan-Untereinheit tatsächlich korrekt ist.

Der Ursprung des zweiten dominanten Signals mit einer Größe von ca. 1585 Da konnte ebenfalls nicht eindeutig bestimmt werden. In diesem Fall wurden nach einer erneuten Fragmentierung des Moleküls über eine Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) Signale erhalten, die nach einem Vergleich mit bekannten Molekülen wahrscheinlich Aminosäuren zugeordnet werden können, die nicht im Peptidoglykan enthalten sind. Das ließ den Schluss zu, dass es sich bei diesem Signal nicht um ein Fragment des Peptidoglykans, sondern vermutlich um eine Verunreinigung handelt (Daten nicht gezeigt).

Bei der Probe, bei der das Peptidoglykan mit Mutanolysin und dem Endolysin von CMP1 hydrolysiert wurde, wurde ein dominantes Signal detektiert, das ein Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 1018 Da repräsentiert (Abb. 53, A). Auch bei diesem Molekül weicht das gemessene Molekulargewicht von dem errechneten Molekulargewicht eines möglichen Fragments ab, so dass auch keine zuverlässige Aussage getroffen werden kann.

Für eine weitere Analyse dieses Moleküls wurde es fragmentiert und weiter untersucht. Nach der Fragmentierung dieses Moleküls wurden verschiedene Fragmente detektiert (Abb. 55).

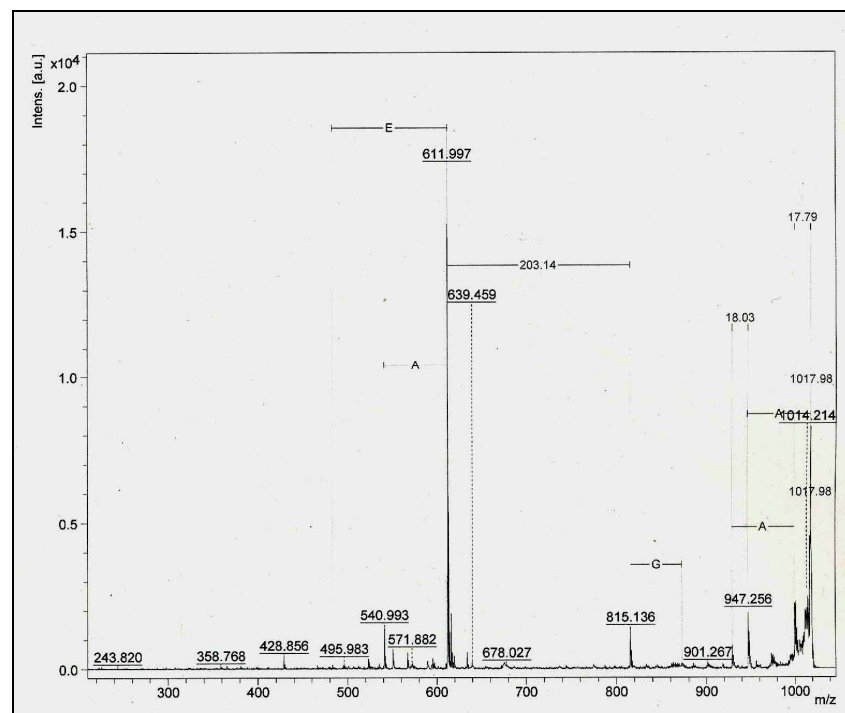


Abb. 55 MS-MS-Massenspektrum des 1018 Da-Moleküls nach Hydrolyse des *Cmm*-Peptidoglykans mit Mutanolysin und CMP1-Endolysin. Die Abbildung zeigt das Massenspektrum im positiven Ionenmodus.

Nach der Analyse der Größenunterschiede der verschiedenen Fragmente und dem Vergleich mit bekannten Molekülgrößen, konnten zumindest einigen ein eindeutiges Molekül mit dem jeweiligen Molekulargewicht zugeordnet werden. So könnten Größenunterschiede zwischen den Fragmenten vermutlich auf Abspaltungen von Alanin (A) basieren. Ebenso wurden weitere Differenzen zwischen den Fragmenten den Aminosäuren Glutamat (E) und Glycin (G) zugeordnet. Da bei der Analyse zumindest keine weiteren Größen ermittelt wurden, die auf Aminosäuren hinweisen, die nicht im Peptidoglykan auftreten, kann angenommen werden, dass es sich bei dem 1018 Da-Fragment möglicherweise um ein echtes Fragment des *Cmm*-Peptidoglykans handelt.

Aufgrund der Abweichung des ermittelten Molekulargewichts dieses Fragments von 1018 Da zu dem errechneten Wert (≈ 1017 Da) könnte zu diesem Zeitpunkt über die mögliche Schnittstelle des CMP1-Endolysins im Peptidoglykan nur spekuliert werden. Möglicherweise hydrolysiert das Endolysin die Peptidbindung zwischen der quervernetzenden Diaminobuttersäure und dem endständigen Alanin des Tetrapeptidstamms (Abb. 54). In diesem Fall würde ein etwa 1017 Da großes Fragment entstehen. Da die Abweichung der Messung aber zu groß ist, um eine zuverlässige Aussage treffen zu können und auch das entsprechende kleinere Fragment von ca. 841 Da nicht nachzuweisen ist, ist diese Hypothese nur sehr vage. Zur Ermittlung der genauen Schnittstelle des Endolysins im Peptidoglykan muss zunächst die Struktur einer nach Hydrolyse mit Mutanolysin entstehenden Peptidoglykan-Einheit ermittelt werden. Dazu müssen erst weitere Messungen erfolgen.

4. Phagentherapie - Einsatz von Bakteriophagen zur Behandlung bakterieller Infektionen

In dieser Arbeit sollte neben der Charakterisierung des *Clavibacter*-Phagen CMP1 auch die Frage nach einer möglichen Phagentherapie für mit *Cmm* infizierte Tomatenpflanzen geklärt werden. Dazu wurden verschiedene Pflanzentests durchgeführt. Deren Auswertung und Evaluation sollten zeigen, ob die Anwendung des Phagen zur Behandlung oder Prophylaxe von *Clavibacter*-Infektionen erfolgreich sein könnte. Es sind bereits Phagenpräparate auf dem Markt, die zur Bekämpfung und Prophylaxe von bakteriellen Infektionen in der Landwirtschaft eingesetzt werden. Ein Beispiel ist das Präparat AgriPhage der Firma Omnilytics, das zur Bekämpfung von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* im Paprika- und Tomatenanbau eingesetzt wird.

Auch bei Erkrankungen von Tomatenpflanzen, die durch *Ralstonia solanacearum* hervorgerufen werden und zur Welke der Pflanzen führen, konnte eine erfolgreiche Behandlung der Pflanzen mit Phagen zur Eliminierung der oberflächlich auftretenden Bakterien nachgewiesen werden

(Fox, 2000). Dabei wurde vor der Infektion ein Phagencocktail auf die Blätter der Tomatenpflanze gesprüht. Die behandelten Pflanzen zeigten in den darauffolgenden Wochen trotz Infektion keine Welke. Bei den genannten Beispielen handelt es sich um die Bekämpfung von Oberflächeninfektionen. Eine systemische Infektion wie bei *Clavibacter*-Infektion von Tomaten ist mit Sicherheit schwerer zu behandeln.

Der Einsatz von Phagen bei einer systemischen Infektion wie bei *Cmm* ist bisher auch noch nicht bekannt. Eine in der Praxis anwendbare Phagentherapie erschien von vornherein ziemlich unwahrscheinlich. Dennoch wurden einige Versuche unternommen, um die theoretische Möglichkeit der Therapie zu prüfen. Die Versuche wurden nicht so weit betrieben, dass sie alle statistisch abgesichert sind, sie geben aber erste Hinweise zur Klärung einiger Fragen.

4.1. Vorarbeiten für den Einsatz von CMP1 zur Behandlung infizierter Tomatenpflanzen

4.1.1. Stabilität aktiver Phagenpartikel im Boden

Bevor der Einsatz des Phagen CMP1 im Pflanzentest zur Verhinderung von *Cmm*-Infektionen überhaupt sinnvoll erschien, mussten zunächst einige Fragen zur weiteren Vorgehensweise geklärt werden. In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob und wie lange der Phage CMP1 im Boden stabil überdauern kann. Eine Adsorption der Phagen an Erdpartikel (Chattopadhyay and Puls, 2000) im Boden könnte bei einer möglichen Behandlung von infizierten Pflanzen durch Gießen mit einem Phagenlysat zu einer deutlichen Reduktion aktiver Phagenpartikel führen und somit die Erfolgchancen erheblich reduzieren.

Für die Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene Ansätze untersucht. Zu einer bestimmten Menge Bodenmaterial, in diesem Fall 3 g normale Pflanzenerde, wurde eine definierte Menge Phagen (5×10^9 , entspricht 1 ml Phagenlysat) zugesetzt und dieses „Gemisch“ anschließend unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Nach 24 h, 72 h, einer Woche und nach zwei Wochen wurde die Erde mit Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl) versetzt und für mehrere Stunden leicht geschüttelt, um die vorhandenen Phagen zu reisolieren, die anschließend zur Titerbestimmung ausplattiert wurden.

Insgesamt wurden vier verschiedene Ansätze verfolgt, deren Resultate miteinander verglichen werden sollten: es wurden nur Phagen zu der Pflanzenerde gegeben (Ansatz 1), Phagen und eine 1 ml H₂O, um den vermeintlichen Einfluss von Feuchtigkeit zu untersuchen (Ansatz 2), Phagen und eine definierte Menge an *Clavibacter*-Zellen (3×10^{10}) (Ansatz 3) und Phagen mit *Clavibacter*-Zellen (3×10^{10}) und zusätzlich 1 ml H₂O (Ansatz 4). Die Ansätze mit H₂O wurden über den gesamten Zeitraum des Versuchs (14 Tage) feucht gehalten. Die Zugabe von *Cmm*-Zellen sollte die Möglichkeit zur Vermehrung des Phagen bieten, um indirekt auch die Frage zu klären, ob und

wie lange der Phage ohne Wirt im Boden überdauern kann. Die verschiedenen Ansätze wurden jeweils in Form von drei eigenständigen Proben nach einem Tag, nach drei Tagen, nach einer Woche und nach zwei Wochen aufgearbeitet.

Nach der Bestimmung der jeweiligen Phagentiter konnte gezeigt werden, dass die Phagenpartikel im Boden stabil blieben und nur ein geringer Verlust zu verzeichnen ist (Daten nicht gezeigt). Es waren bei allen Ansätzen noch etwa 93% der Phagen zu detektieren. Die Zugabe von Wirtszellen für eine mögliche Infektion und Vermehrung der Phagen im Boden zeigte keinen Effekt, der Titer blieb unverändert und erhöhte sich nicht. Daraus lässt sich schließen, dass die Feuchtigkeit des Bodens vermutlich keinen Effekt auf die Stabilität der Virenpartikel hat. Andere Faktoren wie z. B. der pH-Wert wurden in dieser Studie nicht untersucht. Allgemein ist aber bekannt, dass Phagen recht stabil sind und durch verschiedene Parameter nicht angegriffen werden. Untersuchungen zur Stabilität von Phagenpartikeln von *Xanthomonas*-Phagen auf Tomatenpflanzen (Iriarte *et al.*, 2007) zeigten, dass der entscheidende Faktor aber die natürliche UV-Strahlung ist, durch die die aktiven Phagenpartikel eindeutig reduziert wurden. Bei einem Einsatz zur Phagentherapie, z. B. durch Besprühen von Pflanzen, könnte das Problem aber z. B. durch das Besprühen zu bestimmten Tageszeiten, in diesem Fall am Abend, oder durch Versetzen der Phagenpräparate mit Magermilch und Saccharose (Balogh *et al.*, 2003) zum Schutz vor UV-Strahlung vermindert werden.

4.1.2. Stabilität aktiver Phagenpartikel im Xylem der Tomatenpflanze

Besonders wichtig ist auch die Frage nach der Stabilität der Phagen innerhalb der Pflanze, die eine grundlegende Voraussetzung für die Bekämpfung einer systemischen Infektion ist. Zur Klärung dieser Frage wurden 5×10^9 Phagen mit frisch isoliertem Xylemsaft gemischt und nach unterschiedlichen Zeiträumen (1 h, 3 h, 24 h, 48 h) wieder getitert. Dabei konnten bei den anschließend ermittelten Titern keine Abnahme erkannt werden. Zuletzt wurde untersucht, ob in die Pflanzen applizierte Phagen wieder reisolieren können.

Dazu wurden die Wurzeln drei Wochen alter Tomatenpflanzen abgeschnitten und die Pflanzen anschließend in ein Phagenlysat getaucht. Nach einer Stunde wurden die Pflanzen ca. 10 cm über dem Boden abgeschnitten und der sich an der Schnittfläche sammelnde Xylemsaft abgenommen. In diesem konnten Bakteriophagen eindeutig nachgewiesen werden. Die Phagen scheinen sich also durch den Wasserstrom im Xylem frei bewegen zu können und werden nicht durch Bestandteile des Xylems an der Verteilung gehindert.

Es ließen sich in einem weiteren Versuch ebenso Phagen aus einer infizierten Pflanze reisolieren, die vorher nach dem Auftreten erster Welkesymptome in die Pflanzensprosse injiziert wurden. Nach acht Tagen konnten diese Phagen im Xylemsaft erneut nachgewiesen werden. Auch bei

Pflanzen, die über Verwundungen im Blattstielbereich infiziert und anschließend an dieser Stelle mit Phagen behandelt wurden, konnten nach mehreren Wochen Phagen im Xylemsaft identifiziert werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Phagen und Pflanzenviren von den Pit-Membranen möglicherweise an der Verbreitung im Xylem gehindert wurden (Opalka *et al.*, 1998). Im Fall der Tomatenpflanzen konnte dies nicht bestätigt werden.

Mit der Stabilität der Phagenpartikel im Boden und in der Pflanze sowie der Abwesenheit von Genen im Genom des Phagen für Lysogenie und Toxinproduktion waren wichtige Voraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz zur Bekämpfung von *Clavibacter*-Infektionen bei Tomatenpflanzen gegeben.

4.2. Methoden zur Infektion von Tomatenpflanzen mit *Cmm*

Am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie wurden für die Untersuchung von *Cmm*-Mutanten im Pflanzentest verschiedene Möglichkeiten zur Infektion der Tomatenpflanzen etabliert (Abb. 56). Bei der Wurzelinfektion werden zwei Wochen alte Pflänzchen für 15 min in eine Bakteriensuspension gestellt. Durch die Wunden im Wurzelbereich, die bei der Entnahme der Pflänzchen aus dem Boden entstanden sind, können die Bakterien in das Xylem der Pflänzchen eindringen und diese kolonisieren. Bei einer anderen Methode werden sechs Wochen alte Pflanzen über eine Petiolus-Infektion mit Bakterien infiziert. Dabei wird am zweiten oder dritten Fiederblatt in der Nähe des Sprosses der Blattstielbereich des Fiederblatts mit einer Nadel punktiert. Auf diese Stelle werden anschließend 10 µl einer *Cmm*-Kultur ($5 \cdot 10^8$ Zellen/ml) getropft. Beide Methoden wurden auch für die folgenden Pflanzentests mit *Cmm* und Phagen verwendet.

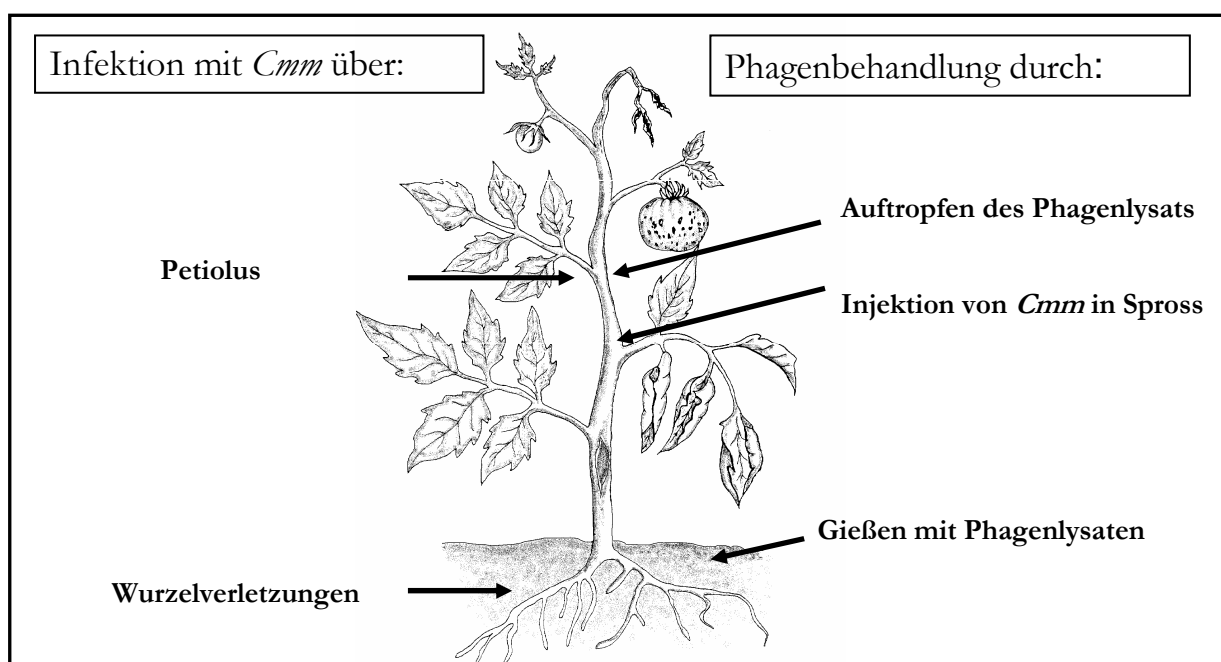


Abb. 56 Schema der Infektions- und Behandlungsstellen bei einer Tomatenpflanze

Im Verlauf der Versuche sollte untersucht werden, ob eine Phagenbehandlung bei den unterschiedlichen Infektionsmethoden einen Effekt zeigt. Die verschiedenen Infektionsmethoden sollten dabei die verschiedenen Möglichkeiten der natürlichen Infektion simulieren.

4.3. Behandlung von über die Wurzeln infizierten Pflanzen mit CMP1

Für einen ersten Versuch wurden zwei Wochen alte Pflänzchen zur Infektion für 15 min in eine verdünnte *Cmm*-Kultur (4×10^9 Zellen/ml) gestellt. Für die Infektion wurde der virulente *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stamm NCPPB382 verwendet. Virulenzanalysen dieses Stamms offenbarten, dass zwei Plasmide, pCM1 und pCM2, für die volle Ausbildung von Krankheitssymptomen verantwortlich sind (Meletzus *et al.*, 1993). Derivate dieses Stamms, die nur eines dieser Plasmide enthalten (CMM101, nur pCM1; CMM102, nur pCM2), zeigen eine deutlich verringerte Virulenz.

Im Anschluss an die Bakterieninfektion erfolgte eine Behandlung mit einem Phagenlysat, in das die Pflänzchen auch für 15 min gestellt wurden. Als Kontrollen wurden einige der mit *Cmm* infizierten Pflänzchen in TBY-Medium gestellt. Insgesamt wurden sechs Pflanzen pro Ansatz wie beschrieben behandelt.

Die so behandelten Pflänzchen wurden danach in Topferde gepflanzt und dann für die nächsten Wochen im Pflanzenraum unter Optimalbedingungen (8 h im Dunkeln, 19°C; 16 h im Licht (12000 lux), 25°C, 55% Feuchtigkeit) gehalten. Die mit Phagen behandelten Pflanzen wurden zudem noch mit dem eingesetzten Phagenlysat angegossen.

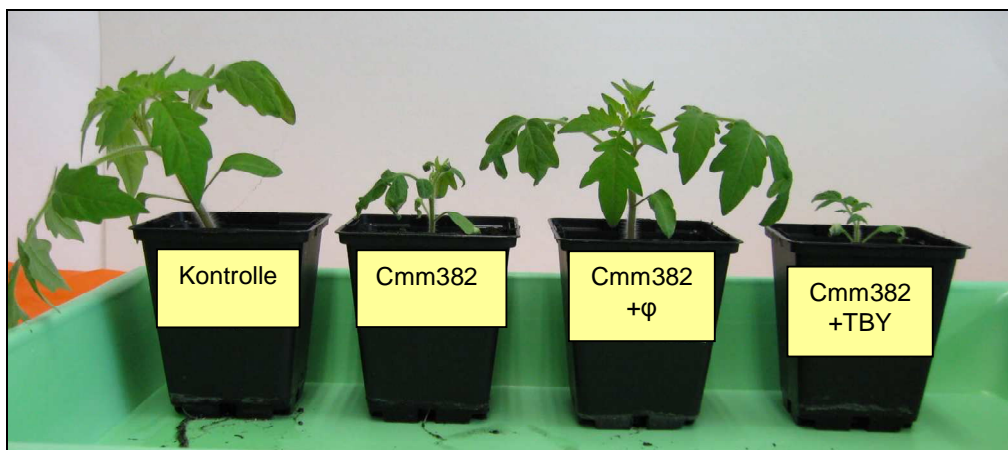


Abb. 57 5 Wochen alte Tomatenpflanzen 3 Wochen nach Infektion und anschließender Phagenbehandlung

Nach zwei Wochen ließen sich eindeutige Unterschiede bei den mit Phagen behandelten Pflanzen zu den Kontrollpflanzen detektieren (Abb. 57). Die mit *Cmm* infizierten Pflanzen wiesen charakteristische Welkesymptome auf, insofern sie nicht schon abgestorben waren.

Zudem war auch eine eindeutige Wachsminderung im Vergleich zu einer nicht infizierten Pflanze zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnten bei den Phagen behandelten Pflanzen keine Welkesymptome erkannt werden. Sie zeigten auch kein verringertes Wachstum oder sonstige Mangelerscheinungen.

Die Pflanzen, die nach der Infektion in TBY-Medium gestellt wurden, wiesen sowohl dieselben Welkesymptome als auch das verminderte Wachstum wie die infizierten Pflanzen ohne Phagenbehandlung auf. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um festzustellen, ob durch die der Infektion folgenden Behandlung die Bakterien einfach nur von der Pflanze abgewaschen werden und so die Infektion verhindert bzw. gemildert wird, oder ob die eingesetzten Phagen diesen Effekt durch Lyse der Bakterien auslösen. Zudem wurde ein Phagenrohlysat aus einer in TBY gewachsenen Kultur eingesetzt. Um die Unterschiede quantifizieren zu können, wurden dann jeweils die Pflanzen abgeschnitten und anschließend ihr Gewicht ermittelt (Abb. 58).

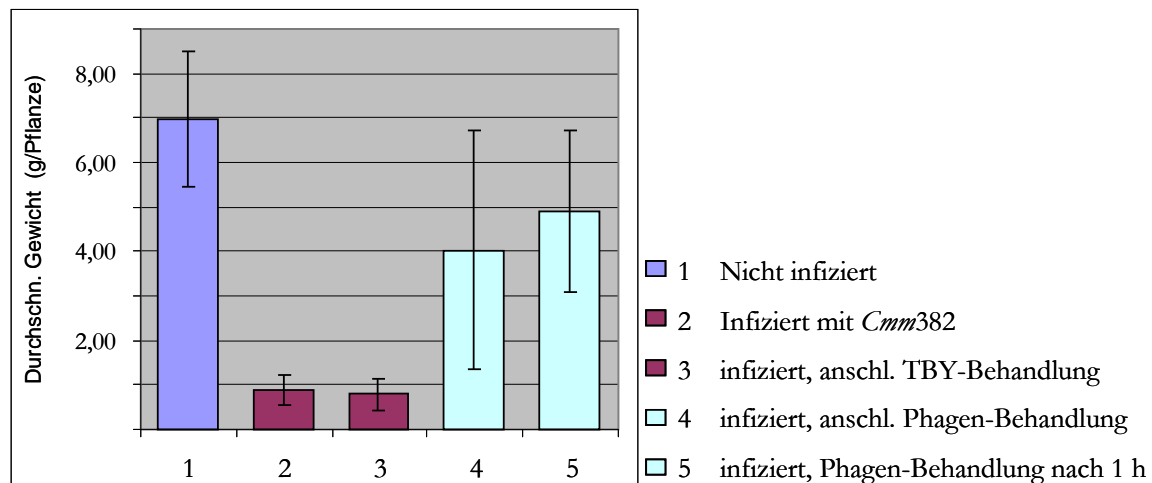


Abb. 58 Mittelwert der Frischgewichte der im Pflanzentest eingesetzten Pflanzen (n=6).

Nach der Auswertung konnte anhand der ermittelten Durchschnittsgewichte der behandelten Pflanzen gezeigt werden, dass eine Phagenbehandlung direkt nach der Kontaktaufnahme des Bakteriums mit der Pflanze eindeutig das Eindringen und die Ausbreitung des Bakteriums unterbinden kann.

4.4. Einfluss des Zeitpunkts der Phagenbehandlung nach Infektion mit *Cmm*

In einem weiteren Test sollte bei gleicher Infektionsmethode untersucht werden, wie lange nach einer möglichen Infektion durch *Cmm* eine Behandlung mit Bakteriophagen noch Erfolg versprechend ist. Dazu wurden 14 Tage alte Tomatenpflänzchen zur Infektion für 15 min in eine *Cmm*-Kultur (4×10^9 /ml) gestellt und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 5 h, 22 h, 28 h und 48 h) in ein Phagenlysat (Titer ca. 8×10^8 Phagen/ml) gestellt. Im Zeitraum zwischen

Infektion und Behandlung mit Bakteriophagen wurden die Pflänzchen in Wasser gestellt. Pro Ansatz wurden zwei Pflänzchen verwendet.



Abb. 59 Tomatenpflanzen zwei Wochen nach Infektion mit *Cmm* und anschl. Phagenbehandlung zu verschiedenen Zeitpunkten.

Nach zwei Wochen konnte auch bei diesem Test ein eindeutiger Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen detektiert werden (Abb. 59). Während die unbehandelten Pflanzen eindeutige Welkesymptome aufwiesen und fast schon abgestorben waren, zeigten nur die Pflanzen, die erst zwei Tage nach der Infektion mit *Cmm* mit Bakteriophagen behandelt wurden, Welkesymptome und ein beeinträchtigtes Wachstum.

Bereits zu diesem Zeitpunkt scheint also eine Behandlung mit Bakteriophagen keinen positiven Effekt mehr zu zeigen. Dies könnte zum einen mit einem möglichen Verschluss der Wunde durch die Pflanze, so dass keine Phagen mehr ins Xylem der Pflanze gelangen können, erklärt werden, zum anderen könnten sich die bereits in die Pflanze eingedrungenen Bakterien so weit vermehrt haben, dass der Titer der Phagen nicht mehr ausreicht, um alle Bakterien zu eliminieren. Zudem fiel bei der Reisolation von *Cmm* aus infizierten Pflanzen auf, dass die isolierte Suspension sehr schleimig war, was auf eine vermehrte Synthese von EPS in der Pflanze hinweist. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass die Phagen nicht mehr gut an die Bakterien adsorbieren können, da durch die Exopolysaccharide mögliche Rezeptoren zur Adsorption der Phagen an die Bakterienzellen überdeckt werden. Eine gesteigerte Synthese von EPS in der Pflanze könnte einer verbesserten Kolonisierung der Pflanze durch die Bakterien dienen. Wenn diese Steigerung direkt nach der Infektion der Pflanze initiiert würde, hätten die Phagen auch nur geringe Chancen zur Adsorption und damit zur Eliminierung der Bakterien. Zudem wurde in der Literatur die Hypothese aufgestellt, dass Phagen von systemisch auftretenden Phytopathogenen im Xylem nur sehr langsam an die Wirtsbakterien adsorbieren,

um deren sofortige Eliminierung durch Superinfektion zu verhindern, da ansonsten auch die Phagennachkommenschaft sehr gering wäre (Summer *et al.*, 2010). Die phytopathogenen Bakterien würden also auf der Kosten der Pflanze, aber zum Nutzen der Phagen nur langsam eliminiert.

Da die Symptome nach *Clavibacter*-Infektionen bei größeren Pflanzen relativ spät auftreten und dann schwer zu detektieren sind, würde eine Behandlung zu diesem Zeitpunkt nicht mehr erfolgreich sein. Einziger Ausweg wäre eine regelmäßige, prophylaktische Behandlung des Bodens mit aufgereinigten Bakteriophagen, was aber mit einem enormen Aufwand verbunden wäre.

4.5. Phagentherapie bei über Wurzelverwundungen infizierte Pflanzen durch Gießen mit Phagenlysaten

Um einer möglichen praktischen Anwendung näher zu kommen, sollten im nächsten Versuch die Pflanzen durch Gießen mit Phagenlysaten behandelt werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Wochen alte Tomatenpflänzchen über die Wurzeln wie beschrieben mit *Cmm* infiziert und anschließend in Erde gepflanzt. Nach dem Einpflanzen wurden sie dann direkt mit 1, 5 und 10 ml eines Phagenlysats (Titer $2,5 \times 10^9$ /ml) gegossen. Nach 24 h wurden die Pflanzen erneut mit denselben Mengen des Phagenlysats gegossen. Anschließend wurden sie bei Optimalbedingungen im Pflanzenraum gehalten.



Abb. 60 *Cmm*-infizierte Tomatenpflanzen nach Behandlung mit unterschiedlichen Mengen Phagenlysats, A (3 Wochen nach Infektion), B (4 Wochen nach Infektion).

Abb. 60 zeigt deutlich die Unterschiede im Pflanzenwuchs nach Infektion mit *Cmm* und anschließender Phagenbehandlung. Diese resultieren vermutlich aus den unterschiedlichen Mengen des eingesetzten Phagenlysats und der damit verbundenen eingeschränkten Möglichkeit zur Infektion und Kolonisation der Pflanzen durch *Cmm*.

Wie zu erwarten war, wurden die Kontrollpflanzen, die nach der Infektion nicht mit Phagen behandelt wurden, sehr schnell von *Cmm* kolonisiert und waren nach drei Wochen bereits abgestorben. Pflanzen, die mit geringen Mengen (1 ml) Phagenlysats behandelt wurden, wiesen zwar ein höheres Wachstum und ein etwas gesünderes Erscheinungsbild auf, allerdings ließen sich an diesen Pflanzen nach drei Wochen auch deutliche Welkesymptome nachweisen. Die eingesetzte Menge an Phagen scheint also einen verzögernden Effekt auf die Welke zu haben, indem die Anzahl der Bakterien bei der Infektion reduziert wird, ein effektiver Schutz vor einer Infektion kann so aber nicht erreicht werden. Der Einsatz steigender Mengen Phagenlysats lässt dagegen einen eindeutig positiven Trend erkennen. Bei Tomatenpflanzen, die mit höheren Mengen Phagenlysats gegossen wurden, traten weniger (5 ml) bis gar keine Welkesymptome auf (10 ml). In diesen Fällen haben die Phagen nach der Infektion vermutlich schon an alle Bakterienzellen adsorbiert und diese nach Durchlauf des lytischen Zyklus lysiert, so dass es zu keiner weiteren Kolonisation der Pflanzen kommen konnte.

Wie bereits erwähnt sollte parallel auch ein möglicher Effekt der Dauer einer Phagenbehandlung nach einer Infektion überprüft werden. Dazu wurden drei Wochen alte Tomatenpflänzchen mit *Cmm* infiziert und anschließend bis zu sechs Tage lang täglich mit 1 ml Phagenlysats gegossen.



Kontrolle	Kontrolle	1 x 1 ml	2 x 1 ml	3 x 1 ml	4 x 1 ml	5 x 1 ml	6 x 1 ml
- <i>Cmm</i>	+ <i>Cmm</i>	Phagen	Phagen	Phagen	Phagen	Phagen	Phagen

Abb. 61 *Cmm*-infizierte Tomatenpflanzen nach Behandlung mit Phagenlysats über unterschiedlich lange Zeiträume.

Nach 10 Tagen ließ sich ein leicht positiver Trend bezüglich des Wachstums der länger mit Phagen behandelten Pflanzen im Vergleich mit den kürzer behandelten Pflanzen erkennen (Abb. 61). Die Pflanzen, die nur ein bis drei Tage nach der Infektion mit dem Phagenlysats gegossen wurden, ließen im Vergleich mit unbehandelten Pflanzen kaum einen Unterschied im Wuchsverhalten und Ausbildung von Welkesymptomen erkennen. Sie sind sehr klein geblieben und zeigten an allen Fiederblättern zusammengerollte und vertrocknete Seitenfiedern. Pflanzen,

die länger als drei Tage mit dem Phagenlysat gegossen wurden, zeigten zumindest ein ausgeprägteres Wachstum. Ein Behandlungszeitraum von sechs Tagen ließ die Pflanzen zwar ein ähnliches Entwicklungsstadium einer nicht-infizierten Pflanze erreichen, allerdings zeigten sich hier verzögert auch Welkesymptome.

Vermutlich reduziert eine längere Behandlung der Pflanzen nach Infektion nur die Anzahl der Bakterien, wahrscheinlich schon außerhalb der Pflanzen im Wurzelbereich, so dass keine Bakterien mehr nachträglich ins Xylem eindringen konnten, eine komplette Unterbindung der Infektion konnte aber nicht erreicht werden.

4.6. Phagentherapie bei über den Blattstiel infizierte Pflanzen

In Gewächshäusern besteht die Gefahr, *Cmm* z. B. bei der Vermehrung der Pflanzen via Stecklinge durch die Benutzung bereits kontaminierter Werkzeuge weiterzuverbreiten. Um einen möglichen Einsatz von Phagen zur Prophylaxe, z. B. durch Besprühen der Schnittstellen, in diesen Fällen zu untersuchen, sollte auch dieser mögliche Infektionsweg durch eine gezielte Infektion der Blattstiele von Tomatenpflanzen mit *Cmm* und eine anschließende Behandlung mit Phagen simuliert werden. Dazu wurden bei sechs Wochen alten Pflanzen die Blattstiele des zweiten Fiederblatts mit einer Kanüle punktiert oder das Blatt direkt abgeschnitten. Zeitgleich wurden 10 µl einer verdünnten Bakteriensuspension auf die Schnittstelle aufgetropft und die Schnittstelle anschließend mit 10 µl Phagenlysat behandelt. Der Versuch wurde 2x mit 14 Pflanzen durchgeführt.

Während bei Pflanzentests, bei denen die Pflänzchen über die Wurzeln mit *Cmm* infiziert werden, keine Aussagen über die tatsächliche Anzahl der in die Pflanze eingedrungenen Bakterien getroffen werden können, können bei der so genannten Petiolus-Infektion Aussagen darüber getroffen werden, da definierte Mengen an Zellen für die Infektion eingesetzt werden.

Bei diesem Versuch wurde die OD_{580} der Bakteriensuspension auf den Wert 2 eingestellt, was einem Titer von etwa 1×10^9 Zellen/ml entspricht. Bei einem Einsatz von 10 µl einer 10^{-4} Verdünnung dieser Bakterienkultur werden also etwa 1000 Bakterien zur Infektion eingesetzt. Bei einem eingesetzten Volumen von 10 µl Phagenlysat (3×10^9 Phagen/ml) ergibt sich bei diesem Versuch so eine geschätzte *multiplicity of infection* von 10000:1.

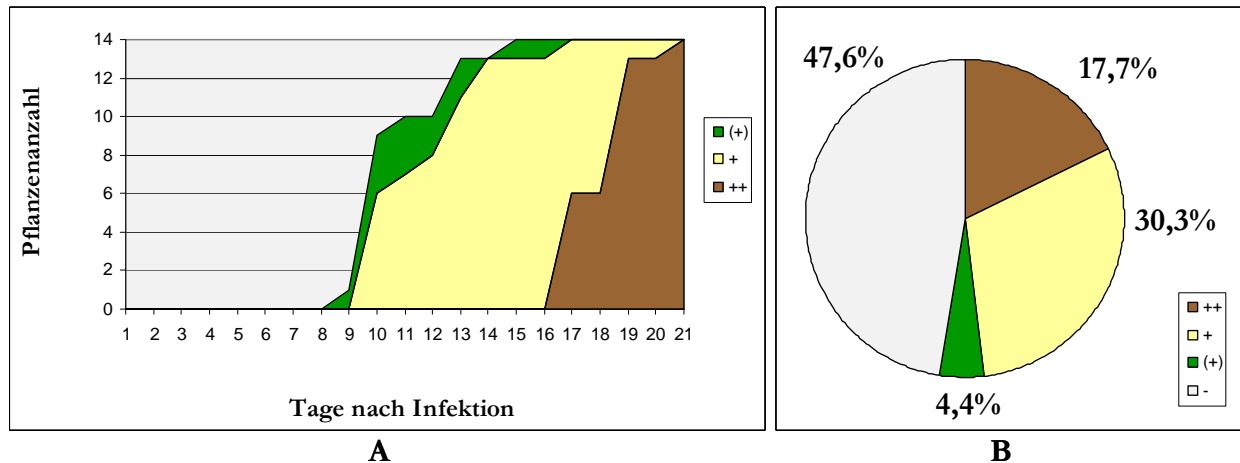


Abb. 62 A&B Welkeintensität der mit NCPPB382 infizierten Pflanzen über den dreiwöchigen Testzeitraum.

A: Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; **B:** Tortendiagramm: dargestellt ist die Häufigkeit [%], mit der während der drei Wochen infizierte Pflanzen in die einzelnen Kategorien “++“, “+“, “(+)“ bzw. “-“ (nicht welkend) eingestuft wurden.

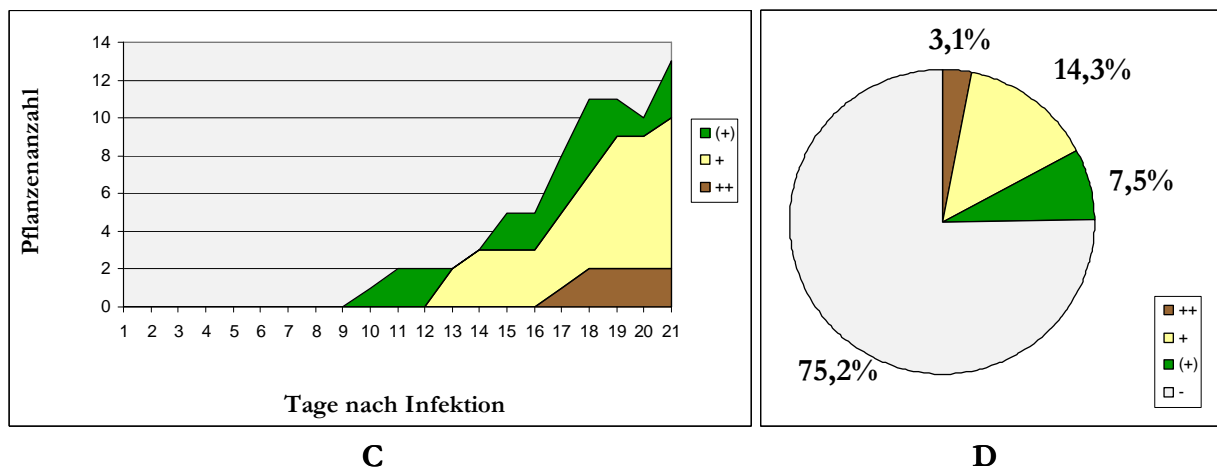


Abb. 63 C&D Welkeintensität der mit NCPPB382 infizierten und anschließend mit Phagen behandelten Pflanzen über den dreiwöchigen Testzeitraum.

C: Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; **D:** Tortendiagramm: dargestellt ist die Häufigkeit [%], mit der während der drei Wochen infizierte Pflanzen in die einzelnen Kategorien “++“, “+“, “(+)“ bzw. “-“ (nicht welkend) eingestuft wurden.

Ein Vergleich der beiden Welkediagramme (Abb. 62, A und 63, C) zeigt, dass sich die Welkeindizes deutlich voneinander unterscheiden. Der Welkeindex beschreibt den Zeitraum, nachdem 50% der infizierten Pflanzen eindeutige Welkesymptome zeigen. Während bei den unbehandelten Pflanzen bereits nach 11 Tagen 50% der Pflanzen eindeutige Welkesymptome aufweisen, wird dieser Wert bei den mit Phagen behandelten Pflanzen nach 18 Tagen deutlich verzögert erreicht. Nach drei Wochen lassen sich auch im Pflanzenwuchs eindeutige

Unterschiede feststellen. Bei der Petiolus-Applikation war also wie beim Gießen mit Phagenlysaten durch die Phagenbehandlung eine verzögerte und abgeschwächte Ausbildung von Welkesymptomen zu erkennen. Durch Tortendiagramme (Abb. 62, B und 63, D) lassen sich die Unterschiede am deutlichsten darstellen. Diese stellen den Status der Pflanzen über einen Zeitraum von 3 Wochen nach der Infektion dar. Man kann hier erkennen, dass durch die Phagenbehandlung deutlich weniger Pflanzen Welkesymptome aufwiesen (25% statt 52%) und diese auch deutlich schwächer waren (3,1% ++ statt 17,7% ++). Dies lässt auf eine Adsorption der Phagen an *Cmm* und eine anschließende Reduktion der Bakterienzahl durch Lyse schließen. Allerdings lässt sich auch erkennen, dass trotz der Phagenbehandlung nach 3 Wochen mehr als 66% der Pflanzen eindeutige Welkesymptome zeigen.

Ähnlich wie bei den Experimenten zur Phagentherapie bei Wurzelinfektionen lässt sich auch hier eine Infektion der Pflanzen durch *Cmm* nicht komplett unterbinden, nur erheblich verzögern. Zudem wurde gezeigt, dass auch der Zeitpunkt der Phagenbehandlung eine entscheidende Rolle spielt (Daten nicht gezeigt). Wurden die Pflanzen erst 30 min nach der Infektion mit Phagen behandelt, so wurden schon deutliche Unterschiede zu Pflanzen festgestellt, die direkt nach der Infektion behandelt wurden. Die direkt behandelten Pflanzen zeigten im Vergleich einen deutlich verzögerten Welkeverlauf.

In einer Reihe von Tests konnte gezeigt werden, dass der Phage CMP1 stabil im Boden und in der Pflanze über einen Zeitraum von mehreren Tagen überdauern kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass er auch durch die Pflanze mit dem Xylemstrom transportiert und verbreitet wird. Die Symptomausprägung durch die *Clavibacter*-Infektion konnte durch die Behandlung mit Phagen deutlich verzögert und reduziert wird. Dennoch scheint die Anwendung im großflächigen Tomatenanbau zur Therapie groß gewachsener Pflanzen nicht Erfolg versprechend. Möglichkeiten zur Steigerung der Erfolgchancen sind gering, lediglich eine Steigerung des Phagentiters durch Aufreinigung könnte erfolgreich sein. Aufgrund der niedrigen *burst size* von CMP1 wäre dieser Ansatz mit hohem Aufwand verbunden. Zudem bildet CMP1 auch nur Plaques auf *Cmm* NCPPB382, der in den Versuchen für die Infektion verwendet wurde, und nicht auf Umweltisolaten. Für eine erfolgreiche Anwendung eines Phagenpräparats außerhalb des Labors müssten weitere Phagen für *Cmm* isoliert werden, um einen Phagencocktail mit verschiedenen Phagen einsetzen zu können. Versuche zur Isolierung weitere Phagen waren bisher erfolglos.

Alle Pflanzentests sind aufgrund der Fülle der unterschiedlichen Parameter und dem geringen Platzangebot vor Ort nicht statistisch abgesichert und geben nur einen Trend wieder. Die einzelnen Versuche müssten ausgeweitet und weitere Parameter näher untersucht werden. Da aber die ersten Ergebnisse zeigten, dass eine Phagentherapie zur Bekämpfung einer solchen

systemischen Infektion mit einem hohen Aufwand verbunden und trotzdem nicht zuverlässig wirksam wäre, wurde auf eine Ausweitung der Experimente verzichtet und das Hauptaugenmerk auf die Identifizierung einer spezifischen Endopeptidase und die Konstruktion einer transgenen Tomatenpflanze gelegt.

5. Konstruktion einer transgenen Tomatenpflanze

Versuche, die zur Klärung der Frage eines möglichen Einsatzes von Bakteriophagen zur biologischen Bekämpfung von *Clavibacter*-Infektionen bei Tomatenpflanzen durchgeführt wurden, zeigten, dass der Einsatz von Bakteriophagen bei dieser systemischen Infektion wenig Erfolg versprechend ist. Mit *Cmm* infizierte Tomatenpflanzen, die anschließend mit Bakteriophagen behandelt wurden, wiesen zwar einen im Vergleich mit unbehandelten Pflanzen verzögerten Welkeverlauf auf, eine zuverlässig komplette Eliminierung der pathogenen Bakterien konnte aber nicht erreicht werden. Die Schwierigkeiten bei der Bekämpfung von *Cmm* mit Bakteriophagen können auf dem geringen Titer des Phagenlysats aufgrund der niedrigen Wurfgröße, dem mangelnden Transport der Phagen in der Pflanze oder der schlechten Vermehrung der Phagen im nährstoffarmen Xylem beruhen.

Einen Ausweg für dieses Problem bietet das Endolysin des Phagen CMP1, das nach der Sequenzierung und Annotation des Genoms identifiziert werden konnte. Mit verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es eine hohe Spezifität besitzt und nur Mitglieder der Subspezies von *Clavibacter michiganensis* lysiert. Für einen Einsatz zur Bekämpfung bereits infizierter Pflanzen oder zur Prophylaxe kann es aber nicht in Betracht gezogen werden, da dazu eine große Menge benötigt würde, da das Endolysin als Protein nicht die Möglichkeit zur Selbstreplikation wie z. B. ein Bakteriophage hat. Bei einem hohen Titer infizierender Bakterien wäre das Endolysin nach einer gewissen Zeit aufgebraucht, während sich die Bakterien weiter vermehren können.

Aus diesen Gründen sollte eine transgene Tomatenpflanze konstruiert werden, die das Gen für das hochspezifische Endolysin selbst trägt und exprimiert, so dass bei einer möglichen Infektion mit *Cmm* die Bakterien direkt abgetötet werden und die Pflanze so nicht kolonisiert werden kann. Voraussetzungen für die Konstruktion einer solchen transgenen Tomatenpflanze sind vor allem die bereits bewiesene hohe Spezifität und die Stabilität bzw. Aktivität des Proteins in der Pflanze. Diese konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden, das Endolysin zeigte auch in isoliertem Xylemsaft der Tomatenpflanze über einen längeren Zeitraum eine lytische Aktivität (s. Abschnitt 3.4.).

In Deutschland wurden bereits wissenschaftliche Projekte zur Herstellung transgener Kartoffeln und Apfelbäume durchgeführt, mit dem Ziel ein Phagenlysozym in der Pflanze zu exprimieren und so bakterielle Infektionen zu verhindern (Düring *et al.*, 1993; de Vries *et al.*, 1999; Ahrenholtz *et al.*, 2000; Salm *et al.*, 2006). Dabei wurde z. B. das Lysozym-Gen vom Phagen T4 verwendet. Dieses spaltet im Peptidoglykan die Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und dem N-Acetylglucosamin und degradiert daher unspezifisch das Peptidoglykan aller Eubakterien. Aus diesem Grund könnte die bakterielle Gemeinschaft der Habitate Boden und Pflanze in Mitleidenschaft gezogen werden, weshalb dessen Einsatz fragwürdig war.

Die Tomatenpflanze war eines der ersten Untersuchungsobjekte im Hinblick auf die Konstruktion transgener Pflanzen (Frary and van Eck, 2005). Methoden zur Transformation von Tomatenpflanzen mit genetischem Material anderer Organismen sind daher schon lange erprobt und etabliert. U. a. kann das genetische Material mit Hilfe von Agrobakterien, durch Beschuss der Zellen mit einer *particle gun*, Mikroinjektion oder durch eine Protoplastentransformation in die pflanzlichen Zellen eingeführt werden (Rakoczy-Trojanowska, 2002).

5.1. Konstruktion eines geeigneten Endolysin-Gens zur Expression in der Tomatenpflanze

Für die geplante Expression des Endolysin-Gens in einer Tomatenpflanze muss das Gen bestimmte Kriterien erfüllen. Zum einen muss das Genprodukt nach der Expression nachweisbar sein, zum anderen sollte das Endolysin auch in die Xylemgefäße der Pflanze gelangen, um dort eindringende *Clavibacter*-Zellen zu eliminieren. Zum einfachen Nachweis des Proteins wurde eine Sequenz für einen His-tag an das 3'-Ende des Gens fusioniert, um das exprimierte Genprodukt nach der Expression darüber detektieren zu können (Abb. 64). Für den Transport des Endolysins in die Xylemgefäße der Tomatenpflanze wurde das Endolysin-Gen am 5'-Ende zusätzlich mit einer Signalpeptid-Sequenz einer Chitinase aus der Sojabohne versehen (Gijzen *et al.*, 2001).



Abb. 64 Schematischer Aufbau des konstruierten Endolysin-Gens für die Expression in Tomatenpflanzen.

5.2. Anpassung des Codon-Gebrauchs

Pflanzen haben eine zu Bakterien und Phagen eine unterschiedliche *codon usage*. Deshalb könnte es bei einer Expression des Bakteriophagen-Gens in der eukaryotischen Tomatenpflanze aufgrund fehlender tRNAs für bestimmte Codons zu Problemen bei der Translation kommen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Sequenz des konstruierten Endolysin-Gens an den bereits bekannten Codon-Gebrauch der Tomatenpflanze *Solanum lycopersicum* angepasst (Abb.65).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
Optimiert : ATGAAGAACATGAAGCTCTGCTCTCTTATGCTTTGCCCTTTCCTCTGGTTTCCTTCTCGGTGCTACTGCTATGAGTGAGAA : 80
Original  : ATGAAAATATGAAAATGCTGCTCGGTGATGCTATGCTTATCACTAGGGTTTCCTTCTTGGGGCCACAGCAATGCTCCGAGAA : 80
ATGAA AA ATGAA T TG TC GT ATGCT TGC T TC CT GC TTCCTTCT GG GC AC GC ATG GAGAA

*      100     *      120     *      140     *      160
Optimiert : CCTCAATGACCACTTGAACCTGGTTGTGTATATGGTCAAATGGATCTCCAACTCAAGAGGAGGACCGCTGCTAAGT : 160
Original  : TCTTAACCGGCCACTAGAGCCGGGTGCTTTACATTGGCCAAATGGATCTACAGCTCAAGCGACGCTGCTGCAAAGT : 160
CT AA G CCACT GA CC GG TG GT TA AT GG CAAATGGATCT CA CTCAG G G AC GCTGC AAGT

*      180     *      200     *      220     *      240
Optimiert : ATCTTACGCTTAGGAGGAAACGTTTTCAAATGGACTAAGAGATGGATTACCATCACTTATGCTTATGGAGCAAAAAGATCA : 240
Original  : ATCTGACGCTTAGAAGCAACGTAATTCAAATGCGACTAAGCGATGGATTACCAATTACTTACGGGTATGGTCTAAGCGTAGC : 240
ATCT AC CTTAG AG AACGT TTCAAAT G ACTAAG GATGGAT AC AT AC TA GC TATGG GC AA G

*      260     *      280     *      300     *      320
Optimiert : AACGCTGATCAACAAATTCCTTGTGAACGGATGGAACAAGAGATGGCTGGATTCTATTATGCTGCTCTCTGTGGAAAATC : 320
Original  : AATCGGACCCAGCAGTTTCTTGTAAACGGCTGGAACAAGAGGCTACCGGGATTCTACTAGCGGCCCTCTGTAGGAAAGTC : 320
AA GC GA CA CA TT CTTGT AACGG TGAACAAGAG T CC GGATTCTA TA GC GC CCTGT GAAA TC

*      340     *      360     *      380     *      400
Optimiert : AAACCCCAACCTGGAGAGGCTTTTGATATCTATAACTGGGCTTGGGTTGGTGAAGCTGTGATTAAGGAGGAGGCTGCTA : 400
Original  : GAATCACCAGCCCGGCAAGCATTGATATCTAAGACTGGGGCTGGGTTGGCGAAGCTGTATCAAGGAAGAGGCGGCCA : 400
AA CACCA CC GG GA GC TT GATATCTA AACTGGGC TGGGTTGG GA GCTGT AT AAGGA GAGGC GC A

*      420     *      440     *      460     *      480
Optimiert : AACTTGGTCTTAGGAGAGATCCTTCTGAGAGATGGCATTGGAACGATGATGGTTCTGAGCCTTCTGCTATCGATTGAGT : 480
Original  : AGCTTGGGCTTAGGTCCTGAGCCTTCCGAACGCTGGCATTGGAACGAGGAGGGCTCCGAGGCCAGCGCAATTGATTGGTCT : 480
A CTTGG CT G G GA CCTTC GA G TGGCATTGGAACGA GA GG TC GAGCC GC AT GATTGG T

*      500     *      520     *      540     *      560
Optimiert : CTCTCGAGGATAACATGGGACTCGAGCCTAGAGAGCATGTGATGCTTACTAGACTCAACGATTTCTGGACACAGGGAGA : 560
Original  : CTTTGGAGGATAACATGGGACTCGAACCCCGGCAACCGTAAATGCTCACTCGCCTTAACGACTTCTGGACGAGGGTGA : 560
CT T GAGGATAACATGGGACTCGA CC G GA CA GT ATGCT ACT G CT AACGA TTCTGGAC CAGGG GA

*      580     *      600     *      620     *      640
Optimiert : GCCTGGATGCAATGAGGATGGACTGGGATATGACTTTGTGAGGATGGTACTTAGGCTGCTGGAGATGCTAGGGATATTA : 640
Original  : GCCGGGATGCAATGAGGATGGCTTGGTATCGGCTCTGTGGGATGGCTCCGTCAGGCCGGAGACGGGCTGATATCA : 640
GCC GG ATGCATGAGGATGG CT GG TAT G CT GTG G GATGG T G GC GC GGAGA GC G GATAT A

*      660     *      680     *      700     *      720
Optimiert : GTGGTGGATCAGGGAATAGATCGCTGAACCTCGAAAAGGCTGGAGCTTTCTTGAACACTAGAAATGGAGCACATCTTCCCA : 720
Original  : GCGGGGATATCGCTGCAAGATTGCAAGCTTGGAAGGCGGGCGCTTTCCTCAACACCGCATGGAGCACATCTTCCCA : 720
G GC GG ATC G GA AAGAT GC GA CT GA AAGGC GG GCTTTC T AACAC G ATGGAGCACATCTTCCCA

*      740     *      760     *      780     *      800
Optimiert : GATTCTGCTGGAAAACCTAGGTATACCAGTCTTTCGATGTGATCAGATATGAGCCTAAGGAGCACCAAAACACTAGGGA : 800
Original  : GATAGTCTGGCAAGCCTCTTACACCAGTCTTTTGTATGTCATCCGGTATGAGCCAAAAGAGCACCAGAACTACTCGGA : 800
GAT TGCTGG AA CCT G TA ACCAGTCTTT GATGT ATC G TATGAGCC AA GAGCACC AA ACT G GA

*      820     *      840     *      860     *      880
Optimiert : TGAGATTGCTGCTATCAAGGAATAATCGAGGCTATGGGTGCTCCTGCTCTCACTTCTGAACAATCTTGGAGCTTGGTA : 880
Original  : TGAGATTGGGGCAATTAAGGAATACATCGAAGCATTGGCGGCTCCGCTCTTACCTCTGAGCAGATCCTAGAACTTGC AA : 880
TGAGATTGC GG AT AAGGAATA ATCGA GC ATGGC GCTCC GCTCT AC TCTGA CA ATC T GA CTTGC A

*      900     *      920     *      940     *      960
Optimiert : AACACATCCAACTATCGATGAGGAGGCTATTATCGAAGAGTGACCAAGGCTGTTTTCAGGAATCAGGGATATCTTC : 960
Original  : AGCACATTGAGCCATCGATGAAGAGCTATCATCGAAGAGTCAACCAAGCGGCTCTTCAAGGCAATTCAGGGATATCTTC : 960
A CACAT CA CC ATCGATGA GA GCTAT ATCGA AA GT ACCAA GC GT T CA GG AT GGGATATCTTC

*      980     *      1000
Optimiert : CTGGATGCTGGAACTCCTGATAAAAACACCACCACCACCACCTGA : 1008
Original  : CTGGATGCTGGGACCCCGATAAAGAAACCACCACCACCACCACCTGA : 1008
CT GATGC GG AC CC GATAA AAACACCACCACCACCACCA TGA

```

Abb. 65 Sequenzvergleich des konstruierten Endolysin-Gens vor und nach der Optimierung des Codon-Gebrauchs. Schwarz markierte Bereiche repräsentieren Basenpaare, die unverändert blieben. Grau markierte und unmarkierte Bereiche zeigen Basenpaare, die im Zuge der Anpassung an den Codon-Gebrauch verändert wurden.

Anschließend wurde das Gen bei der Firma Mr. Gene neu synthetisiert. Nach der Optimierung besitzt das Gen nur noch Codons, für die die Tomatenpflanze eigene tRNAs besitzt, die abgeleitete Aminosäuresequenz bleibt aber identisch. Nach dem Vergleich der angepassten Sequenz des neu synthetisierten Gens mit der Originalsequenz konnte deutlich erkannt werden, dass die Anpassung unbedingt notwendig war, da 241 von 1008 Basen (ca. 24 %) geändert worden waren, um eine optimale Anpassung durchzuführen (Abb. 65). Ohne diese Modifikation wäre die erfolgreiche Expression des Phagen-Gens in der eukaryotischen Tomatenpflanze von Beginn an eher unwahrscheinlich gewesen. Zudem wurde die Shine-Dalgarno-Sequenz, die für die separate Expression der einzelnen Bindedomäne des Endolysins verantwortlich zu sein könnte, verändert, so dass eine Expression des C-terminalen Teils des Gens verhindert wird.

5.3. Konstruktion eines geeigneten Plasmids zur Transformation von Tomatenpflanzen mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

Zunächst benötigt das neusynthetisierte Endolysin-Gen für die erfolgreiche Expression in Tomatenpflanzen einen Promotor, der in Eukaryoten erkannt wird. Aus diesem Grund wurde für die Konstruktion eines geeigneten Vektors zur Transformation außerdem das Plasmid 35S-GFP (Abb. 66) verwendet (Niedz *et al.*, 1995). Dieses besitzt neben einer Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^r) zur Selektion in Bakterien, eine MCS, ein Gen für eGFP, einen NOS-Terminator und den 35S-Promotor. Der 35S Promotor ist ein starker konstitutiver Promotor, der aus dem Blumenkohlmosaikvirus stammt und für die Expression in dikotyledonen Pflanzen eingesetzt wird (Pauli *et al.*, 2004; Hull *et al.*, 2002).

Das an die *codon usage* der Tomatenpflanze angepasste Endolysin wurde über PCR so amplifiziert, dass das entstandene DNA-Fragment an den Enden SacI- bzw. BamHI-Schnittstellen aufwies, über die es in p35S-GFP inseriert werden konnte. Dabei wurde das Gen für das GFP durch das Endolysin-Gen ersetzt. Das entstandene Hybridplasmid wurde p35S-Endolysin genannt. Dieses Konstrukt wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI hydrolysiert, sodass ein Fragment entstand, das den 35S-Promotor mit dem folgenden Endolysin-Gen trug. Dieses Fragment wurde anschließend in den ebenfalls mit HindIII und EcoRI hydrolysierten Vektor pBin19 inseriert.

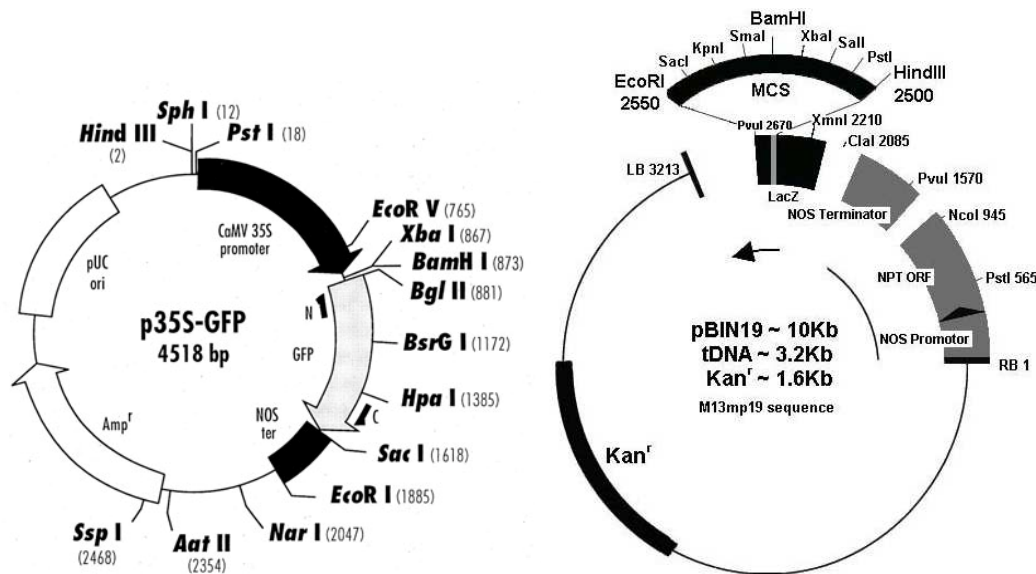


Abb. 66 Vektorkarten von p35S-GFP und pBin19.

Das Plasmid pBin19 ist ein binärer Vektor, der auf den Grundlagen des Ti-Plasmids konstruiert wurde (Bevan, 1984). Es ist ein Pflanzentransformationsvektor mit einer Kanamycin-Resistenzkassette (Kan^r) zur Selektion in Bakterien und einer *multiple cloning site* (MCS) zur Insertion von DNA-Fragmenten (Abb. 66). Zwischen den *left und right border*-Bereichen enthält pBin19 zudem einen Nopalin-Synthase (NOS)-Promotor, ein Gen für die Neomycin-Phosphotransferase (NPT) und einen Nopalin-Synthase (NOS)-Terminator. Die Neomycin-Phosphotransferase vermittelt transgenen Pflanzen zur Selektion eine Resistenz gegenüber Kanamycin.

Das Hybridplasmid aus pBin19 und dem Endolysin-Gen und p35-Promotor wurde pBin-35S-Endolysin genannt und für die Transformation von Tomatenpflanzen eingesetzt. Für die Transformation der Tomatenpflanzen wurde die Methode ausgewählt, bei der das Zielgen über *Agrobacterium tumefaciens*, das über Wunden in die Pflanze eindringt, in die Pflanzenzellen eingeschleust werden.

Dabei werden das Ti-Plasmid aus *A. tumefaciens* und seine Fähigkeit, DNA in infizierte Pflanzenzellen zu transferieren und ins Pflanzengenom zu integrieren, genutzt, um Pflanzenzellen über diesen Vektor mit Fremd-DNA zu transformieren.

5.4. Transformation von Tomatenpflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation der Pflanzenzellen wurde zunächst der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (van Larebeke *et al.*, 1974) mit dem Plasmid pBin-35S-Endolysin transformiert und dann bei Optimalbedingungen (LB-Medium, 26°C) inkubiert.

Anschließend wurden in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) in Tübingen die Keimblätter von zwei Wochen alten, im Dunkeln gekeimten Keimlingen (*Solanum lycopersicum* MoneyMaker) für die Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* vorbereitet (Abb. 67, A). Dazu wurden die Blättchen an beiden Enden geschnitten und mit der Blattoberfläche nach unten auf Agarplatten mit „Conditioning Medium“ übertragen (Abb. 67, B). Die Schnittstellen an den Blättchen sollten das Eindringen des rekombinanten *Agrobacterium*-Stamms und der sich im Medium befindenden Hormone erleichtern. Die Zugabe der Phytohormone Naphthyllessigsäure (NAA) und Benzyl-Aminopurin (BAP) sollte das Wachstum der Blättchen beschleunigen. Die Blättchen wurden danach zwei Tage im Dunkeln bei RT inkubiert. Insgesamt wurden rund 600 Blättchen auf diese Weise für die Behandlung mit *Agrobacterium tumefaciens* vorbereitet.

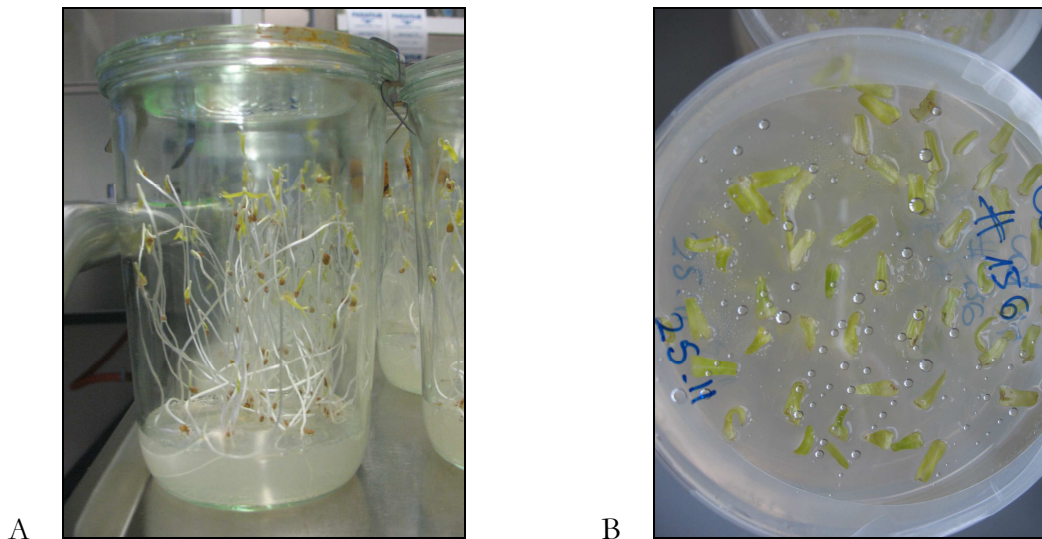


Abb. 67 Zwei Wochen alte Tomatenkeimlinge (A), Kotyledonen auf *Conditioning Medium* (B).

Für die Infektion der Kotyledonen mit dem rekombinanten *Agrobacterium*-Stamm wurde dieser in LB-Medium mit 0,2 mM Acetosyringon angezogen. Acetosyringon ist ein sekundärer Pflanzenstoff, der von verwundeten Pflanzen abgesondert wird und den Transfer der T-DNA aus *Agrobacterium* in die Pflanzenzelle induziert (Engström *et al.*, 1987; Stachel *et al.*, 1986).

Anschließend wurden wenige Tropfen der Bakteriensuspension auf die einzelnen Blättchen getropft. Danach wurden diese im Dunkeln bei RT inkubiert. In dieser Zeit sollten die Pflanzenzellen durch die Agrobakterien mit der konstruierten DNA transformiert werden. Nach zwei Tagen wurden die Blättchen mit der Blattoberfläche nach oben auf Selektionsmedium übertragen. Dieses enthält neben einigen Vitaminen (Thiamin, Nicotinsäure, u. a.) und dem Pflanzenhormon (Cytokinin) trans-Zeatin, zur Induktion des Sprosswachstums, das Antibiotikum Augmentan zur Eliminierung der Agrobakterien und das Antibiotikum Kanamycin zur Selektion möglicher transgener Zellen. Die Inkubation erfolgte dann im Pflanzenraum (14 h

Licht und 10 h Dunkelheit, 23°C, 50% Luftfeuchtigkeit). Die Blättchen wurden jede Woche auf frisches Selektionsmedium in sterilen Gläsern transferiert. Die Konzentration des Antibiotikums zur Selektion transgener Zellen wurde dabei kontinuierlich von 35 mg/l auf 100 mg/l gesteigert.



Abb. 68 Kotyledonen nach 1 Woche (links), Kotyledonen mit ersten Sprossbildungen nach 7 Wochen (rechts).

Eine Woche nach der Behandlung mit dem rekombinanten *Agrobacterium*-Stamm waren nur wenige Blättchen direkt abgestorben. Sie hatten eine bräunliche Färbung angenommen und ihr Gewebe war durchscheinend. Der Großteil der Blättchen war grün und zeigte ein deutliches Wachstum. Eine Kallusbildung war aber nicht zu erkennen. Nach 5 Wochen konnten erste Kallusbildungen identifiziert werden. In diesem Stadium wurden die Kallus bildenden Blättchen vereinzelt. Insgesamt konnten bei 93 von 600 Blättchen ein Kallus identifiziert werden.

Nach 7 Wochen konnten bei 19 Kalli erste Sprosse und Blättchen erkannt werden (Abb. 68 und 69).



Abb. 69 Kallus (Pfeil) mit gebildeten Sprossen und ersten Blättchen.

Nach 9 Wochen wurden einige Sprosse vom Kallus abgeschnitten und in „Rooting Medium“ überführt. Dieses enthält Indolelessigsäure zur Induktion des Wurzelwachstums der

abgeschnittenen Sprosse. Bereits nach wenigen Tagen ließ sich hier ein Wurzelwachstum an den abgeschnittenen Sprossen erkennen, so dass die Pflänzchen nach zwei Wochen in Pflanzenerde überführt werden konnten. Einige dieser Sprosse konnten zu kompletten Pflanzen regeneriert werden. Während die meisten Pflanzen einen normalen Phänotyp und normales Wachstum zeigten, konnte bei zwei Pflanzen die Ausbildung missgestalteter Blätter oder Blattanlagen beobachtet werden. Da die Integration des Endolysin-Gens nicht gerichtet geschieht, sondern das Gen willkürlich ins Genom inseriert wird, könnten diese Pflanzen Beispiele für einen Fall sein, bei denen das Gen in einen Bereich im Genom inseriert wurde, dessen Gene für die Ausbildung von Blättern verantwortlich sein könnten. So wäre die korrekte Expression der ursprünglichen Gene der Tomatenpflanze nicht mehr möglich und es würden vermutlich missgestaltete Blätter ausgebildet.

5.5. Überprüfung der korrekten Transformation und Insertion des Endolysin-Gens

Für die weiteren Versuche musste zunächst nachgewiesen werden, dass die aus den Kotyledonen regenerierten Pflänzchen tatsächlich korrekt transformiert und das Endolysin ins Genom inseriert wurde. Zu diesem Zweck wurde DNA aus Blättchen von möglichen transgenen Tomatenpflänzchen isoliert. Diese DNA wurde anschließend für eine PCR eingesetzt, durch die das Endolysin-Gen amplifiziert werden und auf diese dessen Insertion ins Genom verifiziert werden sollte. Im Gegensatz zur Positivkontrolle p35S-Endolysin konnte in den Proben mit der pflanzlichen DNA nach der Amplifikation und anschließender Gelelektrophorese keine distinkte Bande identifiziert werden (Abb. 70). Es war lediglich in ein paar Spuren ein leichter „Schmier“ (Spur 4, 8, 9, 12) auf Höhe des erwarteten PCR-Produkts zu erkennen.

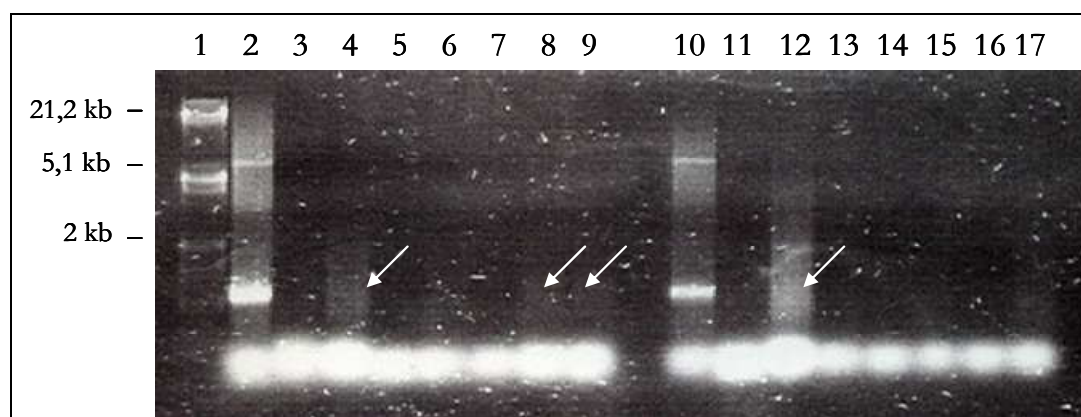


Abb. 70 Überprüfung der Amplifikation des Endolysin-Gens, Agarosegel 0,8%. Spur 1: Lambda-DNA, EcoRI/HindIII, Spur 2: p35S-Endolysin, Spur 3: DNA Pflanze1, Spur 4: DNA Pflanze2.1, Spur 5: DNA Pflanze3.1, Spur 6: DNA Pflanze3.2, Spur 7: DNA Pflanze3.3, Spur 8: DNA Pflanze5.1, Spur 9: DNA Pflanze5.2, Spur 10: p35S-Endolysin, Spur 11: DNA Pflanze5.3, Spur 12: DNA Pflanze6.1, Spur 13: DNA Pflanze6.2, Spur 14: DNA Pflanze7, Spur 15: DNA Pflanze7.1, Spur 16: DNA Pflanze9, Spur 17: DNA Pflanze9.1.

Um dennoch eine mögliche Integration des Endolysin-Gens nachweisen zu können, wurde mit den PCR-Produkten zur Verstärkung des Signals eine Southern Hybridisierung gegen das Endolysin-Gen durchgeführt (Abb. 71).

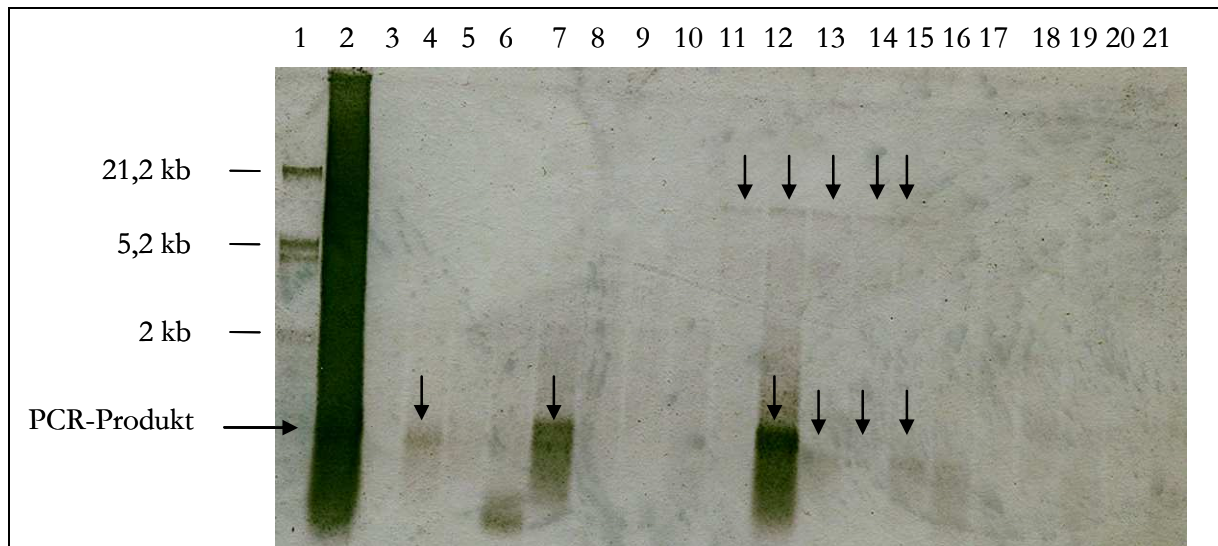


Abb. 71 Southern Hybridisierung der PCR-Proben mit pflanzlicher DNA von möglichen transgenen Tomatenpflanzen gegen eine Sonde aus dem Endolysin-Gen. Spur 3-21: PCR-Ansätze mit *template*-DNA aus möglichen transgenen Pflanzen Spur 1: Lambda-DNA, EcoRI/HindIII, Spur 2: p35S-Endolysin, Spur 3: Pflanze2.1, Spur 4: Pflanze3.1, Spur 5: Pflanze3.2, Spur 6: Pflanze5.1, Spur 7: Pflanze5.2, Spur 8: Pflanze6.1, Spur 9: Pflanze7.1, Spur 10: Pflanze9.1, Spur 11: Pflanze10, Spur 12: Pflanze10.1, Spur 13: Pflanze13, Spur 14: Pflanze13.2, Spur 15: Pflanze13.3, Spur 16: Pflanze15, Spur 17: Pflanze15.1, Spur 18: Pflanze16, Spur 19: Pflanze16.1, Spur 20: Pflanze16.2, Spur 21: Pflanze17.

Auf der Nylon-Membran (Abb. 71) lassen sich nach der Entwicklung des Blots Signale erkennen. Dabei konnten in den Spuren zwei verschiedene Signale detektiert werden. Zum einen konnten Signale nachgewiesen werden, die der Größe des PCR-Produkts (ca. 1 kb) entsprechen, zum anderen zeigten sich auch Signale, die der Größe chromosomaler DNA-Fragmente entsprechen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Amplifikation des Endolysin-Gens aufgrund der geringen Menge vermutlich im Agarosegel nicht zu erkennen, aber dennoch erfolgreich war. Somit konnte das Gen in einigen transformierten Tomatenpflänzchen nachgewiesen werden.

VI. Konstruktion und Einsatz einer transgenen Tomatenpflanze – ein Ausblick

In dieser Arbeit konnten bereits entscheidende Schritte zur Konstruktion einer transgenen Tomatenpflanze durchgeführt werden. Als wichtigste Voraussetzung für ein solches Projekt wurde ein Gen für ein Endolysin von CMP1 identifiziert, dessen Protein hochspezifisch nur Mitglieder der Subspezies von *Clavibacter michiganensis* lysiert und außerdem auch in isoliertem Xylemsaft von Tomatenpflanzen eine lytische Aktivität zeigt. Dieses Gen ist ein aussichtsreicher Kandidat für die Herstellung einer transgenen Tomatenpflanze.

Die pflanzlichen Zellen wurden über *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Für diese Transformationsmethode wurde ein passender Vektor mit dem Endolysin-Gen konstruiert. Dazu wurde die Sequenz des Endolysin-Gens für eine optimale Expression an die *codon usage* der eukaryotischen Tomatenpflanze angepasst. Dieses optimierte Endolysin-Gen wurde hinter die 35S-Promotorsequenz des *Cauliflower Mosaic Virus* aus dem Plasmid p35S inseriert, die für eine konstitutive und starke Expression des Gens sorgen soll. Außerdem wurde N-Terminal eine DNA-Sequenz fusioniert, die für ein Signalpeptid codiert, das den Transport des Proteins ins Xylem gewährleisten soll. Die zusätzliche C-terminale Fusion mit einem His-tag soll vor allem den schnellen Nachweis des Proteins ermöglichen. Nach der korrekten Klonierung des Gens und der Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit dem Hybridplasmid wurden ca. 600 Kotyledonen von zwei Wochen alten Tomatenkeimlingen transformiert. Nach mehreren Wochen ließ sich bei 93 Blättchen ein Kalluswachstum erkennen, von denen wiederum nach weiteren sieben Wochen 19 Sprosse und Blättchen entwickelten. Einige dieser Sprosse konnten zu kompletten Pflanzen regeneriert werden. Durch PCR und Hybridisierung gegen das Endolysin-Gen aus dem eingesetzten Vektor konnten bei einigen Pflanzen die Transformation und Integration des modifizierten Endolysin-Gens ins Genom der Tomatenpflanze nachgewiesen werden. Mit diesem Ergebnis wurde die Dissertation abgeschlossen.

Nach diesem ersten Nachweis der Integration des Endolysin-Gens in das Genom der Tomatenpflanze müssen im weiteren Verlauf verschiedene Tests erfolgen. Durch eine Southern-Hybridisierung von gespaltener Gesamt-DNA aus den Pflanzen könnten unterschiedliche Integrationsorte identifiziert werden. Diese transgenen Pflanzen sollen weiter untersucht werden. Die entscheidende Frage ist die nach der erfolgreichen Expression des Endolysin-Gens in der Pflanze. Der Expressionsnachweis kann über den Nachweis der mRNA durch RT-PCR und durch Identifizierung des Proteins über einen Immunoblot aufgrund des His-tag erfolgen. Sollte bei mehreren Pflanzen die Expression nachgewiesen werden, könnte eine weitere Analyse des Expressionslevels in den verschiedenen Pflanzen erfolgen. Mit beiden Methoden könnte auch versucht werden, die Expressionsstärke zu bestimmen. Die sicherste Methode ist dabei

wahrscheinlich von der Menge an cDNA in der PCR auf die mRNA-Menge zurückzuschließen. Auf diese Weise könnten schon Pflanzen, die eine besonders hohe Expression des Endolysin-Gens gewährleisten, für weitere Versuche ausgewählt werden.

Ab diesem Zeitpunkt könnten zwei verschiedene Strategien parallel verfolgt werden. Für eine zeitnahe Untersuchung einer möglichen Resistenz gegenüber Infektionen mit *Clavibacter michiganensis* könnten Erfolg versprechende Kandidaten über Stecklinge vermehrt werden. Diese könnten nach Wurzelbildung direkt für erste Tests eingesetzt werden.

Die zweite und sicherere Variante würde eine Selbstbefruchtung der möglichen Endolysin-exprimierenden Tomatenpflanzen beinhalten, so dass nach Bestäubung und Fruchtbildung die Samen aus den Tomaten isoliert werden könnten. Durch dieses Verfahren könnten nach Aussäen der erhaltenen Samen die Keimlinge auf eine stabile Vererbung des inserierten Gens überprüft werden. Kanamycin-resistente Keimlinge könnten dann für wiederum Pflanzentests eingesetzt werden. Interessant und entscheidend für den weiteren Verlauf ist dabei auch die Frage, ob diese Kanamycin-resistenten Pflänzchen im Hinblick auf das Endolysin-Gen homozygot oder heterozygot sind. Dies könnte durch eine Rückkreuzung mit dem Wildtyp beantwortet werden. Basierend auf den Mendelschen Regeln müsste die nächste Generation bzgl. ihrer Resistenz statistisch ausgewertet werden. D. h. das Verhältnis der Aufspaltung in resistente und nicht resistente Pflanzen müsste untersucht werden, um auf homozygote Eltern zurückschließen zu können, die dann das Gen stabil weitervererben könnten.

Falls die Pflanzen tatsächlich das Endolysin produzieren, wird zudem die Frage zu klären sein, ob das Enzym in der Lage ist, die Bakterien so weit zu reduzieren, dass die Pflanze keine Krankheitssymptome zeigt. Dazu müssen eine Reihe an Tests durchgeführt werden. Hier muss neben einer Standardinfektion mit *Cmm* über Wurzel oder Blattstiel ohne genaue Bestimmung des eingesetzten Bakterientiters eine Infektion erfolgen, bei der genau überprüft wird, wie viele Bakterien die transgene Pflanze im Vergleich zu einer Wildtyppflanze tolerieren kann, ohne Welkesymptome zu zeigen. Der Erfolg hängt sicherlich vorrangig von der Menge des produzierten Enzyms ab. Wenn das Enzym konstitutiv und in ausreichender Menge zur Verfügung steht, sollten die Bakterien bestenfalls bereits an der Eintrittspforte in die Pflanze lysiert werden.

VII. Anhang

Tabelle 7 Aktivität des CMP1-Endolysins auf verschiedenen *Microbacteriaceae*-Stämmen

Stamm	Lyse durch CMP1-Endolysin	Lyse durch CN77-Endolysin	Mureintyp **
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB3123	+	+	B2 γ (D- and L- DAB)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB382	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-10 (E. Hadar)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-11 (E. Hadar)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-15 (E. Hadar)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-16 (E. Hadar)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-17 (E. Hadar)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-18 (D. Zutra)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-19 (D. Zutra)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-24 (D. Zutra)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-25 (D. Zutra)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-29 (R. Hadas)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-30 (R. Hadas)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-31 (R. Hadas)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-32 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-33 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-34 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-38 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-39 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-40 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-42 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp.	+	+	

<i>michiganensis</i> I-44 (S. Manulis)			
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-46 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-48 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-50 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-52 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-54 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-56 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-58 (S. Manulis)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-62 (R. Hadas)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> I-63 (R. Hadas)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2579	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2580	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2581	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2582	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> ATCC27794	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2579	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> LMG5626	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> LMG5629	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> LMG5630	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> Her1088	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> CS7 (Laine et al., 1996)	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i> NCPPB1109	+	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i> ATCC33566	-	+	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i> LMG7295	-	+	
<i>Leifsonia aquatica</i> DSM20146	-	-	B2 γ (D- and L-DAB)
<i>Rathayibacter iranicus</i> NCPPB2253	-	-	B2 γ (L-DAB)
<i>Rathayibacter rathayi</i> NCPPB2980	-	-	

<i>Rathayibacter tritici</i> NCPPB255	-	-	
<i>Rathayibacter tritici</i> NCPPB1857	-	-	
<i>Okibacterium</i> sp.*	-	-	B2 α
<i>Frigoribacterium</i> sp.*	-	-	B2 α
<i>Microbacterium</i> sp.*	-	-	B1 α
<i>Aureobacterium</i> sp.*	-	-	B2 β
<i>Curtobacterium</i> sp.*	-	-	B2 β
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> subsp. <i>oorti</i> NCPPB2113	-	-	B2 β
<i>Arthrobacter ilicis</i> NCPPB1228	-	-	A3 α
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> DSM420	-	-	A3 α
<i>Bacillus megaterium</i> DSM32	-	-	A1 γ
<i>Bacillus mycoides</i> DSM2048	-	-	A1 γ
<i>Bacillus subtilis</i> DSM704	-	-	A1 γ
<i>Brevibacterium roseum</i> ATCC13825	-	-	A1 γ
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	-	-	A1 γ
<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i> ATCC13870	-	-	A1 γ
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM20478	-	-	A3 α
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM20174	-	-	A1 γ
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	-	-	A4 α
<i>Mycobacterium phlei</i> DSM412	-	-	A1 γ
<i>Rhodococcus fascians</i> NCPPB1488	-	-	A (m-Dpm)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DSM43241	-	-	A (m-Dpm)
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM19046	-	-	A3 α
<i>Escherichia coli</i>	-	-	A1 γ
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	A1 γ
<i>Aeromonas media</i>	-	-	A1 γ
<i>Paracoccus denitrificans</i>	-	-	A1 γ

* Umweltisolate (K.-H. Gartemann, Bielefeld, Germany)

** nach Schleifer and Kandler, 1972

Tabelle 8 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller CMP1-Gene mit der PSI-BLAST-Datenbank

<i>orf</i>	Position	No. of aa	Motif	Significant matches	e-value	Similarity	Identity	Accession No.
1	956-1330	124		putative DNA N-6-adenine-methyltransferase [Bacteroides phage B40-8]	0,93	20/38 (52%)	13/38 (34%)	YP_002221553
2 <i>hnb</i>	1357-1692	111	HNH endonuclease	HNH endonuclease [Chlamydomonas aggregans DSM 9485]	4,00E-08	39/61 (63%)	31/61 (50%)	YP_002461838
3	1801-2253	150		gp75 [Mycobacterium phage Twecy]	2,00E-07	33/60 (55%)	26/60 (43%)	YP_001469308
4	2250-2744	164		hypothetical protein YS40_078 [Thermus phage phiYS40]	0,23	31/60 (51%)	18/60 (30%)	YP_874091
5	3484-3744	86						
6	3753-3977	74						
7 <i>thy</i>	3974-4699	241	Thymidylate synthase complementing protein (pfam02511)	gp90 [Mycobacterium phage Caterna]	4,00E-45	139/242 (57%)	106/242 (43%)	YP_656098
8	4696-5109	137	DUF3310 (pfam11753)	hypothetical protein ph57 [Staphylococcus phage PH15]	1,00E-11	45/72 (62%)	34/72 (47%)	YP_950719
9	5113-5457	114		gp53 [Mycobacterium phage Phaedrus]	6,00E-04	60/167 (35%)	48/167 (28%)	YP_002014664
10	5556-6203	215		Put. gene 52 protein, phage SPO1	2,4	36/81 (44%)	18/81 (22%)	YP_002300297
11 <i>terL</i>	6203-8821	872	Hom_end (pfam05204), terminase_6 (pfam03237)	hypothetical protein CMM_2749 [Cmm NCPPB 382]	0,01	23/39 (58%)	17/39 (43%)	YP_001223494
12	8832-10340	502		gp206 [Mycobacterium phage Caterna]	2,00E-48	188/366 (51%)	129/366 (35%)	YP_656186
13	10374-11444	356		hypothetical protein Xcel_0541 [Xylanimonas celulosilytica DSM 15894]	3,00E-35	196/392 (50%)	116/392 (29%)	ZP_03911328
14	11444-11800	118	DUF2190 (pfam09956)	hypothetical protein Xcel_0537 [Xylanimonas celulosilytica DSM 15894]	2,00E-06	93/197 (47%)	61/197 (30%)	ZP_03911324
15	11818-12942	374		hypothetical protein Oant_2305 [Ochrobactrum anthropi ATCC 49188]	0,022	46/81 (56%)	32/81 (39%)	YP_001370850
				uncharacterized conserved protein Xcel_0536 [Xylanimonas celulosilytica DSM 15894]	0,03	52/95 (54%)	32/95 (33%)	ZP_03911323
				hypothetical protein Xcel_0535 [Xylanimonas celulosilytica DSM 15894]	5,00E-09	150/369 (40%)	96/369 (26%)	ZP_03911322
				hypothetical protein LMA2_gp67 [Pseudomonas phage LMA2]	0,033	37/87 (42%)	25/87 (28%)	YP_002154301

orf	Position	No. of aa	Motif	Significant matches	e-value	Similarity	Identity	Accession No.
16	13130-13603	157		putative fiber protein [Lactococcus phage bIL77]	4,8	20/52 (38%)	16/52 (30%)	AAL17668
17	13603-14136	177		unknown [Lactococcus phage bIL67]	1,6	42/91 (46%)	29/91 (31%)	NP_042318
18	14136-14336	66		gp1.3 [Enterobacteria phage EcoDS1]	4,7	22/39 (56%)	13/39 (33%)	YP_002003747
19	14336-17593	1085	SGNH_hydrolase (cd00229)	gp238 [Mycobacterium phage Spud]	2,00E-22	81/127 (63%)	63/127 (49%)	YP_00224457
20	17593-19047	484		hypothetical protein MPM11_gp51 [Mycobacterium phage Min1]	5,2	36/80 (45%)	25/80 (31%)	YP_001294811
21 <i>ugp</i>	19050-19817	255	GDPD (pfam03009)	glycerophosphodiester phosphodiesterase [Bacillus pumilus SAFR-032]	1,00E-07	59/112 (52%)	38/112 (33%)	YP_001485440
22	19832-20704	290		gp10 [Mycobacterium phage Che9c]	2,7	25/49 (51%)	14/49 (28%)	NP_817687
23	20668-21399	243		GDSL-like lipase/acylhydrolase domain-containing protein [Synecoccus sp. PCC 7002]	0,61	64/152 (42%)	38/152 (25%)	YP_001734505
24	21399-21833	144		gp40 [Streptomyces phage phiC31]	0,9	49/97 (50%)	28/97 (28%)	NP_047931
25	21830-22303	157		hypothetical protein M1102_gp11 [Streptococcus phage M102, phage tail]	0,4	27/57 (47%)	17/57 (29%)	YP_002995468
26	22313-22546	77		hypothetical protein lb338_phage_22 [Lactobacillus phage Lb338-1]	1,9	24/54 (44%)	15/54 (27%)	YP_002790701
27	22546-23133	195		DNA transfer protein [Enterobacteria phage HK620]	0,003	44/94 (46%)	30/94 (31%)	NP_112086
28	23145-23909	254	Big_2_Bacterial_Ig-like domain (group 2)	conserved structural protein [Erwinia phage phiEa21-4]	1,00E-05	59/113 (52%)	39/113 (34%)	YP_002456061
29	24161-24670	169		gp197 [Mycobacterium phage Omega]	2,7	23/43 (53%)	15/43 (34%)	NP_818497
30	24805-25179	124						
31 <i>tmp</i>	25228-29883	1551	Tape_meas_TP901 (TIGR01760)	ORF001 [Staphylococcus phage 2638A]	2,00E-38	208/421 (49%)	124/421 (29%)	YP_239811
32	29883-31328	481		gp30 [Mycobacterium phage PLoI]	0,004	62/143 (43%)	45/143 (31%)	YP_655409
33	31319-34057	912		tail fiber protein [Rhodococcus phage ReqiPoco6]	0,007	107/235 (45%)	68/235 (28%)	ADD81001

orf	Position	No. of aa	Motif	Significant matches	e-value	Similarity	Identity	Accession No.
				conserved hypothetical protein [Barkhollteria sp. H160]	4,00E-11	124/282 (43%)	74/282 (26%)	ZP_03267285
34	34054-34731	225						
35	34751-35449	232		hypothetical protein [Lactococcus phage bIL67]	4,2	45/95 (47%)	24/95 (25%)	NP_042320
35 <i>lys</i>	35449-36369	306	cI00813, VanY, D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	gp8 [Mycobacterium phage Lij]	2,7	6/81 (44%)	21/81 (25%)	YP_655004
			CLECT, CLECT: C-type lectin (CTL)/C-type lectin-like (CTLD) domain					
36 <i>hnl</i>	36378-36704	108	3 TMH, DUF2453, Protein of unknown function (DUF2453)	hypothetical protein RSa133209_2565 [R. erubescens salmoninarum]	8,00E-11	69/103 (66%)	46/103 (44%)	YP_001625705
				ATCC 33209]				
38	36993-37301	102	1 TMH, COG5617, Predicted integral membrane protein [Function unknown]	gp20 [Enterobacteria phage ES18]	3,2	27/60 (45%)	18/60 (30%),	YP_224158
39	37436-37906	156		gp40 [Mycobacterium phage Che9d]	0,062	47/95 (49%)	30/95 (31%)	NP_818013
			terminator -23,2 kcal					
40	38616-39152 c	178		gp15 [Propionibacterium phage PA6] (Minor tail)	0,6	43/97 (44%)	33/97 (34%)	YP_001285591
41	39145-39546 c	133		ParB-like nuclease domain containing protein [Lactococcus phage P087]	7,9	15/31 (48%)	11/31 (35%)	YP_002875722
42	39677-39943 c	88		Pas24 [Actinoplanes phage phiAsp2]	0,087	33/70 (47%)	19/70 (27%)	YP_024810
43	39946-40323 c	125		hypothetical protein EpSSL_gp15 [Enterobacteria phage SSL-2009a]	0,36	28/58 (48%)	21/56 (38%)	YP_002720054
44	40325-42625 c	766		virulence-associated E. [Anabaena variabilis ATCC 29413]	3,00E-05	69/145 (47%)	36/145 (24%)	YP_323598
45	43000-43362 c	120		gp76 [Phage phiJ001]	2,7	33/63 (52%)	22/63 (34%)	YP_224000
46 <i>usb</i>	43490-44041 c	183	RPA2_OBF_family (cI09930)	hypothetical protein pCTX-M3_047 [Citrobacter freundii]	1,7	52/128 (40%)	33/128 (25%)	NP_775006
47	44038-45048 c	336		gp1 [Streptomyces phage phiC31]	3,00E-06	113/257 (43%)	60/257 (23%)	NP_047946
48 <i>efj</i>	45240-46127 c	295	ERF superfamily	gp70 [Mycobacterium phage Cjw1]	6,00E-06	72/171 (42%)	44/171 (25%)	YP_002014537
49 <i>exo</i>	46120-46830 c	236	35EXOc superfamily	DNA polymerase III [Streptomyces phage mu1/6]	1,00E-39	138/229 (60%)	105/229 (45%)	YP_579187

<i>orf</i>	Position	No. of aa	Motif	Significant matches	e-value	Similarity	Identity	Accession No.
50 <i>end</i>	46814-47245 c	143	HNHc superfamily	gp250 [Mycobacterium phage Myrna]	2,00E-13	59/144 (40%)	48/144 (33%)	YP_002225127
51 <i>hel</i>	47235-48836 c	533	DEAD_Helicase_C_P-loop NTPase, P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases	possible DNA helicase [Xanthomonas phage Xp15]	2,00E-10	160/430 (37%)	92/430 (21%)	YP_239310
52	49044-49430 c	128		gp72 [Mycobacterium phage Pukovnik]	1,6	29/70 (41%)	17/70 (24%)	YP_001994889
53	49430-49597 c	55						
54	49590-49910 c	106						
55	49910-50176 c	88		hypothetical protein KVP40.0160 [Vibrio phage KVP40]	0,63	21/34 (61%)	12/34 (35%)	NP_899406
56	50169-50528 c	119		hypothetical protein [Lactococcus bacteriophage_phi31]	0,97	17/34 (50%)	13/34 (38%)	CAC04165
57	50540-50959 c	139		hypothetical protein PAJU2_gp33 [Pseudomonas phage PAJU2]	3,9	19/31 (61%)	12/31 (38%)	YP_002284367
58	51000-51374 c	124		hypothetical protein L.rm1_gp33 [Lactobacillus phage L.rm1]	7,4	27/46 (58%)	11/46 (23%)	YP_002117701
59	51371-51574 c	67						
60	51567-52139 c	190		Valyl-tRNA synthetase [phage cdt1]	1,8	24/51 (47%)	14/51 (26%)	YP_001272548
61	52292-52756 c	154		hypothetical protein ORI028 [Pseudomonas phage 73]	9,5	34/66 (51%)	23/66 (34%)	YP_001293435
62	52757-52942 c	61						
63	52939-53331 c	130		hypothetical protein RUMGNA_01989 [Ruminococcus gnavus ATCC 29149]	0,011	44/96 (45%)	29/96 (30%)	ZP_02041223
64	53345-53644 c	99		hypothetical protein LGPKV5a_gp59 [Lactobacillus phage KC5a]	0,2	30/56 (53%)	19/56 (33%)	YP_529894
65	53644-54150 c	168		gp119 [Listeria phage A511]	0,19	18/28 (64%)	12/28 (42%)	YP_001468499
66	54237-54485 c	82		hypothetical protein PSS2_gp058 [Cyanophage PSS2]	0,94	25/55 (47%)	19/53 (35%)	YP_003084202

orf	Position	No. of aa	Motif	Significant matches	e-value	Similarity	Identity	Accession No.
67	54603-54818 c	71		partition protein, Enterobacteria phage P1	3,4	22/46 (47%)	16/46 (34%)	AAA32421
68	54919-55203 c	94		hypothetical protein rv5_gp187 [Escherichia phage rv5]	5,00E-05	22/35 (62%)	18/35 (51%)	YP_002003689
69	55297-55458 c	53						
70	55537- 55863 c	68						
71	55722-56015 c	97		hypothetical protein S-PM2p053 [Synecococcus phage S-PM2]	2,6	28/74 (37%)	16/74 (21%)	YP_195087
72	56091-56924 c	277		gp2 [Roseobacter phage SIO1]	0,27	43/82 (52%)	22/82 (26%)	NP_064739
73	57067-57318 c	83						
74	57738-57989 c	83						

VIII. Literaturverzeichnis

- Abedon, S. T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage*. 1, 46-49.
- Ackermann, H.W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol*. 154, 245-251.
- Ackermann, H.W., and Dubow, M.S. (1987). General properties of bacteriophages. In: *Viruses of prokaryotes*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Adams, M. H. and Park, B. H. (1956). An enzyme produced by a phage-host cell system. II. The properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*. 2, 719–736.
- Ahrenholtz, I., Harms, K., de Vries, J. and Wackernagel, W. (2000) Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme producing potatoes. *Appl Environ Microbiol*. 66, 1862- 1865.
- Akoh, C.C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H. and Shaw, J. F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res*. 43, 534-552.
- Alcantara, E. H., Kim, D. H., Do, S. I. and Lee, S. S. (2007). Bi-functional activities of chimeric lysozymes constructed by domain swapping between bacteriophage T7 and K11 lysozymes. *J Biochem and Mol Biol*. 40, 539-546.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25, 3389–3402.
- Arisaka, F., S. Kanamaru, P. Leiman and Rossmann, M. G. (2003). The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *Internat J Biochem Cell Biol*. 35, 16-21.
- Assadullah, S., Kakru, D. K., Thoker, M. A., Bhat, P. A., Hussain, N. and Shah, A. (2003). Emergence of low level vancomycin resistance in MRSA. *Indian J Med Microbiol*. 21, 196–198.
- Baba, T. and Schneewind, O. (1996). Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*. 15, 4789–4797.
- Bailly-Bechet, M., Vergassola, M. and Rocha, E. (2007). Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Res*. 17, 1486-1495.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, T. M., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. and Jackson, L. E. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis*. 87, 949-954.
- Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E. and Jones, J. B. (2008). Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease*. 92, 1048-1052.
- Barner, H. D. and Cohen, S. S. (1954). The induction of thymine synthesis by T2 infection of a thymine requiring mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 68(1), 80–88.
- Bateman, A. and Rawlings, N. D. (2003). The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci*. 28, 234–237.

- Bayer, M., Eferl, R., Zellnig, G., Teferle, K., Dijkstra, A., Koraimann, G. and Högenauer, G. (1995). Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection. *J Bacteriol.* 177, 4279–4288.
- Belfort, M., Maley, G. F. and Maley, F. (1983). Characterization of the *E. coli thyA* gene and its amplified thymidilate synthetase product. *Proc nat Acad Sci.* 80, 1858–1861.
- Bellemann, P. and Geider, K. (1992). Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterisation. *J Gen Microbiol.* 138, 931–940.
- Bender, C. L. and Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *J Bacteriol.* 165, 534–541.
- Bermpohl, A. (1990). Untersuchung der pathogenen Wechselwirkung zwischen *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Bermpohl, A., Dreier, J., Bahro, R. and Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol Res.* 151, 391–399.
- Bernadsky, G., Beveridge, T.J. and Clarke, A.J. (1994). Analysis of the sodium dodecyl sulfate stable peptidoglycan autolysins of selected gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 176, 5225–5232.
- Bernhardt, G. T., Wang, I.-N., Struck, K. D. and Young, R. (2001). A protein antibiotic in the phage Qb virion: Diversity in the lysis targets. *Science.* 292, 2326–2329.
- Bernhardt, G. T., Wang, I.-N., Struck, K. D. and Young, R. (2002). Breaking free: “Protein antibiotics” and phage lysis. *Research in Microbiology.* 153, 493–501.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711–21.
- Bienkowska-Szewczyk, K., Lipinska, B. and Taylor, A. (1981). The R gene product of bacteriophage lambda is the murein transglycosylase. *Mol Gen Genet.* 184, 111–114.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Black, L. W. (1988). DNA packaging in dsDNA bacteriophages. In: *The bacteriophages*, Vol. 2, pp. 321–363. Edited by R. Calendar. Plenum Press, New York.
- Black, L. W. (1995). DNA packaging and cutting by phage terminases: control in phage T4 by a synaptic mechanism. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 17, 1025–30.
- Blackwell, J. R. and Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 295, 10–12.
- Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Gorski, A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med.* 231, 366–377.

- Bradley, D. E. (1965). The structure of the head, collar and base-plate of „T-even“ type bacteriophages. *J Gen Microbiol.* 38, 395-408.
- Briers, Y., Miroshnikov, K., Chertkov, O., Nekrasov, A., Mesyanzhinov, V., Volckaert, G. and Lavigne, R. (2008). The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ. *Biochem Biophys Res Commun.* 374, 747-751.
- Briers, Y., Schmelcher, M., Loessner, M.J., Hendrix, J., Engelborghs, Y., Volckaert, G. and Lavigne, R. (2009). The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144. *Biochem Biophys Res Commun.* 383, 187–191.
- Briers, Y., Walmgah, M. and Lavigne, R. (2011). Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa* *J Appl Microbiol.* 110, 778–785.
- Brüssow, H., Canchaya, C. and Hardt, W. D. (2004). Phages and evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 560-602.
- Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P. and Iannelli, P. (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 51, 2765-2773.
- Carlson, R.R. and Vidaver, A. K. (1982). Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *Int J Syst Bacteriol.* 32, 315-326.
- Carlton, W., Braun, E. and Gleason, M. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology.* 88, 525-529.
- Catalano, C. E., Cue, D. and Feiss, M. (1995). Virus DNA packaging: the strategy used by phage λ . *Mol Microbiol.* 16, 1075–1086.
- Catalão, M. J., Gil, F., Moniz-Pereira, J. and Pimentel, M. (2010). The mycobacteriophage Ms6 encodes a chaperone-like protein involved in the endolysin delivery to the peptidoglycan. *Mol Microbiol.* 77, 672–686.
- Center, M. S., Studier, F. W. and Richardson, C. C. (1970). The structural gene for a T7 endonuclease essential for phage DNA synthesis. *Proc Natl Aca Sc, USA.* 65, 242–248.
- Chattopadhyay, S. and Puls, R. W. (2000). Forces dictating colloidal interactions between viruses and soil. *Chemosphere.* 41, 1279-1286.
- Chen, C.-L., Pan, T.-Y., Kan, S.-C., Kuan, Y.-C., Hong, L.-Y., Chiu, K.-R., Sheu, C.-S., Yang, J.-S., Hsu, W.-H. and Hu, H.-Y. (2008). Genome sequence of the lytic bacteriophage P1201 from *Corynebacterium glutamicum* NCHU 87078: Evolutionary relationships to phages from *Corynebacterineae*. *Virology.* 378, 226-232.
- Cheng, X. D., Zhang, X., Pflugrath J. W. and Studier, F. W. (1994). The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 4034–4038.
- Cook, F. D. and Katznelson, H. (1960). Isolation of bacteriophages for the detection of *Corynebacterium insidiosum*, agent of bacterial wilt of alfalfa. *Can J Microbiol.* 6, 121–126.

- Costanzo, M. and Pero, J. (1984). Overproduction and purification of a bacteriophage SPO1-encoded RNA polymerase sigma factor. *J Biol Chem.* 259, 6681–6685.
- Croux, C., Ronda, C., López, R., and García, J. L. (1993). Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol Microbiol.* 9, 1019-1025.
- Datar, R. V., Cartwright, T. and Rosén, C.-G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology.* 11, 349–357.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K. and Harris, R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. *nov.*, subsp. *nov.* and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. *nov.* pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int J Syst Bact.* 34, 107-117.
- Delbrück, M. (1940). The growth of bacteriophage and lysis of the host. *J Gen Physiol.* 23, 643-660.
- Delisle, A. L., Barcak, G. J. and Guo, M. (2006). Isolation and expression of the lysis genes of *Actinomyces naeslundii* phage Av-1. *Appl Environ Microbiol.* 72, 1110–1117.
- De Paepe, M. and Taddei, F. (2006). Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS Biol.* 4, e193.
- Deutsch, S. M., Guezenec, S., Piot, M., Foster, S. and Lortal, S. (2004). Mur-LH, the broad-spectrum endolysin of *Lactobacillus helveticus* temperate bacteriophage φ -0303. *Appl Environ Microbiol.* 70, 96-103.
- De Vries, J., Harms, K., Broer, I., Kriete, G., Mahn, A., Düring, K. and Wackernagel, W. (1999). The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. *System Appl Microbiol.* 22, 280-286.
- Diaz, E., Lopez, R. and Garcia, J. L. (1990). Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 87, 8125–8129.
- Diaz, E., Lopez, R. and Garcia, J.L. (1991). Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J Biol Chem.* 266, 5464–5471.
- Djurkovic, S., Loeffler, J. A. and Fischetti, V. A. (2005). Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 1225-1228.
- Dmitriev, B., Ehlers, S. and Rietschel, E. (1999). Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immunol.* 187, 173–181.
- Dong, H., Nilsson, L. and Kurland, C. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol.* 260, 649-63.
- Donovan, D. M., Kerr, D. E. & Wall, R. J. (2005). Engineering disease resistant cattle. *Transgenic Res.* 14, 563–567.

- Donovan, D. M., Lardeo, M. and Foster-Frey, J. (2006). Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiology Letters*. 265, 133–139.
- Doskar, J., Pallová, P., Pantůček, R., Rosypal, S., Růzicková, V., Pantůčková, P., Kailerová, J., Klepárník, K., Malá, Z. and Bocek, P. (2000). Genomic relatedness of *Staphylococcus aureus* phages of the international typing set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains. *Can J Microbiol*. 46, 1066-76.
- Doyle, M. and Erickson, M. (2006). Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*. 85, 960-973.
- Dreiseikelmann, B. and Wackernagel, W. (1978). The terminal redundant regions of bacteriophage T7 DNA: their necessity for phage production studies by the infectivity of T7 DNA after modification by various exonucleases. *Mol Gen Genet*. 159, 321-328.
- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M. and Lörz, H. (1993) Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant Cell*. 3, 597–598.
- Echandi, E. and Sun, M. (1973). Isolation and characterization of a bacteriophage for the identification of *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology*. 63, 1401–1403.
- Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H. and Burger, A. (2007). *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive pathogenic bacteria. In: *Plant-Associated Bacteria*, pp. 383–422. Edited by S. S. Gnanamanickam. Dordrecht: Springer.
- Eichenlaub, R. and Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies, molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 49, 7.1-7.20. First posted online on March 23, 2011.
- Engström, P., Zambryski, P., Van Montagu, M. and Stachel, S. (1987). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. *J Mol Biol*. 197, 635-45.
- Evtushenco, L. I., Dorofeeva, L. V., Subbotin, S. A., Cole, J. R. and Tiedje, J. M. (2000). *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' (Leifson, 1962) as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson, 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* (Davis *et al.* 1984) with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*. 50, 371-380.
- Fatmi, M. and Schaad, N. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol*. 51, 149-154.
- Feiss, M. and Widner, W. (1982). Bacteriophage lambda DNA packaging: scanning for the terminal cohesive end site during packaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79, 3498–3502.
- Ferrari, M. E., Bujalowski, W. and Lohman, T. M. (1994). Cooperative binding of *Escherichia coli* SSB tetramers to single stranded DNA in the (SSB)₃₅ binding mode. *J Mol Biol*. 236, 106-123.
- Fiedler, F. and Kandler, O. (1973) Die Mureintypen in der Gattung *Cellulomonas*. Bergey *et al.* *Arch Mikrobiol*. 89, 41-50.

- Fischetti, V. A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol.* 11, 393–400.
- Flaherty, J. E., Harbaugh, B. K., Jones, J. B., Somodi, G. C. and Jackson, L. E. (2001). H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *HortScience.* 36, 98–100.
- Fliss I., Emond, E., Simard, R. E. and Pandian, S. (1991). A rapid and efficient method of lysis of *Listeria* and other gram-positive bacteria using mutanolysin. *Biotechniques.* 11, 453-457.
- Fox, J.L. (2000). Phage treatments yield healthier tomato, pepper plants. *ASM News.* 66, 455–456.
- Frary, A. and Van Eck, J. (2005). Organogenesis from transformed tomato explants. *Methods Mol Biol.* 286, 141-50.
- Frey, P., Prior, P., Marie, C., Kotoujansky, A., Trigalet-Demery, D. and Trigalet, A. (1994). Hrp-mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. *Appl Environ Microbiol.* 60, 3175–81.
- Fulkerson, J. F. (1960). Pathogenicity and stability of strains of *Corynebacterium insidiosum*. *Phytopathol.* 50, 377–380.
- Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H. and Loessner, M. J. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66, 2951–2958.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., et al. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol.* 190, 2138-2149.
- Geiduschek, E. P. and Ito, J. (1982). Regulatory mechanisms in the development of lytic bacteriophages in *Bacillus*. In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, pp. 203-245. Edited by D. Dubnau. Academic Press, New York.
- Geiduschek, E. P. and Kassavetis, G. A. (1988). Changes in RNA polymerase. In: *The bacteriophages*, Vol. 1, pp. 93–109. Edited by R. Calendar. Plenum Press, New York.
- Gijzen, M., Kuflu, K., Qutob, D. and Chernys, J. T. (2001). A class I chitinase from soybean seed coat. *J Exp Bot.* 52, 2283-9.
- Gil, F., Catalão, M.J., Moniz-Pereira, J., McNeil, M., Leandro, P. and Pimentel, M. (2008). The lysis cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity. *Microbiology.* 154, 1364–1371.
- Goldfarb, A. and Palm, P. (1981). Control of promoter utilization by bacteriophage T4-induced modification of RNA polymerase α subunit. *Nucleic Acids Res.* 9, 4863-4878.
- Goode, D., Allen, V.M. and Barrow, P.A. (2003). Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 69, 5032-5036.

- Gorbalenya, A. E. (1994). Self-splicing group I and group II introns encode homologous (putative) DNA endonucleases of a new family. *Protein Sci.* 3, 1117–1120.
- Grimes, S., Jardine, P. J. and Anderson, D.L. (2002). Bacteriophage phi 29 DNA packaging. *Adv Virus Res.* 58, 255–294.
- Groth, A. C. and Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol.* 335, 667–678.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. and Loessner, M. J. (2009) Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol.* 75, 93–100.
- Hadden, J. M., Declais, A. C., Carr, S. B., Lilley, D. M. J. and Phillips, S. E. V. (2007). The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease. *Nature.* 449, 621–624.
- Hagens, S. and Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76, 513-519.
- Hanke, V., Geider, K. and Richter, K. (2003). Transgenic apple plants expressing viral EPS-depolymerase: evaluation of resistance to the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. In: Vasil IK (ed) Plant biotechnology: 2002 and beyond. Kluwer, Dordrecht, pp 153–157.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents.* 30, 118–28.
- Hatfull, G. F. (2010). Mycobacteriophages: genes and genomes. *Annu Rev Microbiol.* 64, 331-56.
- Hendrix, R. and Casjens, S. (1974). Protein fusion: a novel reaction in bacteriophage λ head assembly. *Proc Nat Acad Sci, USA.* 71, 1451–1455.
- Hendrix, R. and Casjens, S. (1975). Assembly of bacteriophage λ heads: Protein processing and its genetic control in petit λ assembly. *J Mol Biol.* 97, 187–199.
- Hermoso, J. A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J. L. and Menéndez, M. (2003). Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure.* 11, 1239-1249.
- Hesselbach, B. A. and Nakada, D. (1977). "Host shutoff" function of bacteriophage T7: involvement of T7 gene 2 and gene 0.7 in the inactivation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Virol.* 24, 736–745.
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Research.* 5, 282-304.
- Holtje, J.-V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 181–203.
- Hopwood, D.A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., and Schrepf, H. (1985). Genetic manipulations of *Streptomyces*. In: *A laboratory manual*. John Innes Foundation. Norwich, UK.

- Hoyle, B. and Beveridge, T. J. (1983). Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 46, 749–752.
- Hull, R., Covey, S. N. and Dale, P. (2002). Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risk and enhancing the debate. *Microb Ecol Health Dis.* 12, 1–5.
- Iida, S., Meyer, J., Bächli, B., Stålhammar-Carlemalm, M., Schrickel, S., Bickle, T. A. and Arber, W. (1983). DNA restriction—modification genes of phage P1 and plasmid p15B: Structure and *in vitro* transcription. *J Mol Bio.* 165, 1-18.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M. and Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 73, 1704–11.
- Jacob, F. and Fuerst, C. R. (1958). The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *J ge. Microbiol.* 18, 518-526.
- Ji, P., Campbell, H. L., Kloepper, J. W., Jones, J. B., Suslow, T. V. and Wilson, M. (2006). Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol Control.* 36, 358–367.
- Jones, J. B., Iriarte, F. B., Obradovic, A., Balogh, B., Momol, M. T. and Jackson, L. E. (2006). Management of bacterial spot on tomatoes with bacteriophages. *Proc Int Symp Biol Control Bact Plant Dis., 1st, Darmstadt, Germany*, 408, 154. Land-Forstwirtschaft: Mitt. Biol. Bundesanst.
- Jonsson, A. P. (2001). Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell Mol Life Sci.* 58, 868-84.
- Kandler, O. and Schleifer, K.-H. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 36, 407–477.
- Katsura, I. and Hendrix, R. W. (1984). Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell.* 39, 691-698.
- Kerr, D. E. and Wellnitz, O. (2003). Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J Anim Sci.* 81, 38-47.
- Kerr, C. and Sadowski, P. D. (1972). Gene 6 exonuclease of bacteriophage T7. I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 247, 305–310.
- Kerr, C. and Sadowski, P. D. (1975). The involvement of genes 3, 4, 5 and 6 in genetic recombination in bacteriophage T7. *Virology.* 65, 281–285.
- King, J., Lenk, E. and Botstein, D. (1973). Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage P22. II. Morphogenetic pathway. *J Mol Biol.* 80, 697–731.
- Kiraly, Z., EL-Zahaby, H. M. and Klement, Z. (1997). Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenesis bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J Phytopathol.* 145, 59–69.
- Klaus, S., Krüger, D. H. und Meyer, J. (1992). Bakterienviren. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Kretzer, J. W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K. P., Korn, C. and Loessner, M. J. (2007). Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Appl Environ Microbiol.* 73, 1992–2000.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305, 567–580.
- Krueger D. H., Schroeder, C., Hansen, S., and Rosenthal, A. H., (1977). Active protection by bacteriophages T3 and T7 against *E. coli* B- and K-specific restriction of their DNA. *Molec gen Genet.* 153, 99-106.
- Kuong, K. J. and Kuzminov, A. (2010). Stalled replication fork repair and misrepair during thymineless death in *Escherichia coli*. *Genes-to-Cells.* 15, 619–634.
- Kuty, G. F., Xu, M., Struck, D. K., Summer, E. J. and Young, R. (2010). Regulation of a phage endolysin by disulfide caging. *J Bacteriol.* 192, 5682-5687.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. and Pelletier, J. (2005). The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 102, 5174-5179.
- Labischinski, H., Goodell, E. W., Goodell, A. and Hochberg, M. L. (1991). Direct proof of a 'more-than single-layered' peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7 : a neutron small-angle scattering study. *J Bacteriol.* 173, 751-756.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Lehman, I. R. and Pratt, E. A. (1960). On the structure of the glycosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4 and T6. *J Biol Chem.* 235, 3254-3259.
- Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. and Rossmann, M. G. (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol Life Sci.* 60, 2356–2370.
- Lindberg, A. A. (1973). Bacteriophage Receptors. *Ann Rev Microbiol.* 27, 205-241.
- Liu, T. (1998). Biological control with tomato bacterial spot with hrp⁻ mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. MS thesis. Univ. FL Gainesville.
- Loeffler, J. M., Nelson, D. and Fischetti, V. A. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 294, 2170-2172.
- Loeffler, J. M. and Fischetti, V. A. (2003). Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and - resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 375-377.
- Loeffler, J. M., Djurkovic, S. and Fischetti, V. A. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 71, 6199-6204.
- Loessner, M. J., Wendlinger, G. and Scherer, S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol.* 16, 1231–1241.

- Loessner, M. J., Maier, S. K., Daubek-Puza, H., Wendlinger, G. and Scherer, S. (1997). Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J Bacteriol.* 179, 2845–2851.
- Loessner, M., Gäng, S., Wendlinger, G., Maier, S. and Scherer, S. (1998). The two component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: A large TTG start holin and an amidase endolysin. *FEMS Microbiology Letters.* 162, 265-274.
- Loessner, M. J., Inman, R. B., Lauer, P. and Calendar, R. (2000). Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol Microbiol.* 35, 324-340.
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F. and Scherer, S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol.* 44, 335-49.
- Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* 8, 480–487.
- Lohmann, T. M. and Ferrari, M. E. (1994). *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperatives. *Annu Rev Biochem.* 63, 527–570.
- López, R., González, M. P., García, E., García, J. L. and García, P. (2000). Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res Microbiol.* 151, 437-443.
- Lopez, R. and Garcia, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 553–580.
- Low, L. Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. and Liddington, R. C. (2005). Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *J Biol Chem.* 280, 35433–35439.
- Lwoff, A., Siminiovitch, L. and Kjedaard, N. (1950). Induction of the production of bacteriophages in lysogenic bacteria. *Ann Inst Pasteur Paris.* 79, 815-59.
- Mahanivong, C., Boyce, J. D., Davidson, B. E. and Hillier, A. J. (2001). Sequence analysis and molecular characterization of the *Lactococcus lactis* temperate bacteriophage BK5-T. *Appl Environ Microbiol.* 67, 3564-3576.
- Mailhammer, R., Yang, H.-L., Reiness, G. and Zubay, G. (1975). Effects of bacteriophage T4-induced modification of *Escherichia coli* RNA polymerase on gene expression *in vitro*. *Proc nat Acad Sci. (Wash.)* 72, 4928-4932.
- Malnoy, M., Faize, M., Venisse, J.-S., Geider, K. and Chevreau, E. (2005). Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Rep.* 23, 632–638.
- Mandel M. and Higa A.(1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 53, 159-62.
- Manoharadas, S., Witte, A. and Bläsi, U. (2009). Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *J Biotechnol.* 139, 118-123.

- Matthews, B. W. and Remington, S. J. (1974). Three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. *Proc nat Acad Sci, USA.* 71, 4178–4182.
- Meyer, R. R. and Laine, P. S. (1990). The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 54, 342-380.
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J. and Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J Bacteriol.* 175, 2131-2136.
- Metzler, M. C., Laine, M. and De Boer, S. H. (1997). The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEBS Letters.* 150, 1-8.
- Miller jr., R. C., (1975). Replication and molecular recombination of T-phage. *Annu Rev Microbiol.* 29, 355–375.
- Moak, M. and Molineux, I. J. (2004). Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol Microbiol.* 51, 1169-1183.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. and Griffiths, M.W. (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Prot.* 64, 927-933.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 15, 335-350.
- Myllykallio, H., Lipowski, G., Leduc, D., Filee, J., *et al.*, (2002). An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science.* 297, 105-107.
- Nakai, T. and Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol.* 153, 13-18.
- Nascimento, J. G., Guerreiro-Pereira, M. C., Fernandes Costa, S., São-José, C. and Almeida Santos, M. (2008). Nisin-triggered activity of Lys44, the secreted endolysin from *Oenococcus oeni* phage fOg44. *J Bacteriol.* 190, 457-461.
- Navarre, W. W., Ton-That, H., Faull, K. F. and Schneewind, O. (1999). Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage φ 11. *J Biol Chem.* 274, 15847-15856.
- Nelson, D., Loomis, L. and Fischetti V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 98, 4107.
- Nicholas, K., Nicholas, H. and Deerfield, D. (1997). Genedoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBnew News.* 4, 14.
- Niedz, R. P., Sussman, M. R. and Satterlee, J. S. (1995). Green fluorescent protein: An *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep.* 14, 403-406.
- Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfapseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta.* 190, 415-425.

- O'Flaherty, S., Ross, R. P. and Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 33, 801–819.
- Opalka, N., Brugidou, C., Bonneau, C., Nicole, M., Beachy, R. N., Yeager, M. and Fauquet, C. (1998). Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 95, 3323–3328.
- Otsuji, N., Sekiguchi, M., Iijima, T. and Takagi, Y. (1959). Induction of phage formation in the lysogenic *Escherichia coli* K-12 by mitomycin C. *Nature*. 184, 1079-80.
- Park, T., Struck, D. K., Dankenbring, C. A. and Young, R. (2007). The pinholin of lambdaoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. *J Bacteriol*. 189, 9135-9139.
- Pauli, S., Rothnie, H. M., Chen, G., He, X. and Hohn, T. (2004). The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *J Virol*. 78, 12120–12128.
- Perkins, D.N. *et al.* (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20, 3551-3567.
- Pfankuch, E. und Kausche, G. A. (1940). Isolierung und übermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen. *Naturwissenschaften*. 28, 46.
- Piuri, M. and Hatfull, G. F. (2006). A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. *Mol Microbiol*. 62, 1569-1585.
- Ponchon, L., Boulanger, P., Labesse, G. and Letellier, L. (2006). The endonuclease domain of bacteriophage terminases belongs to the resolvase/integrase/ribonuclease H superfamily: a bioinformatics analysis validated by a functional study on bacteriophage T5. *J Biol Chem*. 281, 5829–5836.
- Poteete, A. R. and Fenton, A. C. (1983). DNA-binding properties of the Erf protein of bacteriophage P22. *J Mol Biol*. 163, 257–275.
- Potvin, C., Leclerc, D., Tremblay, G., Asselin, A. and Bellemare, G. (1988). Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 214, 241-248.
- Powling, A. and Knippers, R. (1976). Recombination of bacteriophage T7 in vivo. *Mol Gen Genet*. 149, 63–71.
- Pritchard, D. G., Dong, S., Baker, J. R. and Engler, J. A. (2004). The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*. 150, 2079–2087.
- Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). Alternative methods of plant transformation--a short review. *Cell Mol Biol Lett*. 7, 849-58.
- Ramos-Gonzales, M.-I., E. Duque and Ramos, J. L. (1991). Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl Environ Microbiol*. 57, 3020-3027.
- Rao, V. B. and Feiss, M. (2008). The bacteriophage DNA packaging motor. *Annu Rev Genet*. 42, 647–681.

- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. and Bateman, A. (2010) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, 227-233.
- Rhuland, L. E., Work, E., Denman, R. F. and Hoare, D. S. (1955). The behaviour of the isomers of α,ϵ -diaminopimelic acid on paper chromatograms. *J Am Chem Soc.* 77, 4844-4846.
- Riley, I. T. and Gooden, J. M. (1991). Bacteriophage specific for the *Clavibacter* sp. associated with annual ryegrass toxicity. *Letters in Applied Microbiology.* 12, 158-160.
- Rocha, E. P. C. and Danchin, A. (2002). Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends in Genetics.* 18, 291-294.
- Rohwer, F. and Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol.* 184, 4529-4535.
- Romeiro, R. S., Karr, A. L. and Goodman, R. N. (1981). *Erwinia amylovora* cell wall receptor for apple agglutinin. *Physiol Plant Pathol.* 19, 383-390.
- Rudolph, R. and Lilie, H. (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56.
- Sanz, J. M., García, P. and García, J. L. (1996). Construction of a multifunctional pneumococcal murein hydrolase by module assembly. *Eur J Biochem.* 235, 601-605.
- Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G. and Santos, M. A. (2000). The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J Bacteriol.* 182, 5823-5831.
- Sasaki, J., Chijimatsu, M. and Suzuki, K.-I. (1998). Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 48, 403-410.
- Savilahti, H. and Bamford, D. H. (1987). The complete nucleotide sequence of the left very early region of *Escherichia coli* bacteriophage PRD1 coding for the terminal protein and the DNA polymerase. *Gene.* 57, 121-130.
- Schein, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biol Technology.* 7, 1141-1148.
- Schlegel, H. G. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart. New York. Thieme, 1992.
- Schmelcher, M., Shabarova, T., Eugster, M. R., Eichenseher, F., Tchang, V. S., Banz, M. and Loessner, M. J. (2010). Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. *Appl Environ Microbiol.* 76, 5745-56.
- Schneider, T., Senn, M. M., Berger-Bächi, B., Tossi, A., Sahl, H.-G. and Wiedemann, I. (2004). *In vitro* assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 53, 675-685.
- Schuch, R., Nelson, D. and Fischetti, V. A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature.* 418, 884-889.

- Serwer, P., Watson, R. H. and Hayes, S. J. (1987). Multidimensional analysis of intracellular bacteriophage T7 DNA: Effects of amber mutations in genes 3 and 19 *J Virol.* 61, 3499–3509.
- Sheehan, M. M., García, J. L., López, R., García, P. (1997). The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol Microbiol.* 25, 717-25.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature.* 254, 34–38.
- Shirako, Y., Vidaver, A. K. and Ackermann, H. W. (1986). Partial characterization of bacteriophages for *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense*. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 52, 793–800.
- Silverstein, J. L. and Goldberg, E. B. (1976). T4 DNA injection II. Protection of entering DNA from host exonuclease V. *Virology.* 72, 212-223.
- Smith, H. W. and Huggins, M. B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol.* 129, 2659–2675.
- Smith, H. W., Huggins M. B. and Shaw, K. M. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol.* 133, 1111–1126.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98, 503-517.
- Stacey, K. A. and Simson, E. (1965). Improved method for the isolation of thymine-requiring mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 90, 554–555.
- Stachel, S. E., Nester, E. W. and Zambryski, P. C. (1986). A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 83, 379-83.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. and Ward-Rainey, N. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 47, 479-491.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., Khattabi, M. E., Grijpstra, F., Zomer, A. L., Venema, G., Kuipers, O. P. and Kok, J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J Biol Chem.* 278, 23874-23881.
- Sternberg, N. (1990). Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 87, 103-107.
- Streisinger, G., Emrich, J. and Stahl, M. M. (1967). Chromosome structure in phage T4, III. Terminal redundancy and length determination. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 57, 292–295.
- Strider, D. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. *Tech Bull.* No. 193.
- Studier, F. W. (1969). The genetics and physiology of bacteriophage T7. *Virology.* 89, 562-574.
- Studier, F. W. and Maizel, J. V. (1969). T7-directed protein synthesis. *Virology.* 89, 575-586.

- Studier, F. W. and Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189, 113-30.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J. G. Jr (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 649-659.
- Summer, E. J., Enderle, C. J., Ahern, S. J., Gill, J. J., Torres, C. P., Appel, D. N., Black, M. C., Young, R. and Gonzalez, C. F. (2010). Genomic and Biological Analysis of Phage Xfas53 and Related Prophages of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol.* 192, 179-190.
- Summer, E. J., Liu, M., Gill, J. J., Grant, M., Chan-Cortes, T. N., Ferguson, L., Janes, C., Lange, K., Bertoli, M., Moore, C., Orchard, R. C., Cohen, N. D., and Young, R. (2011). Genomic and functional analyses of *Rhodococcus equi* phages ReqiPepy6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7. *Appl Environ Microbiol.* 77, 669-83.
- Tabor, S. and Richardson, C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 82, 1074–1078.
- Takahashi, S. (1977). Rolling circle replicative structure of bacteriophage λ DNA in a recombination deficient system. *Mol Gen Genet.* 152, 201–204.
- Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M. and Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell.* 11, 127–138.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. (1997). CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-82.
- Tsiantos, J. (1987). Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J Phytopathol.* 119, 142-146.
- Tuohimaa, A., Riipinen, K A., Brandt, K. and Alatossava, T. (2006). The genome of the virulent phage Lc-Nu of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, and comparative genomics with *Lactobacillus casei* phages. *Arch Virol.* 151, 947–965.
- Turner, M. S., Hafner, L. M., Walsh, T. P. and Giffard, P. M. (2004) Identification, characterisation and specificity of a cell wall lytic enzyme from *Lactobacillus fermentum* BR11. *FEMS Microbiology Letters.* 238, 9-15.
- Ulmer, J. E., Boum, Y., Thouvenel, C. D., Myllykallio, H. and Sibley, C. H. (2008). Functional Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* FAD-Dependent thymidylate synthase, ThyX, reveals new amino acid residues contributing to an extended ThyX motif. *J Bacteriol.* 190, 2056-2064.
- Vallejo, L. F. and Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact.* 3, 11.
- Valpuesta, J. M. and Carrascosa, J. L. (1994). Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Quart Rev Biophys.* 27, 107–155.

- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., and Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*. 252, 169-70.
- Vidaver, A. K., Gross, D. C., Wysong, D. S. and Doupnik, B. L. (1981). Diversity of *Corynebacterium nebraskense* strains causing Goss's bacterial wilt and blight of corn. *Plant Dis.* 65, 480-482.
- Vollmer, W. and Seligman, S. J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* 18, 59-66.
- Wagner, P. L. and Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun.* 70, 3985-3993.
- Wakimoto, S., Uematsu, T. and Mizukami, T. (1969). Bacterial canker disease of tomato in Japan. 2. Properties of bacteriophages specific for *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen. *Ann Phytopath Soc Japan.* 35, 168-173.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gray, N. J. (1982). Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951.
- Walkinshaw, M. D., Taylor, P., Sturrock, S. S., Atanasiu, C., Berge, T., Henderson, R. M., Edwardson, J. M. and Dryden, D. T. F. (2002). Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA. *Molecular Cell.* 9, 187-194.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N. and Hawk, H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology.* 23, 445-451.
- Wallis, F. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol Plant Pathol.* 13, 333-342.
- Wang, I. N., Dykhuizen, D. E. and Slobodkin, L.B. (1996). The evolution of phage lysis timing. *Evol Ecol.* 10, 545-558.
- Wang, I. N., Smith, D. L. and Young, R. (2000). Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol.* 54, 799-825.
- Wang, I.-N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics.* 172, 17-26.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature.* 239, 197-201.
- Weiner, J. H., Bertsch, L. L. and Kornberg, A. (1975). The deoxyribonucleic acid unwinding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 250, 1972-1980.
- White, M. C., Decker A. M. and Chaney, R. L. (1981). Metal complexation in xylem fluid. I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. *Plant Physiol.* 67, 292-300.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 95, 6578-6583.

- Wilson, K. S. and von Hippel, P. H. (1995). Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 92, 8793–8797.
- Wittmann, J., Eichenlaub, R. and Dreiseikelmann, B. (2010). The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. *Microbiology*. 156, 2366-73.
- Wittmann, J., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R. and Dreiseikelmann, B. (2011). Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*. *Bacteriophage*. 1, 6-14.
- Wright, G. D. (2004). D-Ala-D-Ala carboxypeptidase VanY. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn. Edited by Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F.), pp.859-860. Elsevier, London.
- Wyatt, G. R. and Cohen, S. S. (1953). The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem J*. 55, 774–782.
- Xu, M., Struck, D. K., Deaton, J., Wang, I.-N. and Young, R. (2004). A signal-arrest release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 101, 6415-6420.
- Xu, M., Arulandu, A., Struck, D. K., Swanson, S., Sacchettini, J. C. and Young, R. (2005). Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science*. 307, 113-117.
- Yang, Q., Hanagan, A. and Catalano, C. E. (1997). Assembly of a nucleoprotein complex required for DNA packaging by bacteriophage lambda. *Biochemistry*. 36, 2744–2752.
- Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D. and Fischetti, V. A. (2004). Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol*. 186, 4808-4812.
- Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D. and Fischetti, V. A. (2006). PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 188, 2711-2714.
- Young, R. (1992). Bacteriophage lysis: Mechanism and regulation. *Microbiol Rev*. 56, 430-481.
- Young, R. and Bläsi, U. (1995). Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev*. 17, 191–205.
- Young, I., Wang, I. and Roof, W.D. (2002). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol*. 8, 120-128.
- Yoshikawa, H. and Ito, J. (1981). Termini proteins and short inverted terminal repeats of the small *Bacillus* bacteriophage genomes. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 78, 1596–2600.
- Zagotta, M. T. and Wilson, D.B. (1990). Oligomerization of the bacteriophage lambda S protein in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 172, 912-921.
- Zhang, N. and Young, R. (1999). Complementation and characterization of the nested R α and R α 1 reading frames in the genome of bacteriophage lambda. *Mol Gen Genet*. 262, 659-667.

Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S. and Loessner, M. J. (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol.* 68, 5311-5317.

Zuber, S., Ngom-Bru, C., Barretto, C., Bruttin, A., Brüßow, H. and Denou, E. (2007). Genome analysis of phage JS98 defines a fourth major subgroup of T4-like phages in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 189, 8206-8214.

IX. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht.

Wittmann, J., Eichenlaub, R., and Dreiseikelmann, B. (2010). The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. *Microbiology* 156, 2366-2373.

Wittmann, J., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., and Dreiseikelmann, B. (2011). Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*. *Bacteriophage*. 1, 6-14.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und damit für die Ermöglichung der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Dreiseikelmann für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, ein immer offenes Ohr bei Problemen und viele hilfreiche Tipps zur Bewältigung selbiger, die vielen fachlichen und freundschaftlichen Gespräche und für die harmonische Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Niehaus und Frau Manuela Meyer möchte ich für die Hilfe bei der Analyse und Auswertung der massenspektrometrischen Experimente danken.

Vielen Dank an Frau Ulrike Harke für die vielen Gespräche, ihre kleinen, aber feinen Tipps bei verschiedenen Arbeitstechniken und das Bereitstellen von Material aller Art.

Ein herzliches Dankeschön auch an die aktuellen und ehemaligen Doktoranden „von gegenüber“ für die tolle Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bei Problemen. Frau Dr. M. Flügel danke ich besonders für die „Beseitigung“ von EDV-Problemen und das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit.

Frau Eva-M. Zellermann und Herrn Dr. K.-H. Gartemann danke ich für die Bereitstellung diverser Bakterienstämme für meine Versuche und die Hilfe bei der Analyse des CMP1-Genoms. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Frau Ilse Betzendahl und Herrn Tom Trapphoff für ihre Hilfe beim Mikroskopieren und bei Frau Brigitte Obasohan für ihr Management.

Bei Herrn Dr. P. Schumann und Frau Anika Wasner möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, bei der DSMZ Peptidoglykan nach den dortigen Standards isolieren zu können.

Herrn Dr. K. Berendzen und Frau Caterina Brancato (ZMBP Tübingen) danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Konstruktion der transgenen Tomatenpflanze.

Mein Dank gilt auch der Bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk für die nicht nur finanzielle, sondern auch ideelle Förderung während meiner Promotionszeit.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und für das Interesse an meiner Arbeit danken.

Ein großer Dank gilt auch meinem Großvater, der schon sehr früh die Freude an der Biologie in mir geweckt hat.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau Katharina für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung während meiner Promotionszeit und für das Ertragen meiner Launen nach nicht so erfolgreichen Labortagen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Diese Arbeit wurde auf alterungsbeständigem Papier (DIN EN ISO 9706) gedruckt.

Bielefeld, im Mai 2011

Johannes Wittmann

