



UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 17/2000

Dissertation

Bakteriophagen für *Acetobacter methanolicus*: Risikofaktoren für technische Prozesse und Carrier für genetische Information

Bärbel Kiesel

ISSN 0948-9452

**Bakteriophagen für *Acetobacter methanolicus* :
Risikofaktoren für technische Prozesse und Carrier für genetische
Information**

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von Dipl.-Biologin Bärbel Kiesel
geb. am 06.08.1952 in Greifenhain

Gutachter:

1. Prof. J.R. Andreesen
2. Prof. W. Babel
3. Prof. U. Hahn

Leipzig, den 29.11.1999

Bibliographische Beschreibung

Kiesel, Bärbel

Bakteriophagen für *Acetobacter methanolicus* : Risikofaktoren für technische Prozesse und Carrier für genetische Information

Universität Leipzig, Dissertation

135 S.; 233 Lit., 35 Abb., 24 Tab.

Referat

Acetobacter methanolicus ist aufgrund seiner fakultativ methylotrophen Lebensweise und Wachstumsoptima im sauren Milieu für biotechnische Verfahren in ungeschützten Fermentationen besonders geeignet. Allerdings sind Stämme dieser Art, wie prinzipiell alle Bakterien, dem Risiko von Phagenmultiplikationen ausgesetzt. Explosionsartige Vermehrung von Bakteriophagen kann zu erheblichen ökonomischen Verlusten durch Lyse des Produktionsstammes führen.

Anliegen der Arbeit war es daher zu klären, wie stark *A. methanolicus*-Stämme durch Phagen gefährdet sind, wie sich die Phagen/Wirts-Wechselbeziehungen gestalten und ob sich die Phagen auch zur Konstruktion neuer Leistungen nutzen lassen.

Erstmals wurden 5 Phagen für *A. methanolicus* isoliert. Die Phagen sind morphologisch identisch und aufgrund ihrer Struktur der Familie *Myoviridae* zuzuordnen; sie haben aber eng begrenzte definierte Wirtsbereiche, die eine eindeutige Unterscheidung der Phagen und Nutzung zur Phagentypisierung ihrer Wirte zulassen. Die Untersuchung der Phagenbestandteile zeigte Identität der Phagen Genome aber Unterschiede in der Struktur der Phagenhüllproteine (Depolymerasen) durch wirtskontrollierte Proteinmodifikation. Dies führt nach Transfektion und Vermehrung der Acm-Phagen im restriktionsdefizienten Stamm MB58/4 zu phänotypischer Wandlung der Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 in den Phagen Acm1 und zeigt, daß nur ein Phagenstamm für *A. methanolicus* isoliert werden konnte. Untersuchungen auf Lysogenie in *A. methanolicus* legen die Vermutung nahe, daß der Acm-Phage ein Satellitenphage ist, der durch Helferphagen in Form heterologer kryptischer Prophagen seinen Wirtsbereich ändert und dazu mit einer durch den Helferphagen codierten phagenassoziierten Depolymerase ausgestattet wird. Dieser Helferphage sollte gleichzeitig durch lysogene Konversion seines Wirtes die Lipopolysaccharid-Struktur der Zelloberfläche spezifizieren und damit die Adsorption des Acm-Phagen erst möglich machen.

Erstmals konnten phagenvermittelte Gentransferprozesse in methylotrophen Essigsäurebakterien nachgewiesen werden. Sowohl Transfektion als auch Transduktion sind im Phagen/Wirtssystem *A. methanolicus*/Phage Acm möglich. Während die Transduktion auf den Transfer zwischen Wildtyp und Mutanten eines Stammes und damit auf die Möglichkeit zur Feinkartierung von Genen des Stammes MB58/4 beschränkt ist, eröffnet die Transfektion den Gentransfer aus den Stämmen MB70 und MB129 in den Stamm MB58/4 und bietet die Möglichkeit zur Vektorkonstruktion und zum Transfer genetischer Information zwischen verschiedenen Stämmen der Art *A. methanolicus*.

Meinem Mann und meinen Kindern gewidmet.

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Mikroorganismen | 11 |
| 2.1.1 Übersicht über verwendete Bakterien | 11 |
| 2.1.2 Kultivierung der Bakterien | 13 |
| 2.1.2.1 Nährmedien | 13 |
| 2.1.2.2 Kultivierung in Flüssigmedium | 14 |
| 2.1.2.3 Kultivierung auf Festmedium | 14 |
| 2.1.2.4 Bestimmung der Zelldichte | 15 |
| 2.1.2.5 Stammhaltung | 15 |
| 2.2 Bakteriophagen | 15 |
| 2.2.1 Grundtechniken zum Arbeiten mit Phagen | 15 |
| 2.2.1.1 Nachweis von Bakteriophagen | 15 |
| 2.2.1.2 Isolierung, Anreicherung und Anlegen von reinen Phagenlinien | 16 |
| 2.2.1.3 Ermittlung der Wirtsbereiche der Bakteriophagen | 17 |
| 2.2.1.4 Bestimmung der Parameter der lytischen Entwicklung | 18 |
| 2.2.1.5 Gewinnung reiner Phagen-Suspensionen mit hohem Titer | 18 |
| 2.2.2 Charakterisierung kompletter Phagen | 19 |
| 2.2.2.1 Serologische Untersuchungen | 19 |
| 2.2.2.1.1 Gewinnung von Anti-Phagen-Seren | 19 |
| 2.2.2.1.2 Reaktionen der Phagen mit Antiseren | 19 |
| 2.2.2.2 Beständigkeit der Phagen gegen thermische und chemische Noxen | 20 |
| 2.2.2.2.1 Thermische Inaktivierung freier Phagen | 20 |
| 2.2.2.2.2 Abhängigkeit der Vitalität der Phagen vom pH-Wert des Mediums | 20 |
| 2.2.2.2.3 Beständigkeit gegen Chloroform | 20 |
| 2.2.2.2.4 Überlebensraten nach UV-Exposition | 20 |
| 2.2.3 Charakterisierung der Phagenbausteine | 21 |
| 2.2.3.1 Isolierung und Charakterisierung der DNA | 21 |
| 2.2.3.1.1 Präparation | 21 |
| 2.2.3.1.2 Restriktionsendonucleaseverdau und gelelektrophoretische Trennung | 21 |
| 2.2.3.1.4 Southern-Transfer | 23 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.3.1.5 | Nick-Translation und Hybridisierung | 24 |
| 2.2.3.1.6 | Elektronenmikroskopische Techniken | 25 |
| 2.2.3.2 | Analyse der Phagenhüllproteine | 25 |
| 2.2.3.2.1 | Gewinnung der Hüllproteine | 25 |
| 2.2.3.2.2 | Elektrophoretische Trennung der Proteine | 25 |
| 2.2.3.2.3 | Silberfärbung | 26 |
| 2.2.3.2.4 | Auswertung der Gele | 26 |
| 2.3 | Vergleichende Untersuchung von <i>Acetobacter methanolicus</i> -Stämmen | 27 |
| 2.3.1 | Präparation der chromosomalen DNA | 27 |
| 2.3.2 | Untersuchungen auf Homologie zwischen Phagen- und Bakterien-DNA | 27 |
| 2.3.3 | Untersuchung auf Lysogenie durch Induktion von Prophagen | 28 |
| 2.3.3.1 | Mikrobiologischer Induktionsnachweis | 28 |
| 2.3.3.2 | Elektronenmikroskopische Darstellung induzierter Partikel | 28 |
| 2.4 | Gentransfer bei <i>A. methanolicus</i> | 28 |
| 2.4.1 | Transduktion am System <i>A. methanolicus</i> MB58/4-Phage Acml | 28 |
| 2.4.1.1 | Auswahl der Rezipientenstämmen | 28 |
| 2.4.1.2 | Transduktionsexperimente | 29 |
| 2.4.1.3 | Optimierung der Transduktion | 30 |
| 2.4.1.4 | Stabilitätsuntersuchungen an Transduktantenklonen | 31 |
| 2.4.1.5 | Transduktionsuntersuchungen für weitere Auxotrophiemarker | 31 |
| 2.4.2 | Transfektion | 31 |
| 2.4.2.1 | Erzeugung von Sphäroplasten und deren Regeneration | 31 |
| 2.4.2.2 | Gewinnung der DNA zur Transfektion | 32 |
| 2.4.2.3 | Methode der Transfektion | 32 |
| 2.4.2.4 | Isolierung transfektiv vermehrter Phagen (TAcM-Phagen) | 33 |
| 2.4.2.5 | Überprüfung der Wirtsbereiche | 33 |
| 2.4.2.6 | vergleichende Restriktionsuntersuchungen der DNA der AcM- und TAcM-Phagen | 33 |
| 2.5 | Verwendete Medien und Lösungen | 34 |
| 2.5.1 | Medien | 34 |
| 2.5.2 | Puffer und Lösungen | 35 |
| 2.5.3 | Enzyme | 38 |
| 3. | Ergebnisse | 39 |
| 3.1 | Isolierung und Charakterisierung von Phagen für <i>A. methanolicus</i> | 39 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.1.1 | Nachweis, Isolierung und Benennung von Phagen | 39 |
| 3.1.2 | Wirtsbereiche der Acm-Phagen | 45 |
| 3.1.3 | Parameter der lytischen Entwicklung der Acm-Phagen | 46 |
| 3.1.4 | Morphologie und Sensitivität gegen Umweltfaktoren | 50 |
| 3.1.4.1 | Ultrastruktur der Phagen | 50 |
| 3.1.4.2 | Neutralisation mit Anti-Phagen-Seren | 54 |
| 3.1.4.3 | Stabilität gegen physikalische und chemische Noxen | 56 |
| 3.1.4.3.1 | Thermische Inaktivierung freier Phagen | 56 |
| 3.1.4.3.2 | pH-Toleranz freier Phagen | 57 |
| 3.1.4.3.3 | Beständigkeit gegen Chloroform | 59 |
| 3.1.4.4 | Zusammenfassung | 60 |
| 3.1.5 | Bestandteile der Bakteriophagen | 61 |
| 3.1.5.1 | Hüllproteine | 61 |
| 3.1.5.2 | Nukleinsäuren | 65 |
| 3.1.5.2.1 | Molekulargewichte der Restriktionsfragmente nach Restriktionsspaltung | 65 |
| 3.1.5.2.2 | Genomgröße | 72 |
| 3.1.5.2.3 | Homologien zwischen den Nukleinsäuren der Acm-Phagen | 77 |
| 3.1.5.3 | Zusammenfassung | 79 |
| 3.2 | Lysogenie bei <i>Acetobacter methanolicus</i> | 80 |
| 3.2.1 | Mikrobiologischer Nachweis induzierter Phagen | 80 |
| 3.2.2 | Elektronenmikroskopischer Nachweis von Phagenpartikeln | 80 |
| 3.2.3 | Homologie zwischen Phagen-DNA und Chromosomen | 87 |
| 3.2.4 | Zusammenfassung | 89 |
| 3.3 | Gentransfer im System <i>Acetobacter methanolicus</i> / Acm-Phagen | 89 |
| 3.3.1 | Transduktion | 89 |
| 3.3.1.1 | Auswahl geeigneter Rezipientenstämme | 89 |
| 3.3.1.2 | Transduktion nach Standardprozedur | 90 |
| 3.3.1.3 | Optimierung der Transduktion mit dem Rezipientenstamm MB 58/4-101 | 90 |
| 3.3.1.3.1 | Einfluß von UV-Licht | 90 |
| 3.3.1.3.2 | Erhöhung der Effektivität durch Verringerung von Sekundärinfektionen | 93 |
| 3.3.1.3.3 | Einfluß der Wachstumsphase des Rezipienten auf die Höhe der EOT | 94 |
| 3.3.1.4 | Stabilitätsuntersuchungen an den Transduktanten | 95 |
| 3.3.1.5 | Transduktion weiterer Marker mit dem optimierten Transduktionssystem | 96 |
| 3.3.1.6 | Zusammenfassung | 96 |
| 3.3.2 | Transfektion für das System <i>A. methanolicus</i> und seine Phagen | 98 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.3.2.1 | Nachweis der Transfektion | 98 |
| 3.3.2.2 | Charakterisierung der durch Transfektion gewonnenen Phagen | 99 |
| 3.3.2.3 | Vergleich von AcM- und TAcM-Phagen | 99 |
| 3.3.2.4 | Zusammenfassung | 101 |
| 4. | Diskussion | |
| 4.1 | Phagen für <i>A. methanolicus</i> | 102 |
| 4.1.1 | Vergleich der AcM-Phagen mit Phagen anderer methylotropher sowie acidophiler Bakterien | 102 |
| 4.1.2 | AcM-Phagen - eine neue Phagen-Art? | 103 |
| 4.1.3 | AcM-Phagen - verschiedene Stämme einer Phagen-Art? | 104 |
| 4.2 | Lysogenie in Stämmen der Art <i>A. methanolicus</i> | 109 |
| 4.3 | Gentransfer mit AcM-Phagen | 112 |
| 4.3.1 | Transfektion | 112 |
| 4.3.2 | Transduktion | 114 |
| 5. | Zusammenfassung | 117 |
| 6. | Literatur | 120 |

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopischer Erstdnachweis von Bakteriophagen aus Fermentationen mit dem Stamm *Acetobacter methanolicus* MB58

Abbildung 2: Plaques des Phagen Acm1 auf seinem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB58/4

Abbildung 3: Plaques des Phagen Acm5 auf seinem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB70

Abbildung 4: Plaques des Phagen Acm6 auf dem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB70

Abbildung 5: Plaques des Phagen Acm6 auf dem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB129

Abbildung 6: Plaques des Phagen Acm7 auf seinem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB129

Abbildung 7: Plaques des Phagen Acm2 auf seinem Wirt *A. methanolicus* MB58/10

Abbildung 8: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm1 auf *A. methanolicus* MB58/4

Abbildung 9: Einstufenwachstumsexperiment mit dem Phagen Acm2 auf *A. methanolicus* MB58/10

Abbildung 10: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm5 auf *A. methanolicus* MB70

Abbildung 11: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm6 auf *A. methanolicus* MB129

Abbildung 12: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm7 auf *A. methanolicus* MB129

Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm1

Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm2

Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm5

Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm6

Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm7

Abbildung 18: Übersicht über ultrastrukturelle Merkmale der Acm-Phagen

Abbildung 19: Inaktivierung der 5 Acm-Phagen über ein Temperaturintervall von 32°C bis 60°C

Abbildung 20: pH-Stabilität der Acm-Phagen nach 24 h Inkubation in Theorell-Stenhagen-Puffer unterschiedlicher pH-Werte

Abbildung 21: Analyse der Phagenhüllproteine der Phagen Acm1, Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7 im PAA-Gradientengel

Abbildung 22: Spaltung der Acm-DNA mit den Restriktionsendonucleasen HindIII, PstI und PvuII

Abbildung 23: Spaltung der Acm-DNA mit den Restriktionsendonucleasen BglI und SalGI

Abbildung 24: Spaltung der Acm-DNA mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI, EcoRV und ClaI

Abbildung 25: Spaltung von Acm1-DNA mit den Restriktionsendonucleasen SalGI, PstI und PvuII

Abbildung 26: Lineares Acm1-Genom und zirkuläre pBR322-DNA als Referenz nach Spreitung

Abbildung 27: Homoduplices von Acm1-DNA mit einsträngigen Enden

Abbildung 28: Hybridisierungsmuster gespaltener DNA der 5 Acm-Phagen mit ³²P-markierter Acm1-DNA und Acm6-DNA

Abbildung 29: Mit Mitomycin C induzierte Phagenpartikel aus *A. methanolicus*-Stämmen

Abbildung 30a: Chromosomale DNA der *A. methanolicus*-Stämme MB58, MB58/4, MB58/10, MB70, MB129, MB55, MB56, MB60 und MB135; mit HindIII gespalten

Abbildung 30b: Homologien zwischen Acm1-DNA und chromosomaler DNA der *A. methanolicus*-Stämme aus Abb. 30a nach Hybridisierung mit DIG-markierter Acm1-DNA

Abbildung 31: Überlebenskurven der Stämme *A. methanolicus* MB58/4 und MB58/4-101 nach UV-Exposition

Abbildung 32: Inaktivierung der Phagen Acm1, Acm2, Acm5 und Acm6 durch UV-Licht

Abbildung 33: Einfluß des Wachstumszustandes des Rezipienten *A. methanolicus* MB58/4-101 auf die Transduktionseffektivität mit dem Phagen Acm1

Abbildung 34: Vergleichende Restriktionsanalysen der DNA aus Acm- und TAcM-Phagen

Abbildung 35: Vergleich der Muster der Hüllproteine von Acm- und TAcM-Phagen

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Wirtsbereiche der Acm-Phagen auf Stämmen von *A. methanolicus*
- Tabelle 2: Latenzzeit und Wurfgröße der Acm-Phagen in Abhängigkeit von der Infektionsmultiplizität
- Tabelle 3: Maße der Phagen Acm1, Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7
- Tabelle 4: Serologische Reaktionen der Acm-Phagen mit 3 Antisera
- Tabelle 5: Gruppierung der Acm-Phagen nach der Höhe der K-Werte
- Tabelle 6: Überlebensraten der Acm-Phagen nach Temperatureinwirkungen von 1 h
- Tabelle 7: Einfluß von Chloroform auf den Phagen Acm1
- Tabelle 8: Stabilität der Phagen Acm2-Acm7 gegen Chloroform
- Tabelle 9: Charakteristika der Acm-Phagen
- Tabelle 10: Molekulargewichte der Hüllproteine der Acm-Phagen
- Tabelle 11: Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Zusammensetzung der Hüllproteine der Phagen Acm1-Acm7
- Tabelle 12: Größe der Einzelfragmente der Acm-DNA aus Abb. 22
- Tabelle 13: Größe der Einzelfragmente nach Bgl I-Spaltung und SalGI-Spaltung
- Tabelle 14: Vergleich der Größe der Einzelfragmente der Phagen-DNA nach EcoRI-, EcoRV- und ClaI-Spaltung
- Tabelle 15: Gesamtgröße der Acm-Genome als Summe der Größe der Restriktionsfragmente
- Tabelle 16: Größe der Fragmente nach Einzel- und Mehrfachspaltungen von DNA des Phagen Acm1
- Tabelle 17: Größe der Acm1-Genome, ermittelt durch Längenmessung der DNA
- Tabelle 18: Zuordnung der induzierten Morphotypen zu den *A. methanolicus* Stämmen
- Tabelle 19: Übersicht über Plattierungseffektivität EOP und spontane Reversionshäufigkeit zur Prototrophie R ausgewählter Mutanten von *A. methanolicus* MB 58/4
- Tabelle 20: Einfluß der UV-Bestrahlung der Acm1-Phagen auf die Höhe der Transduktion des His-Markers
- Tabelle 21: Vergleich von parallelen Transduktionsexperimenten unter optimierten Bedingungen und einer MOI=1
- Tabelle 22: Transduktionseffektivität (EOT) weiterer auxotropher Marker

Tabelle 23: Transfektion von *A. methanolicus*-Stämmen mit DNA der AcM-Phagen

Tabelle 24: Wirtsbereiche von transfektierten (TAcM) und Wildtypphagen auf *A. methanolicus* Stämmen

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| Acm | <i>Acetobacter methanolicus</i> -Phagen |
| cfu | colony forming units |
| (d)ATP | Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| (d)CTP | Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| (d)GTP | Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| (d)TTP | Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EOP | Plattierungseffektivität des Phagen |
| EOT | Transduktionseffektivität |
| EtBr | Ethidumbromid |
| HEPES | N-2(Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Na-Salz |
| kb | Kilobasen |
| kD | Kilodalton |
| MC | Mitomycin C |
| MM | Minimalmedium |
| MNNG | N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin |
| MOI | multiplicity of infection |
| NC | Nitrozellulose |
| OD | optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pfu | plaque forming units |
| PHB/PHA | Polyhydroxybuttersäure/Polyhydroxyalkansäure |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RF-Werte | Quotienten aus gesamter Laufstrecke und Laufstrecke der Einzelbande |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Umdrehung pro Minute |

| | |
|------------------|--|
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SM | Natriumchlorid-Magnesiumsulfat-Tris-Puffer |
| SSC | Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung |
| STM | Standardmedium |
| TAc _m | nach Transfektion entstandene <i>A. methanolicus</i> -Phagen |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| Td | Transduktion |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| Tf | Transfektion |
| TM | Tris-Magnesiumsulfat-Puffer |
| TNE | Tris-Natriumchlorid-EDTA-Puffer |
| U | Unit (Einheit) |
| ÜN-Kultur | 15 h-Kulturen |
| UV | Ultraviolett-Licht |
| v/v | volume/volume |
| VM | Vollnährmedium |
| w/v | weight/volume |
| WA | Weichagar |

1. Einleitung

Mikroorganismen sind allgegenwärtig, sie haben sich die verschiedensten Lebensräume und Nahrungsquellen erschlossen und verfügen über ein breites Spektrum an Stoffwechselleistungen. Sie werden seit alters her von den Menschen zur Herstellung, Verarbeitung und Konservierung von Nahrungs- und Genußmitteln genutzt. In den letzten Jahrzehnten wurden diese traditionellen Techniken zu großtechnischen Verfahren entwickelt (Ruttloff, 1990). Es wurden aber auch neue Einsatzgebiete für Mikroorganismen erschlossen, wie die Gewinnung von Einzellerprotein (SCP) (Übersichten bei Harrison and Hamer, 1971; Babel et al., 1993; Boze et al., 1993; Puniya et al., 1995) oder die Nutzung nachwachsender Rohstoffe wie Cellulosen, Lignocellulose und Hemicellulosen zur großtechnischen Wertstoff- und Energiegewinnung (Übersichten bei Eggersdorfer et al., 1992; Eierdanz, 1996). Sie finden Anwendung als Produzenten pharmazeutisch wichtiger Sekundärmetabolite wie Antibiotika und Steroide (Maplestone et al., 1992; Krämer and Heine, 1994; Dordick et al., 1998) und zur Herstellung neuartiger Wirk- und Wertstoffe wie Polymere (Wilke, 1999) und abbaubare Kunststoffe (Hänggi, 1995; Poirier et al., 1995).

Mikroorganismen werden auch in Sanierungsverfahren eingesetzt zur Eliminierung verschiedenster Schadstoffe (Young and Häggblom, 1991; Spain, 1995; Lovley and Coates, 1997; Harayama, 1997).

Neben den für alle technischen Verfahren geltenden ökonomischen und ökologischen Kriterien müssen biotechnische Verfahren, die auf Wachstum und Vermehrung mikrobieller Produktionsstämme beruhen, zusätzliche, durch die Spezifik biologischer Systeme bedingte Anforderungen erfüllen. Dazu gehören die Fähigkeit der Produktionskultur zur zuverlässigen und reproduzierbaren Vermehrung unter technischen Bedingungen und die genetische Stabilität in Bezug auf die zu erbringende Leistung. Dazu ist das biologische System physiologisch und genetisch zu charakterisieren, phänotypisch und gegebenenfalls genotypisch zu optimieren und das technische System auf Faktoren, die Veränderungen der Leistung und Beeinflussung von Wachstum und Vermehrung bedingen können, zu untersuchen.

Für bakterielle biotechnische Prozesse ist die Interaktion zwischen Produktionsstamm und Bakteriophagen und dadurch verursachte Schäden ein zentrales Problem. Häufig finden sich kurze Zeit nach Einführung eines biotechnologischen Prozesses erste Publikationen zum Nachweis von Bakteriophagen für den Produktionsstamm (Übersichten bei Hongo et al., 1972; Rudolph, 1978; Wünsche, 1989; Klaus et al., 1992; Sandmeier and Meyer, 1993). Schäden,

verursacht durch Bakteriophagen in Fermentationsprozessen, waren auch der Anlaß zu der vorliegenden Arbeit.

Bakteriophagen können als virulente und temperente Bakterienviren bei allen Gattungen und Arten von Eubakterien und Archaeobakterien vorkommen. Bis 1995 sind ca. 4.500 Phagen verschiedener Morphotypen beschrieben worden, wobei die geschwänzten Phagen mit 4.400 beschriebenen Stämmen (= 96% aller Bakterienviren) die größte Phagengruppe darstellen (Ackermann, 1996). Jährlich kommen etwa 100 bis 150 Neubeschreibungen hinzu (Ackermann, 1987; 1992; 1996).

Bakteriophagen kommen durch Rezeptoren in der Zellwand mit ihren Wirten in Kontakt und zerstören sie durch explosionsartige Vermehrung (Virulenz). Im technischen System kann daher eine Infektion mit virulenten Phagen eine vollständige Vernichtung der Produktionskultur verursachen und damit zum Erliegen des laufenden Produktionsprozesses führen. Diese Form der Phagenkontamination und -entwicklung läßt sich mit mikrobiologischen Techniken feststellen (Adams, 1959; Ackermann and DuBow, 1987a, b). Phagen haben aber auch komplexe Strategien zur Koexistenz mit ihren Wirtszellen entwickelt (Lysogenie/Pseudolysogenie) (Barksdale and Arden, 1974; Davidson et al., 1990; Ripp and Miller, 1998), die Phagenentwicklung wird hier durch Repressormoleküle unterdrückt und das Phagen genom über viele Bakteriengenerationen latent weitergegeben. Das Vorhandensein von Prophagen in einer Bakterienkultur bleibt häufig lange Zeit unentdeckt. Allerdings können auch diese Phagen durch Störungen der Repressionsmechanismen in einen lytischen Zustand übergehen, was wiederum zu erheblicher Beeinträchtigung führen kann.

Für nahezu alle Zweige der Fermentationsindustrie liegen Berichte über phagenbedingte Störungen bakterieller Prozesse vor. Sowohl virulente als auch temperente Phagen stellen für verschiedene Zweige der Milch- und Käseindustrie (Jarvis, 1989; Davidson et al., 1990; Gasson, 1996), für Prozesse zur Herstellung von Aminosäuren (Hongo et al., 1972), von organischen Säuren (Stamm et al., 1989) sowie von Antibiotika (Caravajal, 1953; Klepikova et al., 1978), aber auch für Prozesse zur Gewinnung von Einzellerprotein aus Bakterien (Wünsche and Kiesel, 1982; Wünsche, 1989; Klaus et al., 1992) ein hohes Gefährdungspotential dar. Die Entwicklung möglicher Schutzmechanismen hat deshalb einen hohen Stellenwert.

Um phagenbedingten Störungen entgegenzuwirken, wurden die verschiedensten Maßnahmen entwickelt; sie lassen sich, wie von Wünsche (1989) dargestellt, in 2 Komplexen zusammenfassen:

- (I) Maßnahmen zum Schutz vor virulenten Bakteriophagen:
 - phagensterile Prozeßführung
 - Einsatz von Alternativkulturen
 - Einsatz phagenresistenter Mutanten
 - Einsatz von Phageninhibitoren
 - Nutzung immobilisierter Zellen
- (II) Maßnahmen zur Verhinderung der Induktion von Bakteriophagen:
 - Eliminierung von Induktionsfaktoren in Fermentationsprozessen
 - Einsatz schwerinduzierbarer Stämme

Ein interessanter Sonderfall der Entwicklung phagenresistenter Produktionsstämme ist die Nutzung von natürlichen plasmidcodierten Phagenresistenzmechanismen wie Adsorptionsinhibierung, Restriktion und Modifikation sowie abortive Infektion, wie von Hill (1993); Dinsmore and Klaenhammer (1995); Daly et al. (1996) für Milchsäurebakterien ausführlich beschrieben. Das führte in Einzelfällen zur Konstruktion industriell genutzter phagenresistenter Stämme (Dinsmore and Klaenhammer, 1995; O'Sullivan et al., 1998).

Bakteriophagen sind jedoch eine heterogen zusammengesetzte Gruppe von Bakterienviren mit verschiedenen Morphologien, Replikationsstrategien und Wirtsbereichen (Ackermann and DuBow, 1987a, b) und sie sind wie alle biologischen Systeme genetischen Veränderungen durch Mutation und Rekombination unterworfen (Holland and Domingo, 1998). Die Kombination aller vorgestellten Maßnahmen erlaubt deshalb zwar eine Verringerung des Risikos phagenbedingter Störungen in einzelnen Verfahren, eine generelle Lösung ist aufgrund der Verschiedenartigkeit der Phagen-Wirts-Wechselbeziehungen sowie der genetischen Variabilität jedoch nicht zu erwarten. Daher sind bei jedem für eine biotechnische Nutzung vorgesehenen Bakterienstamm spezielle Untersuchungen zur Phagenökologie, zu möglichen Phagen-Wirts-Interaktionen sowie zu deren Beeinflussung erforderlich, um Ansätze zur Minimierung von phagenbedingten Produktionsschäden aufzuzeigen. Notwendig sind dazu die Isolierung und allseitige Charakterisierung der taxonspezifischen Phagen sowie die Analyse der Wechselwirkungen mit den entsprechenden Wirten. Diese Untersuchungen schließen vergleichende strukturelle, molekularbiologische und genetische Analysen der Phagen untereinander sowie zwischen Phagen- und Wirts-DNA ein (Richtlinien dazu bei Ackermann et al., 1992).

Bakteriophagen haben jedoch nicht nur Bedeutung als Risikofaktoren in Fermentationsprozessen, sie werden vorteilhaft für die Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen eingesetzt. Bakteriophagen werden gelegentlich als Mittel zur Behandlung von antibiotikaresistenten pathogenen Bakterien genutzt (Übersicht bei Alisky et al., 1998). Phagen werden zur Differenzierung (Lysotypie) epidemiologisch wichtiger Bakterien wie Salmonellen (Sharma et al., 1994) oder Listerien (Ortel, 1989), aber auch zur Unterscheidung von Actinomyceten (Korn-Wendisch and Schneider, 1992) sowie Stämmen von *Bacillus subtilis* und *B. thuringiensis* (Ackermann et al., 1995) eingesetzt. Genprodukte von Phagengen (T4-DNA Ligase, T4-DNA- und T3-RNA-Polymerasen), unverzichtbare Werkzeuge der Gentechnik, werden nach Klonierung und Expression in bakteriellen Wirten in größerem Maßstab gewonnen (Murray et al., 1979; Lin et al., 1987; Morris et al., 1986).

Vor allem aber hat die Untersuchung von Bakteriophagen einen enormen Beitrag zur Entwicklung von Molekularbiologie und Virologie geleistet (Cairns et al., 1972; Kellenberger, 1995; Maillard, 1996). Neben dem prinzipiellen Verständnis von Struktur und Funktion der Nukleinsäuren, der Multiplikation von Bakteriophagenpartikeln und der Interaktionen mit ihren Wirtsorganismen waren die Parallelen zu eukaryotischen Viren z.B. hilfreich bei der Aufklärung der Onkogenprodukte von Tumoviren. Phagengenome werden auch erfolgreich zur Konstruktion von Vektoren (z.B. λ -Vektoren, ϕ C31-Vektoren, M13-Vektoren; (Übersicht bei Klaus et al., 1992) genutzt.

Phagen eignen sich auch als Carrier genetischer Information zwischen verschiedenen bakteriellen Wirten. Für viele Phagen-Wirtssysteme wurde über die Fähigkeit zur Übertragung von Genen (Transduktion) berichtet, auch Transfektion, ein Spezialfall der Transformation, wurde vielfach nachgewiesen (Übersichten bei Süss, 1981; Kokjohn, 1989). Während sich gegenwärtig zu Gentransferprozessen durch Wildtyp-Phagen nur noch gelegentlich Originalarbeiten finden (eine wesentliche Ursache ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der generell enge Wirtsbereich der meisten Phagen), ist die Transfektion für das Anlegen von Genbanken mittels modifizierter λ -Phagen eine etablierte Technik.

Im Institut für Biotechnologie in Leipzig wurden über mehrere Jahre Verfahren zur mikrobiellen Konvertierung von Methanol in Wertstoffe (von SCP bis zu definierten organischen Substanzen) entwickelt. Methanol ist ein Rohstoff, der viele für technische Verfahren wünschenswerte Eigenschaften besitzt. Methanol besitzt gute Transport- und Lagerfähigkeit, ist mit Wasser unbegrenzt mischbar und kann zudem in hoher Reinheit

hergestellt werden (Faust and Präve, 1983; Babel, 1987). Daher eignet sich Methanol in besonderem Maße als Substrat für großtechnische Verfahren.

Eine Vielzahl von Bakterien und Hefen haben fakultativ oder obligat die Fähigkeit zum Wachstum auf reduzierten C_1 -Substraten (Colby et al., 1979; Hanson and Wattenberg, 1991). Natürliche Habitate dieser methylotrophen Mikroorganismen sind Orte mit Methan- bzw. Methanolanreicherungen (Moore, Ölförderstätten, tierischer Dung) oder junge Blätter und Blütenblätter mit Auflagerungen von organischen Substanzen mit Methylgruppen in Ester- oder Etherbindung (Heyer et al., 1984; Corpe and Rheem, 1989).

Die Definition für Methylotrophie geht auf Colby und Zatman (1972) zurück und beschreibt diese Mikroorganismen mit der Fähigkeit, nicht-autotroph auf solchen Kohlenstoffverbindungen zu wachsen, die ein oder mehrere Kohlenstoffatome haben, aber keine C-C Bindung tragen.

Drei generelle Stoffwechselwege wurden beschrieben (Anthony, 1982): der Serinweg, der Ribulosemonophosphat-Weg, auch als Hexulosephosphat-Weg bezeichnet, und der Ribulosebiphosphat-Weg. In den ersten beiden wird Kohlenstoff auf dem Niveau Formaldehyd assimiliert, bei letzterem auf dem Niveau CO_2 via Ribulosebiphosphat-Carboxylase (RubisCo). Aufgrund ihrer Substratspezialisierung unterscheidet man bei Bakterien zwei Hauptgruppen (Übersichten bei Anthony, 1982; Goldberg, 1985; Green, 1992):

- obligat methylotrophe Bakterien
können ausschließlich reduzierte C_1 -Körper als Substrat verwerten; obligat methanotrophe Bakterien assimilieren Methan über den Serin- oder Ribulosemonophosphatweg, obligat methanolverwertende Bakterien Methanol ausschließlich über den Ribulosemonophosphat-Weg.
- fakultativ methylotrophe Bakterien
können neben reduzierten C_1 -Verbindungen auch *multicarbon substrates* (mit C-C-Bindung) als Substrat verwerten. Sie assimilieren Methanol (fakultativ methanotrophe Bakterien sind unbekannt) über alle 3 Stoffwechselwege.

Die Gruppe der fakultativ methylotrophen Bakterien ist taxonomisch sehr heterogen (Hanson et al., 1993; Green, 1993), sie finden sich in unterschiedlichsten Gattungen mit einem breiten Spektrum an Organismen verschiedener Verwandtschaftsgrade. Es sind sowohl gram-negative als auch gram-positive methylotrophe Bakterien beschrieben worden (Übersicht bei Dijkhuizen, 1993). Zunehmend sind fakultativ methylotrophe Bakterien aus extremen Standorten mit hohen

Temperaturen (*Bacillus*-Stämme; [Dijkhuizen et al., 1988]) oder extremem pH-Wert isoliert worden (*Acetobacter methanolicus*/*Acidomonas methanolica* [Uhlig et al., 1986; Urakami et al., 1989]; *Paracoccus alcaliphilus* [Urakami et al., 1990]). Sie werden von Green (1993) daher den „extremophilen“ Bakterien zugeordnet. Mit der Einführung der Sequenzvergleiche auf Ebene der rRNA wurden Verwandtschaftsbeziehungen methylotropher Bakterien zum Teil neu geordnet (Boulygina et al., 1990, 1992, 1993; Hanson et al., 1993).

Große Erwartungen hatte man an die Möglichkeiten zur biotechnologischen Nutzung methylotropher Bakterien (Lidstrom and Stirling, 1990; Leak, 1992; Dijkhuizen, 1993). Man favorisierte zunächst, das aus fossilen Rohstoffen gewinnbare Methanol durch die Synthese von Einzellerprotein zu „veredeln“ (Harrison and Hamer, 1971; Faust and Präve, 1983; Ekeroth and Villadsen, 1991). Diese Entwicklungen waren zwar technologisch erfolgreich, mehrere Verfahren zur Einzellerproteinsynthese (SCP) auf der Basis von Methanol wurden in England, Deutschland, Japan und Schweden entwickelt (Übersichten bei Goldberg, 1985; Dikanskaya, 1987; Lidstrom and Stirling, 1990; Babel et al., 1993). Sie hatten aber aufgrund ungünstiger Ökonomie und mangelnder Akzeptanz der Produkte in den westeuropäischen Staaten keinen kommerziellen Erfolg.

Aus Energiebilanzen des Stoffwechsels ergab sich, daß die verschiedenen Gruppen der methylotrophen Bakterien nicht gleich gut für SCP-Produktion und Produktsynthesen geeignet sind (Goldberg, 1985; Babel, 1987; Erickson and Tuitemwong, 1991). „Hexulosephosphatweg“-Bakterien sind durch höhere Wachstumsausbeute prädestiniert für die SCP-Synthese und die Überproduktion von z.B. L-Glutaminsäure und Exopolysacchariden; „Serinweg“-Bakterien eignen sich für Synthesen von L-Serin und Poly- β -hydroxybuttersäure (Babel, 1987). In vielen Laboratorien wurde die Möglichkeit der kommerziellen Anwendung methylotropher Bakterien zur Produktion von Aminosäuren, Vitaminen, Coenzymen und Polysacchariden untersucht (Übersicht bei Morinaga and Hirose, 1984; Lidstrom and Stirling, 1990; Tani, 1991) und Enzyme methylotropher Bakterien auf ihre industrielle Anwendbarkeit getestet (Duine and Dijken, 1991). In jüngerer Zeit wurde außerdem die Nutzung methylotropher Bakterien zur Synthese abbaubarer Polymere wie PHB/PHA (Babel, 1992; Madison and Huisman, 1999) geprüft. Im umweltbiotechnischen Bereich sind methanotrophe Bakterien zur Degradation von halogenierten Kohlenwasserstoffen im Gespräch (Hanson et al., 1990; Alvarez-Cohen, 1993; Jahng et al., 1996).

Mit der intensiven Bearbeitung der methylotrophen Bakterien wurden Versuche unternommen, diese Mikroorganismen als Expressionswirte für Fremdgene zu etablieren (Übersicht bei

Lidstrom and Stirling, 1990). Dazu war zunächst eine Anpassung der klassischen Methoden der Gentechnik an die Besonderheiten der Methyloproten erforderlich (Übersichten bei Tsygankov et al., 1987; de Vries et al., 1990). Methoden zur Manipulation der Genome Methyloproten sowie die Konstruktion und Anwendung geeigneter Wirts-Vektor-Systeme zur Klonierung und Expression von Fremdgenen waren zu erarbeiten und sind bei Holloway (1984), Lidstrom-O'Connor (1984); Lidstrom and Stirling (1990) und de Vries et al. (1990) ausführlich dargestellt. Kenntnisse über die genetische Kontrolle des C₁-Metabolismus wurden maßgeblich in den Gruppen um Holloway (Holloway et al., 1987), Hanson (Barta and Hanson, 1993) und Lidstrom (Lidstrom, 1990; Lidstrom et al., 1994) erarbeitet.

Eine wichtige Etappe in der genetischen Analyse von methyloproten Bakterien stellte die Erarbeitung von Methoden zum Gentransfer dar. Die Transformation konnte über die klassische Form der Kompetenzerzeugung und Etablierung homologer chromosomaler DNA schon bald nachgewiesen werden (Williams and Baingridge, 1971; O'Connor et al., 1977). Von Ueda et al. (1991) wurde erstmals der Transfer eines Vektors mit breitem Wirtsspektrum durch Elektroporation in *Methylobacterium extorquens* nachgewiesen. Inzwischen sind Elektroporationsmethoden für verschiedene methyloprote Bakterien dokumentiert (Yang et al., 1996; Gliesche, 1997; Kim and Wood, 1998).

Auch Plasmide wurden in methyloproten Bakterien häufig nachgewiesen (Warner et al., 1977; Montiero et al., 1982; Lidstrom and Wopat, 1984; Kim and Lidstrom, 1989; Brenner et al., 1990, 1991; Vrijbloed et al., 1994). Sie sind meist kryptisch und zwischen 8 und 186 kb groß. Bis auf Plasmide aus *Methylomonas methylovora* (Lidstrom and Wopat, 1984) konnten keine konjugativen Plasmide nachgewiesen werden. Deshalb mußte auf die Nutzung von IncP1 Plasmiden wie RP4 und R68.45 (Moore et al., 1983; Tatra and Goodwin, 1983; McPheat et al., 1987) zurückgegriffen werden, aus denen erste Klonierungsvektoren konstruiert (Allen and Hanson, 1985; Engel et al., 1986; Gälli and Leislinger, 1988; Föllner et al., 1994) und in *Methylophilus methylotrophus* (de Maeyer et al., 1982; Hennam et al., 1982); *Methylobacillus flagellatum* (Chistoserdov et al., 1987) und *Acetobacter methanolicus* (Schröder et al., 1991; Föllner et al., 1994; Miksch et al., 1997) eingesetzt wurden.

Während für eine Vielzahl nicht-methyloproten Bakterien Transduktions- und Transfektionsprozesse seit vielen Jahren bekannt sind (Übersichten bei Kokjohn, 1989), ist diese Möglichkeit des Gentransfers und der Kartierung für methyloprote Bakterien mittels Bakteriophagen in anderen Arbeitsgruppen bisher nicht dokumentiert. Ein Hauptgrund dafür ist sicherlich, daß trotz des langen Untersuchungszeitraumes an methyloproten Bakterien nur eine

geringe Zahl Bakteriophagen für diese Bakteriengruppe isoliert werden konnte (Übersichten bei Kiesel et al., 1989a; Almumin et al., 1990; Sandmeier and Meyer, 1993). Diese Phagen stammen überwiegend aus Proben unregelmäßig verlaufender Fermentationsprozesse. Weitergehende systematische Untersuchungen fehlen, da biotechnologische Verfahren mit methylophilen Bakterien nicht realisiert wurden. Somit bleibt bisher die Frage nach der Häufigkeit und Bedeutung von Phageninfektionen bei der Kultivierung von methylophilen Bakterien unbeantwortet. Die geringe Zahl untersuchter Phagen für methylophile Bakterien schränkt natürlicherweise die Möglichkeit genetischer Analysen dieser Bakteriengruppen mittels Phagen sehr ein. Schon Lidstrom-O'Connor (1984), Holloway (1984) und Lidstrom and Stirling (1990) beklagten das Fehlen transduzierender Phagen für methylophile Bakterien, ein Mangel, der bis heute nicht behoben wurde. Auch Transfektion wurde für methylophile Bakterien noch nicht beschrieben.

1984 wurde im Institut für Biotechnologie aus Hefefermentationsprozessen mit Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle ein methylophiles Bakterium isoliert und als neue Art *Acetobacter methanolicus* gültig beschrieben (Uhlig et al., 1986). Zu seiner taxonomischen Einordnung als *Acetobacter* hat es in den letzten Jahren verschiedene Auffassungen gegeben. Urakami et al. (1989) beschrieben eine neue Gattung *Acidomonas* und klassifizierten *A. methanolicus* MB58/4 aufgrund seiner fakultativ methylophilen Lebensweise als Typusstamm der neuen Art *Acidomonas methanolica*. Sievers et al. (1994 a,b) stellten dieses Bakterium auf Grund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA der Typusstämme aller *Acetobacter*-Arten sowie einzelner Arten von *Gluconobacter*, *Rhodophila* und *Acidiphilum* wieder zur Gattung *Acetobacter*, Sequenzvergleiche auf der Ebene der 5S rRNA (Boulygina et al., 1990; 1992; 1993) bestätigten diese Reklassifikation. Yamada et al., (1997) schlugen nach weiteren 16S rRNA-Teilsequenzierungen die Unterteilung der Essigsäurebakterien in 4 Gattungen unter Beibehaltung der Gattung *Acidomonas* vor.

Für die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der noch immer in Diskussion befindlichen taxonomischen Stellung von *Acetobacter methanolicus* die durch Uhlig et al. (1986) vorgenommene Benennung verwendet.

Der Typusstamm *Acetobacter methanolicus* MB58/4 sowie weitere Stämme dieser Art wurden in den Gruppen um Babel (Babel and Hoffmann, 1977; Loffhagen and Babel, 1982, 1984, 1988; Gründig and Doronina, 1984; Gründig and Babel, 1987; 1989), Anthony (Elliott and

Anthony, 1988; Chan and Anthony, 1991a; b) und Matsushita (Matsushita et al., 1992; 1993; Frebortova et al., 1997a, b; 1998) umfassend physiologisch charakterisiert.

Acetobacter methanolicus weist, wie Gattungs- und Artname ausdrücken, zwei Besonderheiten auf, die sich technologisch nutzen lassen. Diese Art ist nicht nur ein fakultativ methylothropes, sondern auch ein Essigsäurebakterium mit einem pH-Optimum für das Wachstum bei pH 4. Dieser pH-Wert unterdrückt die Entwicklung potentiell pathogener, weil neutrophiler bakterieller Kontaminanten in ungeschützten oder teilgeschützten Kultivierungsprozessen. *A. methanolicus* wächst auf verschiedenen Zuckern und Alkoholen und verwertet speziell Methanol, Glucose und Glycerol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle mit hohen Wachstumsausbeuten (Babel, 1984; Müller and Babel, 1993). Somit ist *A. methanolicus* sowohl zur Synthese von SCP als auch zur Gewinnung von Produkten der unvollständigen Oxidation geeignet (Babel, 1984; Sattler et al., 1990).

Ein Verfahren zur Produktion von Einzellerprotein mit *A. methanolicus* auf der Basis von Methanol wurde entwickelt (Pöhländ et al., 1991; Babel et al., 1993), steigende Weltmarktpreise für Methanol in den 80er Jahren sowie ein drastischer Preisverfall für das biologisch hochwertige Sojaeiweiß haben die Realisierung dieses, wie auch analoger Verfahren jedoch gestoppt.

Der Einsatz von organischen Säuren in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie und ein damit verbundener ständig steigender Bedarf an diesen Substanzen weltweit (Übersicht bei Wilke, 1999) könnte auch die Art *A. methanolicus* für biotechnologische Anwendungen wieder attraktiv machen. Gluconsäure ist ein begehrter Rohstoff für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, findet Anwendung in der Papierindustrie und Medizin. 1997 bestand weltweit ein Bedarf von 40.000 t/Jahr (Wilke, 1999).

Acetobacter methanolicus wächst, wie schon ausgeführt, sowohl auf Methanol als auch auf Glucose. Hohe Glucosekonzentrationen führen jedoch zu deren unvollständiger Oxidation und damit zur ausschließlichen Produktion von Gluconsäure als „dead end“ Produkt (Babel, 1984). Die für *Acetobacter methanolicus* beschriebene Acidotoleranz ermöglicht hohe Endproduktkonzentrationen an freier Gluconsäure (Babel, 1984; Sattler et al., 1990). Die Kombination von Vorkultivierung auf Methanol mit anschließender Glucosegabe in hohen Konzentrationen bietet zudem die Möglichkeit, Methanol als billigen Rohstoff in einer ersten Prozeßphase zur Produktion der Zellsubstanz zu nutzen, und die preisintensivere Glucose in der Produktbildungsphase vollständig in Gluconsäure zu wandeln (Sattler et al., 1990). Eine Patentschrift zu Grundlagen der Gluconsäureproduktion mit *A. methanolicus* liegt seit langem

vor (Babel et al., 1987). Babel and Müller entwickelten 1987 die Ansätze zu kontinuierlicher Prozeßführung auf Basis des Auxiliarkonzeptes, Pöhland et al. (1993) konnten die Ausbeute an Gluconsäure mit *A. methanolicus* durch Umgehen von Limitationen und Inhibitorwirkungen weiter erhöhen. Das UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle und die Firma Vogelbusch, Wien bieten das Verfahren seit 1998 zur technischen Applikation an.

Dieses großtechnische Verfahren ist wie alle bakteriellen Massenkultivierungen prinzipiell durch die Entwicklung von Bakteriophagen gefährdet. Allerdings sind sowohl für methylotrophe Bakterien (Übersichten bei Kiesel et al., 1989a; Almumin et al., 1990; Sandmeier and Meyer, 1993) als auch für Essigsäurebakterien (Stamm et al., 1989; Sellmer et al., 1992) bisher nur wenige Phagen bekannt. Das Infektions-/Induktionsrisiko für biotechnische Verfahren mit der Art *A. methanolicus* ist somit schwer abzuschätzen. Für die vorliegende Arbeit war diese Tatsache sowohl Ausgangspunkt als auch Motivation; Untersuchungen an *Acetobacter methanolicus* und seinen Phagen wurden auf drei Fragestellungen konzentriert:

- Wie stark ist *Acetobacter methanolicus* durch Bakteriophagen gefährdet?
- Besteht diese Gefährdung vorwiegend in der Infektion mit virulenten Phagen oder spielen Induktionsprozesse ebenfalls eine Rolle?
- Welche Möglichkeiten bieten phagenvermittelte Gentransferprozesse zur gezielten Veränderung des Wildtypes *A. methanolicus*?

2. Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

2.1.1 Übersicht über verwendete Bakterien

Die Art *Acetobacter methanolicus* ist laut Uhlig et al. (1986) gekennzeichnet durch:

- negatives Gramverhalten,
- gutes Wachstum auf Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle,
- Inkorporation von Methanol über den Hexulosephosphat-Weg,
- Wachstum auf weiteren Substraten wie Glucose, Gluconat, 2,3-Butandiol, Capronsäure und Lactat,
- ein pH-Optimum des Wachstums bei pH 4 bis pH 4,5,
- eine Pantothersäureauxotrophie, die mit Pantothersäure bzw. Hefeextrakt zu überbrücken ist,
- obligat aerobes Wachstum,
- Temperaturoptimum von 30-32°C,
- junge Zellen beweglich, mit peritrichem Geißeltyp.

A. methanolicus bildet bei Wachstum auf Festmedium konvexe rosafarbene Kolonien. Die Zellen sind ellipsoid bis stäbchenförmig und liegen häufig in Diploform vor.

Von dieser Art sind neben dem Typusstamm *A. methanolicus* IMET 10945 (Uhlig et al., 1986) weitere Stämme isoliert und in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen worden (Übersicht Seite 12). Mutanten des Stammes *A. methanolicus* MB58/4 wurden durch Mutagenese mit N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (MNNG) in Kombination mit UV-Strahlung gewonnen (Sydow, 1985) und sind Bestandteil einer eigenen Sammlung.

Übersicht über Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Bakterienstämme:

Stämme von *Acetobacter methanolicus*

| Stammbezeichnung | Stamm-Nr. | Herkunft |
|---------------------------------|--|---|
| <i>Acetobacter methanolicus</i> | | |
| MB55 | UFZ B55 | IMET 11195, Insel Hiddensee* |
| MB56 | UFZ B56 | Isolat Insel Hiddensee* |
| MB57 | UFZ B57 | Isolat Insel Hiddensee* |
| MB58 | UFZ B58/ IMET B346 | Isolat aus Fermentation mit methylotropher Hefe (a) |
| Typusstamm MB58/4 | UFZ B58/4 ^T / IMET 10945 ^T | Isolat aus Fermentation mit MB58 (b) |
| MB59 | UFZ B59 | Isolat Insel Hiddensee* |
| MB60 | UFZ B60 | Isolat Insel Rügen* |
| MB70 | UFZ B70 | Isolat aus Fermentation mit MB58 |
| MB129 | UFZ B129 | Isolat aus Fermentation mit MB70 |
| MB135 | UFZ B135/ IMET 11402 | Isolat aus Fermentation mit MB58 (c) |
| MB58/10 | UFZ B58/4-(Acml)10 | MB58/4, lysogenisiert mit Phagen Acml (d) |
| Mutanten des Stammes | | |
| MB58/4 | MB58/4-3 (Met ⁻) | Mutagenese mit MNNG+UV (e) |
| | MB58/4-77 (Arg ⁻) | Mutagenese mit MNNG+UV (e) |
| | MB58/4-100 (His ⁻) | Mutagenese mit MNNG+UV (e) |
| | MB58/4-101 (His ⁻) | Mutagenese mit MNNG+UV (e) |
| | MB58/4-116 (Leu ⁻) | Mutagenese mit MNNG+UV (e) |
| | MB58/4-134 (Tyr ⁻) | Mutagenese mit MNNG+UV (e) |

* isoliert von Heyer, Jena

a) Steudel et al., 1980 b) Uhlig et al., 1986; Grimmecke et al., 1991a, b

c) Grimmecke et al., 1994c d) Wünsche et al., 1983a, b

e) Sydow, 1985

Alle Stämme von *A. methanolicus* sind in der Sammlung des UFZ-Umweltforschungszentrums Leipzig unter der angegebenen Nummer hinterlegt.

Zur Untersuchung der Wirtsbereiche der Phagen wurden außerdem folgende Stämme verschiedener Arten der Gattungen *Acetobacter* und *Gluconobacter* herangezogen:

| Stammbezeichnung | Stamm-Nr. | Herkunft |
|---|------------------------|---------------------------------------|
| <i>Acetobacter aceti</i> | UFZ B 209 | CCM 2363 |
| <i>Acetobacter rancens</i> | UFZ B 207 | CCM 1771 |
| <i>Acetobacter pasteurianus</i> | UFZ B 208 | CCM 1774 ehemalige |
| <i>Acetobacter pasteurianus subsp. pasteurianus</i> | UFZ B 210 ^T | CCM 2374 Tschechoslowakische Sammlung |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> | UFZ B 203 | CCM 1783 für Mikroorganismen (CCM), |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> | UFZ B 204 | CCM 1787 Brno |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> | UFZ B 205 | CCM 1804 |
| <i>Gluconobacter oxydans</i> | UFZ B 206 | CCM 2371 |

2.1.2 Kultivierung der Bakterien

2.1.2.1 Nährmedien

Für die Kultivierung von *A. methanolicus* wurden auf Basis einer standardisierten Mineralsalzlösung (2.5.1.1) je nach Anwendungszweck folgende Medien hergestellt:

Flüssigmedien

| | |
|-----------------------|--|
| Standardmedium (STM): | Mineralsalzlösung mit: 0,5% Methanol 0,05% Hefeextrakt |
| Vollnährmedium (VM): | Mineralsalzlösung mit: 1% Glucose 0,5% Hefeextrakt |
| Minimalmedium (MM): | Mineralsalzlösung mit: 0,5% Methanol 4µg/ml Pantothensäure für die Anzucht aminosäureauxotropher Mutanten zusätzlich die defizitäre Aminosäure in 20 µg/ml |

Für Flüssigmedien wurde der pH-Wert während der Zubereitung auf pH 4,5 eingestellt.

Festmedien

Zur Herstellung fester Medien wurde 2% Difco-Agar zugesetzt und der Agar mit einem pH-Wert im Neutralbereich konfektioniert. Der pH-Wert wurde erst nach dem Aufschmelzen auf pH 4,5 korrigiert, C-Quelle, Hefeextrakt/Pantothensäure und Aminosäure zugegeben und sofort ausgegossen.

Zur Herstellung des Weichagars (WA) wurde die standardisierte Mineralsalzlösung ohne weitere Zusätze verwendet. Difco-Agar wurde in einer Konzentration von 0,7% zugesetzt. Der pH-Wert wurde im Neutralbereich belassen. Weichagar wurde als Portionen zu 3 ml konfektioniert.

Die Kultivierung von *Gluconobacter*- und *Acetobacter*-Stämmen erfolgte auf Acetobacter-Gluconobacter-Agar Nr. 4 (2.5.1.2).

2.1.2.2 Kultivierung in Flüssigmedium

Die Flüssigkulturen wurden bei 32°C unter Schütteln als 15 h-Kulturen (ÜN-Kulturen) gezogen. Als Kultivierungsgefäße wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die maximal zu 1/10 mit Medium gefüllt waren. Nach Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurde der pH-Wert der Flüssigkultur mit 10% KOH auf den Ausgangswert von pH 4,5 korrigiert.

2.1.2.3 Kultivierung auf Festmedium

Die beimpften Agarplatten wurden bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Für die Doppelschicht-Agar-Technik (Adams, 1959) wurden 100 µl ÜN-Kultur in 3 ml auf 42°C temperierten Weichagar gemischt und über den Grundagar gezogen.

2.1.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Der Verlauf des Wachstums in Flüssigkultur wurde über die Zunahme der optischen Dichte (OD) der Bakteriensuspension mit Hilfe eines Spektralphotometers (Spekol 10, Fa. Carl-Zeiss Jena) bei einer Wellenlänge von 720 nm gegen unbeimpftes Medium gemessen. Bei Extinktionswerten über 0,3 wurde entsprechend verdünnt.

Zur Ermittlung der korrelierenden Zellzahlen wurden Eichkurven durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten für die Lebendzellzahlen bzw. durch Zählen mit der Thoma-Zählkammer für Gesamtzellzahlen aufgenommen.

2.1.2.5 Stammhaltung

Die kurzzeitige Stammhaltung der *A. methanolicus* Stämme erfolgte auf Schrägagarröhrchen mit STM-Agar.

Zur Langzeitlagerung wurden Stichtkulturen in Eppendorftubes angelegt. Dazu wurde 1 Öse frisch angezogenes Zellmaterial in ein mit Aufbewahrungsgagar (2.5.1.3) gefülltes Eppendorftube geimpft, mit sterilem Paraffinöl überschichtet und bei 10°C bis zu 2 Jahren gelagert.

2.2 Bakteriophagen

2.2.1 Grundtechniken zum Arbeiten mit Phagen

2.2.1.1 Nachweis von Bakteriophagen

Direkter Nachweis von Bakteriophagen mittels Elektronenmikroskopie

Bakterienfreie Kulturüberstände wurden durch Filtration gewonnen und gegebenenfalls wie unter 2.2.1.5 beschrieben eingeeengt. Proben hochkonzentrierter gereinigter Phagenstämme wurden auf mit Formvar befilmte, kohlebedampfte Kupfer-Grids getropft. Die Negativkontrastierung erfolgte nach Bell and Roscoe (1982) durch Aufbringen einiger Tropfen 2 %iger Phosphor-Wolframsäure (pH 6,8) bzw. gesättigter (2 %) Uranylacetat-Lösung und kurzzeitiges (ca. 15 s) Einwirken. Danach wurde die verbliebene Kontrastierungslösung entfernt, das Grid luftgetrocknet und unter dem Elektronenmikroskop (Firma Hitachi, Japan bzw. Firma Tesla, ehem. ČSSR) ausgewertet. Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden z.T. am WNII Genetika unter Anleitung von Frau Dr. Khrenova durchgeführt, der Nachweis

induzierter Partikel erfolgte freundlicherweise durch Herrn Jorks, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig.

Indirekter Nachweis von Bakteriophagen in Fermentationsproben durch Doppelschichtagar-Plattentest (nach Adams, 1959)

Auf den Grundagar wurden 3 ml Weichagar aufgebracht, dem Phagen und Indikatorkultur beigemischt waren. Eine weitere Variante stellt das Auftropfen phagenhaltiger Suspensionen auf einen Bakterienrasen dar.

Fermentationsproben, die auf Bakteriophagenbefall untersucht werden sollten, wurden durch Zentrifugation in bakterienfreien Überstand und sedimentierte Zellen getrennt. Der Überstand wurde sterilfiltriert, die Zellen in Standardnährlösung resuspendiert, mit 5 % Chloroform versetzt, 20 min bei Raumtemperatur lysiert, Chloroform und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 6000 rpm abgetrennt und Chloroformreste durch Abdampfen unter einer Laminarbox entfernt. Überstände und Lysat wurden mit Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 5,4 (2.5.2.1) seriell verdünnt und mittels Doppelschicht-Agar-Technik auf Lyseflecke und Plaquebildung untersucht.

2.2.1.2 Isolierung von Phagenstämmen, Anreicherung und Anlegen von reinen Phagenlinien

Isolierung der Phagen

Phagenhaltige Kulturfiltrate wurden in Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,4 seriell verdünnt und mittels Doppelschichtagar-Technik so mit frisch angezogener ÜN-Kultur gemischt, daß gut isolierbare Einzelplaques entstanden. Zur Optimierung und Beurteilung der Plaquemorphologie wurden Volumen von 50µl bis 200µl einer frisch gezogenen Indikatorkultur (ca 5×10^9 cfu/ml) in den Weichagar eingemischt und nach Inkubation bei 32°C über mehrere Tage die Entwicklung der Einzelplaques verfolgt. Typische Einzelplaques wurden isoliert, in Standardnährlösung resuspendiert, verdünnt und wieder ausplattiert. Nach dreimaliger Wiederholung wurde eine dieser Phagenlinien als reines Phagenlysat bezeichnet, näher charakterisiert und in die Phagensammlung aufgenommen.

Vermehrung von Phagen über Agarkulturen

Zur Vermehrung der Bakteriophagen auf Festmedium wurden mit Phagen und Indikatorstamm beimpfte und über Nacht inkubierte Doppelschicht-Agarplatten mit 3 ml Standardmedium überschichtet und 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigphase abgesaugt, sterilfiltriert oder mit 5% Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert.

Vermehrung von Phagen in Flüssigkultur

Zur Vermehrung der Phagen in Standardmedium wurde eine phagensensible, junge ÜN-Kultur mit frischem Standardmedium auf ca. 10^8 cfu/ml verdünnt und Phagenlysate so zugesetzt, daß eine MOI zwischen 1 und 0,1 erreicht wurde. Dieses Gemisch wurde bis zu 15 h bei 32°C geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Klärungszentrifugation zum Entfernen von Zelltrümmern und restlichen Zellen. Für die Phagenstammhaltung erfolgte die Sterilisation des Phagenrohlysates wie bereits beschrieben durch Zusatz von Chloroform. Für ausgewählte Untersuchungen wurden Phagenlysate durch einen Ganzglasbakterienfilter mit einem G5-Sinterkörper bakterienfrei filtriert und im Kühlschrank gelagert.

Stammhaltung von Phagen

Konzentrierte und gereinigte Phagenlysate wurden in Ampullen abgefüllt und entweder bei +4°C oder -20°C bis zu 2 Jahren als Stammkonserven gelagert.

2.2.1.3 Ermittlung der Wirtsbereiche der Bakteriophagen

Zur Ermittlung des Wirtsspektrums wurden sowohl die in 2.1.1 aufgeführten *Acetobacter methanolicus*-Stämme als auch Stämme einiger *Acetobacter*- und *Gluconobacter*-Arten (2.1.1) einbezogen. ÜN-Kulturen aller zu überprüfenden Stämme wurden nach der Doppelschicht-Agarteknik plattiert und die zu prüfenden Phagenlysate in Serienverdünnungen aufgetropft. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Auswertung der Reaktionen.

2.2.1.4 Bestimmung der Parameter der lytischen Entwicklung

Die Wirtsstämme der Acm-Phagen wurden als ÜN-Kulturen in Standardmedium kultiviert, mit frischer Nährlösung verdünnt und mit dem entsprechenden Phagen mit verschiedenen Infektionsmultiplizitäten infiziert ($MOI \geq 0,1$). Danach wurden die Versuchsansätze, wie bei Adams (1959) beschrieben, mit Nährlösung im Verhältnis 1:10⁴ verdünnt, um eine weitere Adsorption freier Phagen zu unterbinden. Über einen Zeitraum von 6 h wurde die Entwicklung der Phagen durch Ermittlung des aktuellen Phagentiters im Doppelschichtagar-Test bestimmt und die Werte für Latenzzeit und Wurfgröße rechnerisch ermittelt (Adams, 1959). Aus dem eingesetzten Phagentiter und dem Anteil infizierter Zellen wurde außerdem der prozentuale Anteil an Einfach-/Mehrfachinfektionen ermittelt.

2.2.1.5 Gewinnung reiner Phagen-Suspensionen mit hohem Titer

Konzentrierung von Phagenrohlysaten (Yamamoto et al., 1970)

Für präparative Arbeiten und Langzeitstammhaltung benötigte hochtitrige Phagenlysate wurden durch Konzentrierung mittels Polyethylenglycol (PEG) 6000 gewonnen. Dazu wurde der pH-Wert der lysierten Bakterienkultur auf pH 4,5 korrigiert, der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und DNase-(2.5.3.1) und RNase-(2.5.3.2) Behandlung (Endkonzentrationen je 1 µg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur angeschlossen. Dem Phagenlysate wurde 1 M NaCl zugesetzt, der Ansatz 1 h auf Eis gestellt und danach 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde 10% (w/v) PEG 6000 zugesetzt und durch langsames Rühren bei Raumtemperatur vollständig gelöst. Die Phagen präzipitierten bei 4°C und wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 10000 rpm als Sediment gewonnen. Das Phagenpellet wurde in einer geringen Menge TM-Puffer (2.5.2.2) aufgenommen und das PEG 6000 durch Extraktion mit Chloroform entfernt.

Dichtegradientenzentrifugation (Yamamoto et al., 1970)

Zur weiteren Reinigung wurde das konzentrierte Phagenlysate (5×10^{11} bis 3×10^{12} pfu/ml) auf einen CsCl-Stufengradienten aufgetragen. Dazu wurde dem Lysat 0,5 g/ml festes Cäsiumchlorid (CsCl) zugesetzt und vorsichtig gelöst.

Der Stufengradient wurde wie folgt aufgebaut:

2,0 ml CsCl-Lösung in SM-Puffer (2.5.2.14) mit der Dichte 1,7 g/ml

1,5 ml CsCl-Lösung in SM-Puffer mit der Dichte 1,5 g/ml

1,5 ml CsCl-Lösung in SM-Puffer mit der Dichte 1,45 g/ml
Zentrifugiert wurde für 2 h bei 20°C und 22000 rpm in der Ultrazentrifuge Typ VAC 601 (Rotor SW 40). Die phagenhaltige opaleszierende Bande wurde entnommen und 15 h gegen das 1000 fache Volumen TM-Puffer (2.5.2.2) dialysiert.

2.2.2 Charakterisierung kompletter Phagen

2.2.2.1 Serologische Untersuchungen

2.2.2.1.1 Gewinnung von Anti-Phagen-Seren

Für die Gewinnung von Antiserum gegen Acm-Phagen wurde verfahren wie bei Hudson and Hay (1978) beschrieben. Gereinigtes Phagenlysat (2.2.1.5) mit einem Titer von 10^{10} bis 10^{11} pfu/ml wurde Kaninchen folgendermaßen appliziert:

In 3 aufeinanderfolgenden Wochen wurde jeweils am 1. und 2. Tag der Woche je 1 ml Phagenlysat injiziert. 6 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet und das Serum gewonnen. Die Antiseren wurden freundlicherweise von Prof. W. Erler, Institut für Tierseuchenforschung Jena, bereitgestellt.

2.2.2.1.2 Reaktionen der Phagen mit Antiseren

Zur Ermittlung der Inaktivierungskapazität wurden die Antiseren seriell verdünnt (1:10 bis 1:10000) und mit Acm-Phagen-Suspensionen (1×10^8 pfu/ml) gemischt. Die Ansätze wurden 1 h bei 30°C inkubiert und anschließend mit der entsprechenden Indikatorkultur des Phagen im Doppelschichtagar-Test die Anzahl aktiver Phagen ermittelt. Die K-Werte wurden nach Eisenstark (1967) bestimmt.

$$K = 2,3 D/t \times \log(P_0/P) \text{ min}^{-1}$$

| | |
|----------------|--|
| D | Serumverdünnung |
| t | Dauer der Serumbehandlung |
| P ₀ | Phagenkonzentration zum Zeitpunkt 0 |
| P | Phagenkonzentration nach Serumbehandlung |

2.2.2.2 Beständigkeit der Phagen gegen thermische und chemische Noxen

2.2.2.2.1 Thermische Inaktivierung freier Phagen

Zur Ermittlung der thermischen Inaktivierung wurden Phagenlysate in Phosphatpuffer nach Sörensen auf einen Titer von 1×10^8 pfu/ml verdünnt und der Anteil aktiver Phagen nach 1 h Temperaturexposition im Wasserbad bei 30°C, 40°C, 50°C, 60°C bzw. 70°C im Doppelschichtagar-Test bestimmt.

2.2.2.2.2 Abhängigkeit der Vitalität der Phagen vom pH-Wert des Mediums

Theorell-Stenhagen-Puffer (2.5.2.3) mit einem pH-Bereich von pH 2 bis pH 12 wurde als Medium verwendet. Die Inaktivierung freier Phagen wurde nach 24 h Einwirkungszeit abgestufter pH-Werte bei 32°C im Doppelschichtagar-Test ermittelt.

2.2.2.2.3 Beständigkeit gegen Chloroform

Frisch hergestelltes Phagenlysat mit einem Phagentiter um 1×10^{10} pfu/ml wurde geteilt. Dem einen Lysat wurde 5 % (v/v) Chloroform zugesetzt, das andere Lysat wurde als Kontrolle verwendet. Im Zeitraum von 49 Tagen wurden Titerbestimmungen zur Ermittlung überlebender Phagen im Doppelschichtagar-Test durchgeführt und mit dem Kontroll-Lysat ohne Chloroformzusatz verglichen.

2.2.2.2.4 Überlebensraten nach UV-Exposition

Als Strahlenquelle diente eine Niederdruck-Quecksilberdampfampe (VEB Quarzlampen Markkleeberg) mit einem Emissionsmaximum bei 253,7 nm. Die Phagenlysate mit einem Titer von 2×10^8 pfu/ml wurden in Phosphatpuffer nach Sörensen bei einem Abstand von der Strahlungsquelle von 50 cm steigenden UV-Dosen von 500 bis 2000 erg/mm² ausgesetzt. Anschließend wurde im Doppelschichtagar-Test die Anzahl überlebender Phagen bestimmt.

2.2.3 Charakterisierung der Phagenbausteine

2.2.3.1 Isolierung und Charakterisierung der DNA

2.2.3.1.1 Präparation

CsCl-gereinigtes, hochtitriges Phagenlysats (mindestens 5×10^{11} pfu/ml) wurde im Verhältnis 1:1 mit TE-Puffer (2.5.2.5) gemischt, um eventuell vorhandene Nucleaseaktivität zu hemmen. Der Aufschluß der Phagen erfolgte durch zweimaligen Zusatz von TE-Puffer-equilibriertem Phenol im Verhältnis 1:1 und mehrfachem Mischen. Nach jeder Prozedur wurde zentrifugiert und die wäßrige Phase gewonnen. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt, das restliche Phenol wurde durch mehrmaliges Waschen mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt, die DNA mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol gefällt, im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

2.2.3.1.2 Restriktionsendonucleaseverdau und gelelektrophoretische Trennung

Phagen-DNA wurde mit ausgewählten Restriktionsendonucleasen entsprechend Herstellerangaben für 2-3 h verdaut und danach mit 1/10 Volumen Probenpuffer (2.5.2.15) versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min bei 65°C zur Auflösung kohäsiver Enden inkubiert und bis zum Auftragen in ein Eisbad gestellt. Molekulargewichtsmarker wurden in gleicher Weise vorbehandelt. Es wurden folgende Marker verwendet (Fragmentlängen in kb):

| Marker 1 | Marker 2 | Marker 3 |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| λ /HindIII ^{*1} | 1 kb Ladder ^{*2} | Raoul ^{*3} |
| 23,130 | 12,216 | 48,502 ^a |
| 9,416 | 11,198 | 18,520 |
| 6,557 | 10,180 | 14,980 |
| 4,361 | 9,162 | 10,620 ^a |
| 2,322 | 8,144 | 9,007 |
| 2,027 | 7,126 | 7,378 |
| 0,564 | 6,108 | 5,634 |
| 0,125 | 5,090 | 4,360 |
| | 4,072 | 3,988 |
| | 3,054 | 3,609 |
| | 2,036 | 2,938 |
| | 1,636 | 2,319 |
| | 1,018 | 1,810 |
| | 0,506 | 1,416 |
| | 0,517 | 1,255 |
| | | 1,050 |
| | | 0,903 |
| | | 0,754 |
| | | 0,686 |
| | | 0,554 |
| | | 0,375 |
| | | 0,234 |

*1 Spaltung von DNA des Phagen λ mit HindIII

*2 1 kb Ladder der Fa. Gibco BRL

*3 Raoul Marker der Fa. Appligene

a kein Signal in der Hybridisierung mit pBR325-DNA

Die Proben wurden submers aufgetragen. Die Trennung der Fragmente erfolgte im 15 cm x 15 cm Agarosegel (0,8 % Agarose in 0,5xTAE-Puffer [2.5.1.6]) in einer DNA-Sub-Cell-Kammer der Fa. BioRad bei 30 V/cm und 16 h Trennzeit. Die Gele wurden für 10 min in Ethidiumbromidlösung [EtBr] (2 μ g/ml in 0,5xTAE-Puffer) gefärbt, unter UV-Licht bei 312 nm angeregt und mittels Kleinbildkamera und Rotfilter fotografiert bzw. unter Verwendung des Herolab E.A.S.Y RH-3 Videodokumentationssystems und der Software EASY plus dokumentiert und ausgewertet.

2.2.3.1.4 Southern-Transfer (Southern, 1975; modifiziert nach Smith and Sammers, 1980)

Geeignete Agarosegele wurden nach Dokumentation auf Nitrozellulose (NC) (Schleicher und Schüll) bzw. positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) übertragen. Dazu wurden die Gele einer Denaturierungs-Neutralisationsprozedur unterworfen und zunächst bei großen zu transferierenden Fragmenten 15 min mit 0,25 M HCl depurinieren, kurz mit Aqua dest. gespült und die Prozedur wiederholt. Anschließend wurden die Gele 30 min in einer Lösung aus 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl denaturiert, in A. dest. zwischengewässert und für weitere 30 min in neutralisierendem Puffer (1 M Ammoniumacetat, 0,02 M NaOH) inkubiert.

Die Übertragung der DNA-Fragmente auf Nitrozellulosemembran erfolgte im 2-Seitentransfer. 2 NC-Filter in der Größe des Gels wurden in neutralisierendem Puffer eingeweicht. 1 Filter wurde auf 3 gleich große Bögen Whatmann 3 MM Papier gelegt, die ebenfalls in neutralisierendem Puffer eingeweicht wurden. Auf den NC-Filter wurde das vorbehandelte Agarosegel gelegt, darauf der zweite vorbehandelte NC-Filter und ebenfalls 3 Bögen Whatmann-Papier. Über und unter diese Packung wurden je 3-4 cm dicke Lagen Filterpapier sowie als Abschluß nach oben und unten eine Glasplatte platziert. Auf die obere Glasplatte wurde ein 100 g Gewicht gesetzt und der Aufbau über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die NC-Filter vorsichtig vom Gel entfernt, gekennzeichnet und in 2xSSC (2.5.2.7) gewaschen. Das Gel wurde unter UV-Licht auf erfolgten Transfer geprüft. Die Filter wurden luftgetrocknet und anschließend bei 80°C für 2 h gebacken.

Die Vorbehandlung der Gele für den Transfer auf Nylonmembran erfolgte analog. Zur Neutralisierung wurde allerdings ein anderer Neutralisierungspuffer (1,0 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl) eingesetzt. Für den Einseiten-Transfer wurde ein Vakuumblotter (Fa. Appligene) verwendet und 30 min mit 10xSSC-Lösung als Transfermedium geblottet. Die Fixierung der DNA an den Filter erfolgte für 1 min durch Exposition mit UV-Licht.

2.2.3.1.5 Nick-Translation und Hybridisierung (Maniatis et al., 1982; modifiziert nach Akhverdiyev et al., 1985)

DNA der Phagen Acml und Acml6 wurde durch Nick-Translation und Einbau von ^{32}P -CTP mit ^{32}P markiert. Dazu wurde die DNA zunächst bei 95°C denaturiert, im Eisbad abgekühlt und in folgendem Reaktionsansatz markiert:

- 5 μl 10x konzentrierter Polymerasepuffer Pol I (Serva, Heidelberg)
- 5 μl 0,2 mM d ATP
- 5 μl 0,2 mM d GTP
- 5 μl 0,2 mM d TTP
- 10 μCi -(^{32}P)-d CTP
- 20 μl Phagen-DNA
- 5 μl Polymerase I (7 U/ml) (Serva, Heidelberg)

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 14°C inkubiert und als markierte Probe zur Hybridisierung verwendet.

Alternativ wurde das Digoxigenin-Markierungskit der Fa. Boehringer Mannheim entsprechend Herstellervorschrift eingesetzt.

Die unter 2.2.3.1.4 vorbereiteten Filter wurden in einem möglichst kleinen Volumen Hybridisierungslösung (2.5.2.9) 1 h bei 42°C vorhybridisiert. Die markierte Sonde wurde 5 min bei 100°C gekocht, zum vorhybridisierten Filter in einen Folienbeutel gegeben und der Beutel verschweißt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht.

Nach Abbruch der Reaktion wurde der Filter dreimal in $0,1\times\text{SSC} + 0,1\%$ SDS je 30 min bei 50°C im Schüttelwasserbad gewaschen. Anschließend wurde der Filter luftgetrocknet, und bei -30°C autoradiographiert. Es wurde mit Röntgenfilm HS 11 der Firma Orwo Wolfen gearbeitet. Alternativ wurde das Digoxigenin-Detektionssystem der Fa. Boehringer Mannheim entsprechend Herstellervorschrift eingesetzt. Hier erfolgte die Dokumentation der Hybridisierungssignale über einen Flachbettscanner.

2.2.3.1.6 Elektronenmikroskopische Techniken

(Spreitung, Längenmessung und Homoduplexanalyse von Phagen-DNA)

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Phagen Genome für die Längenmessung der DNA wurde die Spreitungs- und Bedampfungstechnik für DNA nach Plattner und Zingsheim (1987) angewandt. Zur Längenmessung wurden zuvor pBR322 Moleküle (zirkulär, 4,36 kb) und M13 Moleküle (linear, 6,4 kb) als Längenstandard zugegeben, eine Denaturierung/Renaturierung erfolgte hierbei nicht.

Zur Ausbildung von Homoduplices wurde die Phagen-DNA zunächst denaturiert. Dazu wurden 20 μ l A. bidest., die je 0,2 μ g Phagen-DNA enthielten, mit 0,5 μ l 1 M EDTA sowie 2,5 μ l 1 M NaOH versetzt und für 15 min bei 25°C inkubiert. Die Ausbildung der Hybride durch Renaturierung erfolgte durch anschließenden Zusatz von 2,6 μ l einer 1,8 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,2) und 25 μ l Formamid. Nach 30 min Inkubation bei 30°C erfolgte die Weiterbearbeitung der Homoduplices wie oben beschrieben.

2.2.3.2 Analyse der Phagenhüllproteine

2.2.3.2.1 Gewinnung der Hüllproteine

Gereinigte und konzentrierte Phagen mit einem Titer von 5×10^{10} bis 1×10^{11} pfu/ml wurden für diese Analyse verwendet. 50 μ l Phagenlysate wurden mit 50 μ l Lysepuffer (2.5.2.12) versetzt und 5 min bei 100°C gekocht. Dadurch erfolgte das Aufbrechen der Proteine in die individuellen Polypeptide.

2.2.3.2.2 Elektrophoretische Trennung der Proteine

(Kombination der Methoden nach Laemmli [1970] und Neville [1971])

Die Trennung erfolgte in einem Gradientengel bestehend aus 15 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,2 % SDS und einem linearen Acrylamid-Gradienten von 3,6-15 % T und 2,6-1,7 % C. Diesem war ein 1 cm Sammelgel aus 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS und 3,7 % Acrylamid (2,6 % C) vorgelagert (T = Gesamtkonzentration des Monomers [Acrylamid + Bisacrylamid] als g/100 ml; C = prozentualer Anteil des Gesamtmonomers T, das dem Vernetzungsagens Bisacrylamid zugesetzt wird). 30 μ l der denaturierten Proteine wurden auf das SDS-Gel gegeben. Es wurde

ca. 3,5 h in einer Vertikalelektrophorese-Apparatur (Gelgröße 15 cm x 15 cm; Gelstärke 0,8 mm) bei 5-10°C und 20 mA (Sammelgel) sowie 40 mA (Trenngel) getrennt. Die Trennung erfolgte mit Elektrodenpuffer pH 8,3 (25 mM Tris; 0,192 M Glycin; 0,1% SDS).

2.2.3.2.3 Silberfärbung nach Blum et al. (1987)

Das Gel wurde für 1 h in einer Lösung, bestehend aus 50 % Methanol; 12 % Essigsäure; 0,5 ml 37 % Formaldehyd/l fixiert; 3x 20 min in 50 % Ethanol gewaschen, mit Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (0,2 g/l) für 1 min vorbehandelt und 3x kurz in A. bidest. gespült. Danach wurde das Gel für 20 min in einer Silbernitratlösung (2g/l AgNO₃; 0,75 ml 37 % Formaldehyd) vorbehandelt, 2x kurz in A. bidest. gespült, ca 10 min entwickelt (60 g/l Na₂CO₃; 0,5 ml 37 % Formaldehyd/l; 4 mg/l Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) und wiederum 2 x für 2 min mit A. bidest. gewaschen. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Einlegen in 50 mM EDTA. Das Gel wurde in 1 % Essigsäurelösung aufbewahrt und im Durchlicht fotografiert. Zur Trocknung wurde das Gel zunächst für 2 h in einem Gemisch aus 50 % Methanol, 5 % Glycerol, 12 % Essigsäure geschrumpft, zwischen feuchte Cellophan-Trägerfolien gelegt und auf dem Geltrockner getrocknet.

2.2.3.2.4 Auswertung der Gele

Die Molekulargewichtsbestimmung der Phagenproteine erfolgte anhand ihrer Mobilität in SDS-Gradienten-Gelen. Als Standards wurden Eichproteinmischungen (Serva, Heidelberg) für SDS PAGE mit folgenden Referenzen verwendet:

PM1: Phosphorylase B 97,4 kD; Rinderserumalbumin 67 kD; Ovalbumin 45 kD;
Carboanhydrase 29 kD; Hemoglobin $\frac{1}{4}$ 16 kD; Hemoglobin $\frac{1}{2}$ 32 kD

PM2: Lysozymoligomere mit Molekulargewichten von N x 12,5 kD

Zur Auswertung wurden die RF-Werte (Quotienten aus gesamter Laufstrecke und Laufstrecke der Einzelbande) ermittelt. Die RF-Werte der Standards dienten zur Erstellung einer Eichkurve, aus der dann die unbekanntes Molekulargewichte ermittelt wurden.

2.3 Vergleichende Untersuchung an *A. methanolicus* -Stämmen

2.3.1 Präparation der chromosomalen DNA (nach Marmur, 1961)

40 ml ÜN-Kultur wurden sedimentiert und in 50 ml Saline-EDTA (2.5.2.4) resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation erfolgte die Aufnahme der Zellen in 25 ml Saline-EDTA. Die Lyse der Zellen wurde erreicht durch Zusatz von 10 mg Lysozym und Inkubation bei 37°C bis zu 60 min sowie anschließendem Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) (Endkonzentration 2 %). Der Ansatz wurde auf 60°C erhitzt und rasch wieder abgekühlt.

Natrium-Perchlorat wurde in einer Endkonzentration von 1 M zugesetzt und die Mischung mit gleichem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) im Rundkolben 30 min gemischt. Zur Phasentrennung wurde bei 6000 rpm 10 min zentrifugiert und anschließend die wäßrige Phase vorsichtig abgehoben. Das Volumen wurde bestimmt und die wäßrige Phase langsam mit dem doppelten Volumen absolutem Ethanol überschichtet. Durch langsames Rühren mit dem Glasstab erfolgte das Aufwickeln der DNA. Die DNA wurde zunächst vorsichtig an der Glaswand ausgedrückt, kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-15 ml verdünnter Salinecitratlösung (0,015 M NaCl; 0,0015 M Trinatriumcitrat, pH 7,0) gelöst. Durch Zugabe konzentrierter Salinecitratlösung (1,5 M NaCl; 0,15 M Trinatriumcitrat, pH 7,0) erfolgte eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,15 M NaCl und 0,015 M Trinatriumcitrat. Der Ansatz wurde mehrfach 15 min unter Zusatz des gleichen Volumens Chloroform-Isoamylalkohol geschüttelt und zentrifugiert, bis kaum noch Protein in der Interphase war.

Danach wurde die DNA erneut ethanolpräzipitiert, in verdünnter Salinecitrat-Lösung gelöst und mittels RNase-Zusatz (50 mg/ml) und anschließender Inkubation bei 37°C die RNA eliminiert. Es wurde erneut deproteiniert, mit Ethanol gefällt, das Präzipitat 2 mal in 70 % Ethanol gewaschen, in absolutem Ethanol entwässert und in einem möglichst kleinen Volumen TE-Puffer gelöst.

2.3.2 Untersuchungen auf Homologie zwischen Phagen genom und Bakterienchromosom

Analog zu 2.3.1 wurde chromosomale DNA aus *A. methanolicus*-Stämmen isoliert, gespalten, getrennt und auf Nylonmembran transferiert. Zur Hybridisierung wurde ³²P-markierte DNA bzw. DIG-markierte DNA der Phagen Acm1 und Acm6 eingesetzt (2.2.3.1.5).

2.3.3 Untersuchung auf Lysogenie durch Induktion von Prophagen mit Mitomycin C

Diese Methode wurde für *Rhodobacter sphaeroides* Y bei Duchrow et al. (1985) beschrieben und entsprechend der Kultivierungsbedingungen (Medium, Wachstumsgeschwindigkeit) für *A. methanolicus* modifiziert. ÜN-Kulturen der *A. methanolicus*-Stämme wurden mit Standardmedium auf 10^6 cfu/ml verdünnt, 2 h vorkultiviert und danach mit $1 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C versetzt. Die Kulturen wurden 15 h weiter kultiviert und anschließend die Zellen abgetrennt. Die Überstände wurden wie unter 2.2.1.5 beschrieben konzentriert.

2.3.3.1 Mikrobiologischer Induktionsnachweis

Wie bei Adams (1959) beschrieben, wurden die konzentrierten Proben auf allen *A. methanolicus*-Stämmen (2.1.1) im Doppelschichtagar-Test geprüft (2.2.1.1.2).

2.3.3.2 Elektronenmikroskopische Darstellung induzierter Partikel

Die Negativkontrastierungs-Technik (2.2.1.1.1) wurde zur Darstellung der Partikel eingesetzt. Als Kontrastierungsmittel wurde 2 % Uranylacetatlösung verwendet, die Lösung wurde 40 s auf den Präparaten belassen. Die Auswertung erfolgte am Elektronenmikroskop BS 500 der Firma Tesla. Es wurden einheitliche Vergrößerungen von 24 000 fach verwendet.

2.4 Gentransfer bei *A. methanolicus*

2.4.1 Transduktion am System *A. methanolicus* MB58/4-Phage Acml

2.4.1.1 Auswahl der Rezipientenstämme

Aus einem Pool von 150 Aminosäure-Auxotrophie-Mutanten des Stammes *A. methanolicus* MB58/4 wurden durch Bestimmung der Reversion der Marker zur Prototrophie geeignete Rezipientenstämme ausgewählt. Die Spontanreversionshäufigkeit (R) wurde als Quotient aus der Zahl der unter restriktiven Kultivierungsbedingungen (N_r) und der Gesamtzahl der unter permissiven Bedingungen gewachsenen Kolonien (N_p) ermittelt ($R = N_r/N_p$) (Süss, 1981). Eine definierte Einzelkolonie eines zu prüfenden Klones wurde in Vollnährmedium angezogen, gewaschen und in geeigneter Verdünnung sowohl auf VM-Agarplatten zur Ermittlung der Gesamtzellzahl als auch auf Minimalagar-Platten zur Ermittlung der Revertanten ausplattiert.

Die Plattierungseffektivität (EOP) eines Phagen (Quotient aus Phagentiter auf Mutante und Phagentiter auf Ausgangsstamm), ein quantitatives Maß für die Phagensensitivität von Indikatorstämmen (Süss, 1981), wurde ebenfalls bestimmt. ÜN-Kulturen des Donors *A. methanolicus* MB58/4 und der als Rezipienten ausgewählten Auxotrophievarianten wurden auf VN-Medium angezogen. Lysat des Phagen Acml wurde entsprechend verdünnt und Titerbestimmungen nach den üblichen Techniken auf allen Kulturen durchgeführt. Die ermittelten Phagentiter auf den Mutanten wurden jeweils zu den Werten des Ausgangsstammes *A. methanolicus* MB58/4 ins Verhältnis gesetzt.

2.4.1.2 Transduktionsexperimente

Standardprozedur nach Süss (1981) mit der Mutante MB58/4-101 His⁻

Eine für *Streptomyces hygroscopicus* (Süss, 1981) entwickelte Transduktionsmethode wurde für das System *A. methanolicus* MB58/4 und den Phagen Acml modifiziert.

Die Transduktionslysate wurden durch Infektion des prototrophen Donorstammes MB58/4 mit dem Phagen Acml unter Verwendung von Minimalmedium frisch gewonnen. Der Rezipientenstamm MB58/4-101 wurde in Minimalmedium mit 20 µg/ml Histidin über Nacht vorkultiviert und vor Versuchsbeginn in Mineralsalzlösung pH 4,5 gewaschen. Dabei wurde eine Zelldichte von ca. 2×10^8 cfu/ml für den Rezipienten eingestellt. Das Transduktionsgemisch wurde hergestellt durch Mischen des Transduktionslysates mit dem Rezipientenstamm, so daß Infektionsmultiplizitäten zwischen MOI=5 und MOI=0,1 vorlagen. In allen Ansätzen wurden sowohl der Anteil an koloniebildenden Einheiten des Rezipienten (cfu/ml) als auch der Titer des Transduktionslysates (pfu/ml) zu Beginn des Transduktionsexperimentes exakt bestimmt.

Die Ansätze wurden 10 min bei 32°C ohne Schütteln inkubiert und danach mit Acml-Antiserum so versetzt, daß in mitgeführten Kontrollen keine freien Phagen nachweisbar waren.

Die Transduktionsansätze wurden auf Minimalagar-Platten ohne Histidin ausplattiert.

Kontrollen zur Ermittlung spontaner Reversion zur Prototrophie wurden ebenfalls mitgeführt. Zum Ausschluß von Transformationsereignissen wurden Transduktionslysate 30 min mit Acml-Antiserum so versetzt, daß die Phagen vollständig neutralisiert waren. Diese Lysate wurden wie Transduktionslysate aufgearbeitet.

Die Platten wurden 4-6 Tage bei 32°C inkubiert und die Anzahl infektiöser Phagenpartikel sowie die Anzahl an Einzelkolonien in den Transduktionsexperimenten und in den Kontrollansätzen ermittelt.

Die Transduktionseffektivität (EOT) wurde bestimmt nach Bendig und Drexler (1977) als:

$$EOT = N - R / \text{pfu}$$

| | |
|-----|---|
| N | Anzahl aller gewachsenen Kolonien auf der Transduktionsplatte |
| R | Anzahl der ermittelten Revertanten im Experiment |
| pfu | Anzahl infektiöser Phagenpartikel im Experiment |

2.4.1.3 Optimierung der Transduktion

Zur Optimierung der Transduktion wurden eine Reihe Teiluntersuchungen durchgeführt:

1. Ermittlung der optimalen Infektionsmultiplizitäten für die Transduktionsansätze

Die Transduktion wurde nach Standardprozedur durchgeführt. Bei gleicher Zelldichte (2×10^8 cfu/ml) wurden die Phagenkonzentrationen jedoch so eingestellt, daß definierte Infektionsmultiplizitäten von 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 und 5,0 erreicht wurden.

2. Untersuchungen zum Einfluß des UV-Lichtes auf die Stimulierung der Transduktion

Wie unter 2.2.2.2.4 beschrieben, wurden die Rezipientenkultur, das Transduktionslysat bzw. das Transduktionsgemisch verschiedenen UV-Dosen von 500 bis 2000 erg/mm² ausgesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Standardprozedur.

3. Optimierung der Transduktion durch den Einsatz geeigneter Schutzmaßnahmen für die transduzierten Klone

Die Transduktionsansätze wurden nach Zugabe des Anti-Phagen-Serums zusätzlich mit Mineralsalzlösung pH 4,5 ohne Zusätze, der Anti-Phagen-Serum zugegeben war, gewaschen. Außerdem wurden in weiteren Experimenten vor dem Plattieren des Transduktionsgemisches 100 µl Anti-Phagen-Serum in einer Verdünnung von 1:100 auf die Transduktionsplatten aufgespatelt.

4. Untersuchungen zum Einfluß des Wachstumszustandes der Kultur auf die Häufigkeit des Transduktionseignisses

Eine ÜN-Kultur des Rezipienten wurde in MM-Medium mit 20 µg/ml Histidin auf 2×10^8 cfu/ml verdünnt und unter Verfolgung des Wachstumsverlaufes bis zum Erreichen der stationären Phase weiter kultiviert. In Abständen von 30 min wurde Kultur entnommen und in Transduktionsexperimenten als Rezipient verwendet.

2.4.1.4 Stabilitätsuntersuchungen an Transduktantenklonen

Eine repräsentative Anzahl Kolonien (1500) wurde nach erfolgreicher Transduktion isoliert und auf Stabilität des transduzierten Markers untersucht. Die Klone wurden in MM-Medium passagiert, die Aufspaltung der Klone danach mittels Replikatechnik auf VM- und MM-Agar-Platten geprüft. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Klone hinsichtlich ihrer Phagenempfindlichkeit verhalten. Transduzierte Klone, die nach Isolierung von der Transduktionsplatte phagensensibel waren, aber Phagen freisetzen, wurden nach Passagierung mit Acml-Antiserum erneut auf Phagenfreisetzung und Phagensensitivität untersucht.

2.4.1.5 Transduktionsuntersuchungen für weitere Auxotrophiemarker

Weitere Auxotrophiemutanten (MB58/4-100/His⁻; MB58/4-116/Leu⁻; MB58/4-134/Tyr⁻) wurden nach den optimierten Transduktionsbedingungen auf Transduktionsereignisse untersucht.

2.4.2 Transfektion

2.4.2.1 Erzeugung von Sphäroplasten und deren Regeneration

Nach der Methode von Verma et al., (1989) wurden Sphäroplasten aus 20 ml ÜN-Kulturen der *A. methanolicus*-Stämme MB58/4; MB70 und MB129 präpariert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen, in 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen, in 1 ml Sphäroplastenpuffer (2.5.2.13) resuspendiert, zweimal darin gewaschen und die Zellen durch Zentrifugation gewonnen. Zur Sphäroplastenbildung wurden die Zellen in 5 ml Sphäroplastenpuffer, dem 2 mg/ml Lysozym zugesetzt waren, 2 h bei 30°C inkubiert. Die Optimalbedingungen zur Sphäroplastenbildung wurden mit je 1 ml Zellsuspension nach weiterem Verdünnen mit sterilem *A. bidest.* in den Mischungsverhältnissen 1:1; 1:2; 1:3; 1:4;

1:5 im Lichtmikroskop durch Auszählen der Gesamtzellen und osmotisch sensiblen Zellen bestimmt.

Zusätzlich wurde auf Festmedium die Regenerierbarkeit der Sphäroplasten und der Anteil osmotisch sensibler Zellen bei ausgewählten Mischungsverhältnissen untersucht. Dazu wurden die mit sterilem *A. bidest.* verdünnten Ansätze geteilt und sowohl mit sterilem *A. bidest.* (=Anteil von Nicht-Sphäroplasten) als auch mit einem Stabilisierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,3; 0,5 M Saccharose) (=Anteil an Gesamtzellen) im Verhältnis 1:10 weiter verdünnt. Beide Ansätze wurden auf Standardagar + 0,5 M Saccharose plattiert, bei 32°C inkubiert und die Anzahl koloniebildender Einheiten ermittelt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde in gleicher Weise verdünnt und aufgearbeitet.

Die Regenerierbarkeit der Sphäroplasten wurde als Quotient aus Anteil an Gesamtzellen und unbehandeltem Kontrollansatz ermittelt.

Der Anteil an osmotisch sensiblen Zellen (=Sphäroplasten) wurde als Differenz aus dem Anteil an Gesamtzellen und dem Anteil an Nicht-Sphäroplasten bestimmt.

2.4.2.2 Gewinnung der DNA zur Transfektion

Die DNA wurde aus den Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 wie unter 2.2.3.1 beschrieben isoliert. Quantitäts- und Qualitätskontrollen der DNA erfolgten spektrophotometrisch bei 260 nm Wellenlänge (Konzentrationsbestimmung) bzw. als Quotient aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm (Reinheitsbestimmung) an einem Shimadzu-Spektralphotometer. Es wurden nur DNA-Präparationen mit einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 verwendet. Außerdem wurde die DNA seriell verdünnt und in Tropftesten auf der jeweiligen Indikatorkultur auf das Vorhandensein vermehrungsfähiger Phagenpartikel getestet.

2.4.2.3 Methode der Transfektion

Zur Transfektion wurde die von Fukaya et al. (1989) für *Acetobacter* entwickelte Methode zur Transformation von Plasmid-DNA zugrunde gelegt. Von der nach 2.4.2.2 gewonnenen Phagen-DNA wurden jeweils DNA-Stammlösungen von 0,1 µg/ml durch Verdünnen mit TE-Puffer hergestellt. Diese DNA wurde so mit Sphäroplasten gemischt, daß Phagen-DNA-Endkonzentrationen von 1 µg/µl bis 10 µg/µl und Sphäroplastenkonzentrationen von $2,5 \times 10^9$

cfu/ml in 100 μ l Gesamtansatz vorlagen. Das Transfektionsgemisch wurde 2 h; 2,5 h bzw. 3 h bei 32°C ohne Schütteln inkubiert und für 2 min bei 42°C thermisch behandelt.

50 μ l Transfektionsgemisch wurden danach mit 100 μ l frisch gezogener Indikatorkultur für den jeweiligen Phagen in Weichagar gemischt und im Doppelschichtagartest auf Freisetzung infektiöser Phagen untersucht. Die verbliebenen 50 μ l des Ansatzes wurden 1:10 in Phosphatpuffer nach Sørensen pH 5,4 verdünnt und analog plattiert.

Inkubation und Auswertung erfolgte wie bereits beschrieben.

2.4.2.4 Isolierung transfektiv vermehrter Phagen (TAcM-Phagen)

Nach erfolgreicher Transfektion auftretende Einzelplaques wurden isoliert und als reine Phagenlinien gewonnen. Es wurden die unter 2.2 beschriebenen Techniken verwendet.

2.4.2.5 Überprüfung der Wirtsbereiche

Die TAcM-Phagen wurden als Flüssigvermehrung angereichert und wie unter 2.2.5.1 beschrieben auf ihre Wirtsbereiche untersucht.

2.4.2.6 Vergleichende Restriktionsuntersuchungen der DNA von AcM- und TAcM-Phagen

Die DNA der TAcM-Phagen wurde aus CsCl-gereinigten, hochkonzentrierten Phagenlysaten wie unter 2.1.2.3 beschrieben gewonnen und Restriktionsanalysen unterzogen (2.2.5.6.2).

2.5 verwendete Medien und Lösungen

2.5.1 Medien

2.5.1.1 Mineralsalzlösung (Uhlig et al., 1986)

Komponente I (Phosphor-Stammlösung):

68,05 g/l KH_2PO_4

87,09 g/l K_2HPO_4

Komponente II (Stickstoff-Stammlösung):

152,28 g/l NH_4Cl

Komponente III (Calcium-Stammlösung):

5,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Komponente IV (Spurensalzlösung):

71,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,44 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,812 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0,785 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,252 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,98 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Zur Herstellung von 1 l Mineralsalzlösung auf 1 l H_2O zugesetzt:

2 ml Komponente I

5 ml Komponente II

1 ml Komponente III

1 ml Komponente IV

2.5.1.2 *Acetobacter-Gluconobacter*-Agar Nr.4 (CCM-Katalog, 1975)

Hefeextrakt 10 g/l

Glucose 100 g/l

CaCO_3 20 g/l

Agar 25 g/l

2.5.1.3 Aufbewahrungsgagar

15 ml LB-Medium (Difco)

(10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl), pH 7,5
0,55g Difco-Agar
60 ml 0,9% NaCl-Lösung
autoklavieren, pH-Wert auf pH 4,5 einstellen, in Eppendorf-Tubes abfüllen

2.5.2 Puffer und Lösungen

2.5.2.1 Phosphatpuffer nach Sørensen pH 5,4 (Tabellenbuch Chemie, 1975)

Lösung A: 9,078 g KH_2PO_4 /l A. dest.

Lösung B: 11,876 g Na_2HPO_4 /l A. dest.

96,9 ml Lösung A + 3,1 ml Lösung B ergeben Phosphatpuffer pH 5,4

2.5.2.2 TM-Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 7,8

10 mM MgSO_4

2.5.2.3 Theorell-Stenhagen-Puffer: (Tabellenbuch Chemie, 1975)

Lösung A:

Die je 100 ml 1 N NaOH entsprechenden Mengen an Citronensäure- und Phosphorsäurelösung (durch Titration bestimmt) werden mit 3,54 g krist. Borsäure und 343 ml 1 N NaOH versetzt und mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt

Lösung B: 0,1 N HCl

Ansatz:

100 ml Lösung A + X ml Lösung B (je nach gewünschtem pH-Wert) werden auf 500 ml mit A. dest. aufgefüllt

2.5.2.4 Saline-EDTA:

0,15 M NaCl

0,1 M EDTA; pH 8,0

2.5.2.5 TNE Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8,0

2.5.2.5 TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

2.5.2.6 0,5xTAE-Puffer:

2,42 g Tris-Base
0,571 ml Eisessig
2 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0
hergestellt aus 50 x Stammlösung

2.5.2.7 2 x SSC-Lösung:

0,3 M NaCl
30 mM Natriumcitrat
hergestellt aus 20 x Stammlösung

2.5.2.8 0,1xSSC + 0,1% SDS

15 mM NaCl
1,5 mM Natriumcitrat
0,1% SDS

2.5.2.9 Hybridisierungslösung:

2 ml 5 x HEPES-Puffer (2.5.2.10)
2 ml 50 x Denhardt-Puffer (2.5.2.11)
0,2 ml Kalbsthymus-DNA (5 mg/ml in TE-Puffer, 10 min hitzedenaturiert)
5,8 ml steriles A. bidest.

2.5.2.10 5 x HEPES-Puffer:

3 M NaCl

0,1 M N-2(Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure,
mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt

0,02 M EDTA

2.5.2.11 50 x Denhardt-Puffer:

1 % Ficoll

1 % PVP (Polyvinylpyrrolidon)

1 % Gelatine

0,5 % SDS

in A. bidest. angesetzt

2.5.2.12 Lysepuffer für PAA-Elektrophorese (Endkonzentration)

62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)

2% (w/v) SDS

4 % (v/v) Glycerol

1,68 % (w/v) EDTA

5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol

0,001% Bromphenolblau

2.5.2.13 Sphäroplastenpuffer:

0,5 M Saccharose

0,2 M Tris-HCl, pH 7,3

0,5 mM EDTA

2.5.2.14 SM-Puffer

100 mM NaCl
10 mM MgSO₄
20 mM Tris-HCl, pH 7,6
0,01% Gelatine

2.5.2.15 Probenpuffer für Gelelektrophorese (5-fach konzentriert)

40% Glycerol
0,1 M EDTA
0,1% SDS
0,2% Bromphenolblau

2.5.3 Enzyme**2.5.3.1 DNase-Stammlösung:**

10 mg/ml in sterilem A. bidest.

2.5.3.2 RNase-Stammlösung:

10 mg/ml in 1 x TNE-Puffer,
10 min kochen, abkühlen, einfrieren

2.5.3.3 Lysozymstammlösung:

1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung von Phagen für *Acetobacter methanolicus*

3.1.1 Nachweis, Isolierung und Benennung der Phagen

Bei kontinuierlicher Langzeit-Kultivierung von *A. methanolicus* MB58 unter nichtsterilen Bedingungen wurden Inhomogenitäten an dem als Reinkultur eingesetzten Produktionsstamm festgestellt. Es konnte nicht exakt geklärt werden, ob es sich um eine Aufspaltung des ursprünglich homogenen Stammes MB58 oder um Kontaminationen mit Stämmen der gleichen Species handelte. Diese Stämme (2.1.1) weisen in taxonomisch relevanten Merkmalen wie Zell- und Koloniemorphologie, Assimilation und Bildung verschiedener Substanzen eine völlige Übereinstimmung mit dem Typusstamm *A. methanolicus* MB58 auf, unterscheiden sich aber hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeiten und Agglutinationsverhalten mit Lektinen und weisen Unterschiede in der Struktur der Kapselpolysaccharide und Lipopolysaccharide auf (Grimmecke et al., 1991a, b; 1994a, b, d). Diese Stämme sind, wie eingangs erläutert, potentielle Produktionsstämme, für deren Einsatz in ungeschützten Fermentationen die Stabilität des Prozesses ein entscheidendes Kriterium ist.

In kontinuierlichen Fermentationsprozessen mit den Stämmen *A. methanolicus* MB58; MB70 bzw. MB129 auf Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle traten in unregelmäßigen Abständen signifikante Störungen der Kultivierungsprozesse auf. Stagnierendes Wachstum, partielle Lyse der Bakterienzellen, verbunden mit einem raschen Anstieg des Anteils nicht-methanol-verwertender Begleitflora wiesen auf das Auftreten von Bakteriophagen hin. 4 Phagenstämme konnten aus solcherart gestörten Fermentationen isoliert werden.

Schwierig gestaltete sich zunächst der Nachweis der Phageninfektion. In Kulturfiltraten aus gestörten Fermentationsprozessen mit *A. methanolicus* MB58 konnten zwar elektronenmikroskopisch Phagen nachgewiesen werden (Abbildung 1), auf einem Rasen der Reinkultur und auch des Fermentermaterials bildeten diese Kulturfiltrate jedoch keine Plaques.

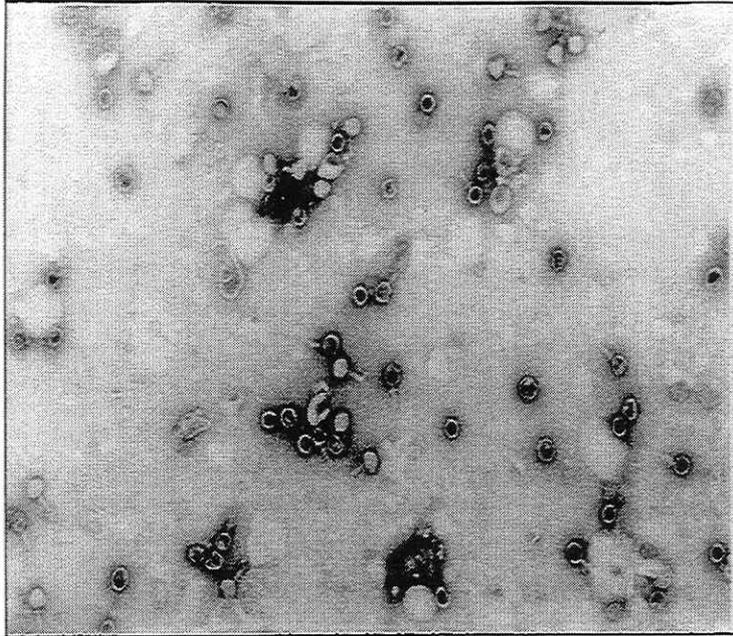


Abbildung 1: Elektronenmikroskopischer Erstdnachweis von Bakteriophagen aus Fermentationen mit dem Stamm *Acetobacter methanolicus* MB58 (Endvergrößerung 42 000 fach)

Erst nach Überprüfung von ca. 150 methanol-utilisierenden Isolaten aus dem phagenhaltigen Fermentationsmaterial konnte ein phagensensibler Stamm (*A. methanolicus* MB58/4) isoliert werden.

Nachweis der Vermehrungsfähigkeit der Phagen durch Plaquebildung

Mit dem Stamm *A. methanolicus* MB58/4 als Indikatorkultur gelang es, den Phagen als Einzelplaque nachzuweisen und zu vermehren (Abbildung 2). Der Phage wurde zunächst als MO1 beschrieben (Wünsche et al., 1983a, b), von Mamat (1989) teilcharakterisiert und nach taxonomischer Einordnung seines Wirtes in Acml umbenannt (Kiesel et al., 1989b).

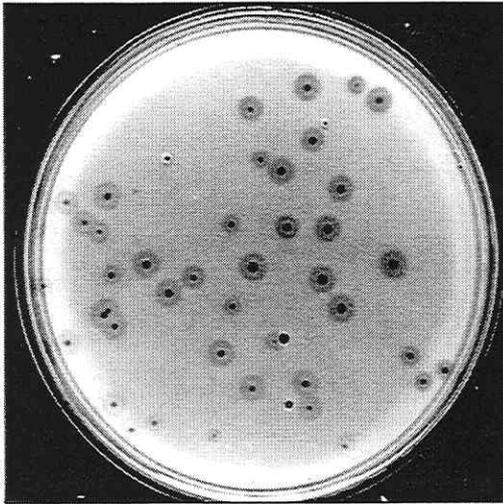


Abbildung 2: Plaques des Phagen Acm1 auf seinem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB58/4

Untersuchungen von Kulturfiltraten aus Fermentationsprozessen mit dem Stamm *A. methanolicus* MB70 führten bereits in Tropftests zum Nachweis und zur Isolierung des Phagen Acm5 (Abbildung 3).

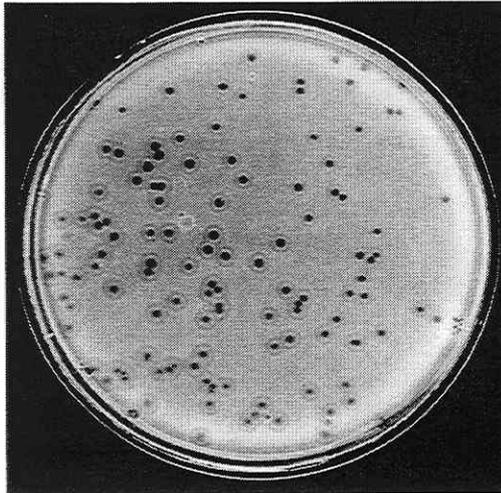


Abbildung 3: Plaques des Phagen Acm5 auf seinem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB70

Aus Fermentationsprozessen mit *A. methanolicus* MB129 konnten in Tropftests 2 weitere Phagen, die als Ac_m6 und Ac_m7 bezeichnet wurden und sich in ihren Wirtsbereichen unterscheiden, isoliert werden. Abbildung 4 zeigt die Plaquebildung des Phagen Ac_m6 auf dem Indikatorstamm *A. methanolicus* MB70.

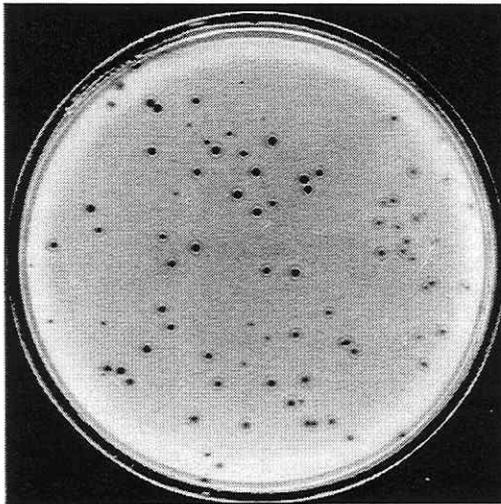


Abbildung 4: Plaques des Phagen Ac_m6 auf dem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB70

Der Phage Ac_m6 ist in der Lage, neben *A. methanolicus* MB70 den Stamm *A. methanolicus* MB129 als zweiten Wirt zu infizieren (Abbildung 5).

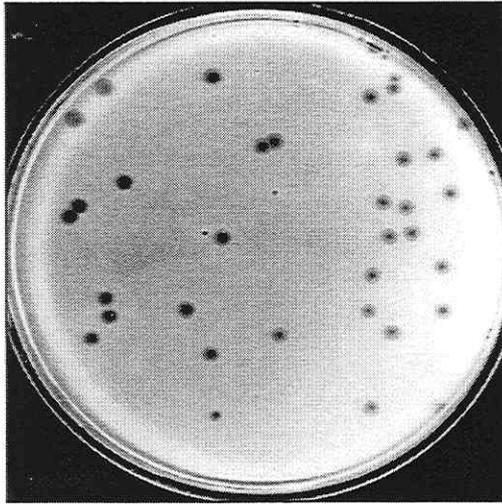


Abbildung 5: Plaques des Phagen Acm6 auf dem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB129

Der Phage Acm7 dagegen vermehrt sich nur auf dem Indikatorstamm *A. methanolicus* MB129 (Abbildung 6).

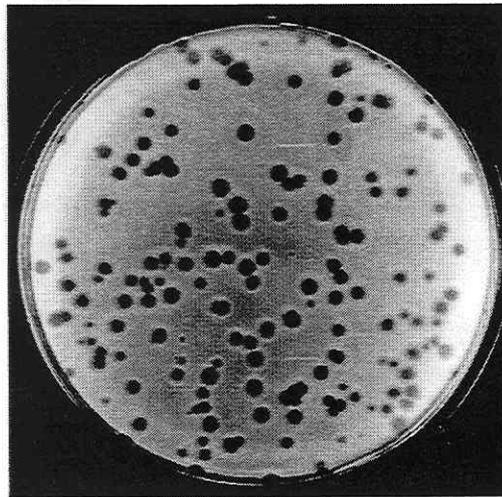


Abbildung 6: Plaques des Phagen Acm7 auf seinem Wirtsstamm *A. methanolicus* MB129

Mit Hilfe des Stammes *A. methanolicus* MB58/10, einem Lysogenisierungsprodukt des Stammes MB58/4 mit dem Phagen Acm1 (Wünsche et al., 1983a, b), konnte im Acm1-Rohlysat ein weiterer, als Acm2 bezeichneter Phage nachgewiesen werden (Abbildung 7).

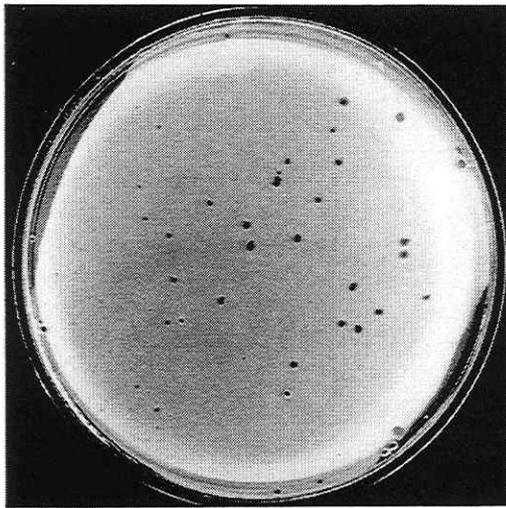


Abbildung 7: Plaques des Phagen Acm2 auf seinem Wirt *A. methanolicus* MB58/10

Visuell erkennbar weisen die Einzelplaques der Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 große Ähnlichkeiten auf (Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6). Außer einem klaren Zentrum von 2-3 mm Durchmesser besitzen diese Phagen einen mehrfach zonierten Halo. Isolate aus diesem Bereich sind weiterhin phagensensibel, es handelt sich also nicht um eine Zone der Lysogenisierung. Mamat (1989) konnte zeigen, daß es sich, ähnlich dem *Gluconobacter oxydans*-Phagen GW 6210 (Robakis et al., 1985) um Diffusionszonen eines phagenassoziierten Lysozyms handelt, das bei der Lyse der Zellen nach abgeschlossener Phagenreplikation im Überschuß gebildet wird und sowohl vor dem Phagen im Agar diffundiert als auch als phagengebundene Depolymerase existiert.

Plaques des Phagen Acm2 weisen keinen Halo auf und sind je nach Zustand der Indikatorkultur *A. methanolicus* MB58/10 klar bis trüb (Abbildung 7). Es kann zunächst vermutet werden, daß dieser Phage keine Überproduktion eines phagenassoziierten Enzyms auslöst und es sich möglicherweise um eine Defektmutante oder um einen Phagen mit eingeschränkter Enzymproduktion handelt.

3.1.2 Wirtsbereiche der Acm-Phagen

Der Wirtsbereich der Phagen wurde sowohl für die in 2.1.1 aufgeführten *A. methanolicus* - als auch für die in 2.1.1 verzeichneten *Acetobacter*- und *Gluconobacter*-Stämme getestet. Es wurden nur Stämme von *A. methanolicus* infiziert (Tabelle 1). Keiner der 5 Phagen war infektiös für Stämme anderer *Acetobacter*- bzw. *Gluconobacter*-Arten. Alle phagensensiblen Stämme stammen aus einem Habitat.

Tabelle 1: Wirtsbereiche der Acm-Phagen auf Stämmen von *A. methanolicus*

| Stamm | Phage | | | | |
|---------|-------|------|------|------|------|
| | Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| MB55 | - | - | - | - | - |
| MB56 | - | - | - | - | - |
| MB57 | - | - | - | - | - |
| MB58 | - | - | - | - | - |
| MB59 | - | - | - | - | - |
| MB60 | - | - | - | - | - |
| MB128 | - | - | - | - | - |
| MB135 | - | - | - | - | - |
| MB58/4 | + | - | - | - | - |
| MB58/10 | (+) | + | - | - | - |
| MB70 | - | - | + | + | - |
| MB129 | - | - | - | + | + |

- phagenunempfindlich
 (+) einzelne trübe Plaques
 + phagensensibel

Die gut voneinander abgrenzbaren Wirtsbereiche der 5 Phagenisolate lassen eine eindeutige Unterscheidung der 5 Acm-Phagen zu. Die Acm-Phagen geben gleichzeitig durch ihre engen Wirtsspektren die Möglichkeit, die 4 Indikatorstämme mittels Phagentypisierung sicher gegeneinander und gegen andere *A. methanolicus* -Stämme abzugrenzen (Kiesel et al., 1989a), wie das für eine Reihe medizinisch relevanter Bakterien seit langem praktiziert wird (Übersicht bei Ackermann and DuBow, 1987).

3.1.3 Parameter der lytischen Entwicklung der Acm-Phagen

Repräsentative Phagenvermehrungszyklen aus Einstufenwachstumsexperimenten aller 5 Phagen für Infektionsmultiplizitäten von $M=1$ und $M=0,1$ sind in Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12 graphisch dargestellt.

Anhand der ermittelten Daten wurden die Latenzzeit (Dauer der Phagenmultiplikation von der Infektion bis zur Freisetzung der ersten neu gebildeten Phagenpartikel) und die Wurfgröße (Quotient aus der Anzahl infizierter Zellen nach 30 min Adsorption und der maximalen Anzahl freigesetzter Phagen) für Infektionsmultiplizitäten von $M=0,1$ und $M=1$ ermittelt.

Abbildung 8 zeigt die Entwicklung des Phagen Acm1. Für diesen Phagen wurde zusätzlich eine Multiplizität von 4,5 untersucht, da auch eine Eignung als Transduktionsvektor zu prüfen war. Es wurden Latenzzeiten zwischen 1,5 und 2,5 h ermittelt, die Wurfgröße liegt zwischen 30 und 50 Phagen pro infizierter Zelle. Bei Multiplizitäten >4 verlängert sich die Latenzzeit auf 3 h und die Wurfgröße reduziert sich auf ca. 10% gegenüber geringeren Multiplizitäten (siehe Tabelle 2).

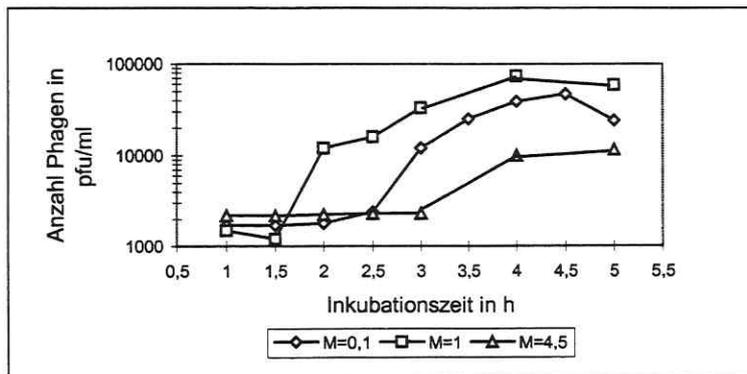


Abbildung 8: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm1 auf *A. methanolicus* MB58/4

Infektionsversuche im Zusammenhang mit den Einstufenwachstumsexperimenten ergaben bei einer Infektionsmultiplizität $MOI = 4,5$ bis zu 96% infizierte Zellen, bei einer $MOI = 1$ wurden noch 69% aller Zellen infiziert. In beiden Fällen traten demnach Mehrfachinfektionen auf. Erst bei $MOI = 4,5$ ist demzufolge eine nahezu vollständige Infektion der Population erfolgt. Es sollte hauptsächlich zu Mehrfachinfektionen kommen. Bei einer $MOI = 0,1$ ist das Verhältnis günstiger, es werden bereits ca. 70% der Zellen des Infektionsgemisches infiziert. Geht man von einer Mehrfachinfektion von 2 Phagen aus, sollten 40% der Population lediglich durch

Einfachinfektion betroffen sein. Läßt man auch Mehrfachinfektionen mit höherer MOI zu, so könnte sich der Anteil einfach infizierter Zellen zwischen 40 und 70% bewegen, d.h. es finden bei dieser MOI zum großen Teil Einfachinfektionen statt, eine wichtige Voraussetzung für die Beurteilung des Einflusses eines Phagenstammes auf seinen Wirt.

Das Ergebnis des Einstufenwachstumsexperimentes mit dem Phagen Acm2 zeigt Abbildung 9. Bei einer Multiplizität von $M=1$ konnte eine Latenzzeit von ungefähr 2 h sowie eine Wurfgröße von ca. 20 pfu/infizierte Zelle ermittelt werden (Tabelle 2). Da dieser Phage für Gentransferprozesse nicht vorgesehen war, wurden keine weiteren MOI getestet.

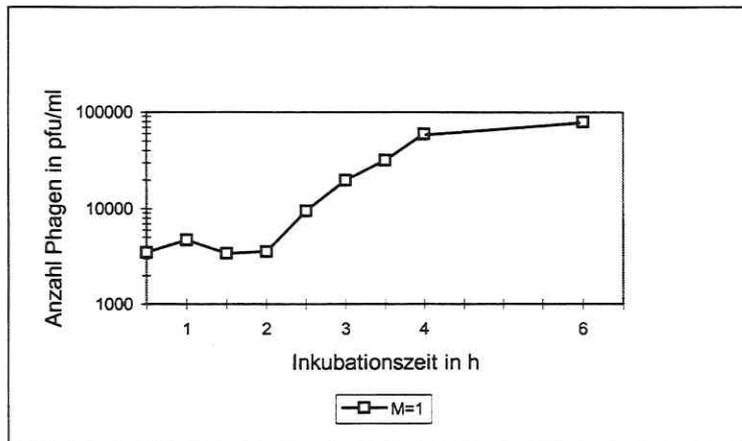


Abbildung 9: Einstufenwachstumsexperiment mit dem Phagen Acm2 auf *A. methanolicus* MB58/10

Abbildung 10 zeigt den Verlauf der Phagenentwicklung für den Phagen Acm5. Die Wurfgrößen für beide Infektionsmultiplizitäten sind nahezu identisch und im Vergleich zu den anderen Acm-Phagen hoch (Tabelle 2). Die Dauer der Latenzzeit entspricht der der anderen Phagen.

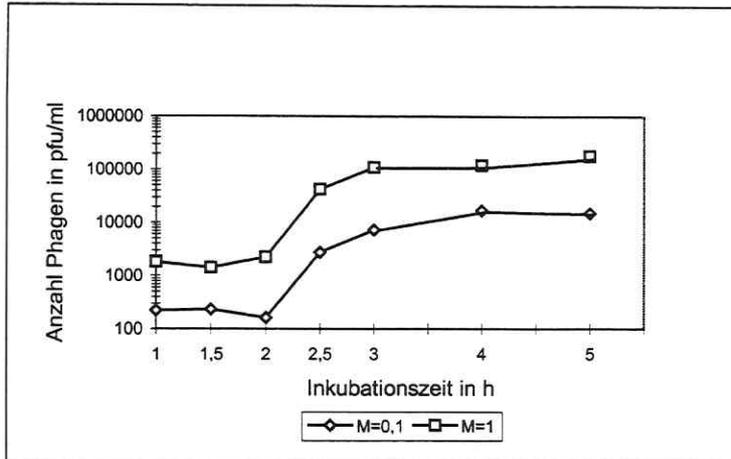


Abbildung 10: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm5 auf *A. methanolicus* MB70

Die Parameter der lytischen Entwicklung des Phagen Acm6 wurden mit dem Indikatorstamm *A. methanolicus* MB129 ermittelt. Der Phage Acm6 weist eine durchschnittliche Wurfgröße von 10 bis 55 Phagen/infizierte Zelle und eine Latenzzeit von 1,5 bis 2 h auf (Abbildung 11). Die Anzahl neugebildeter Phagen ist bei einer Multiplizität von $M=1$ fünfmal höher als bei geringeren Infektionsmultiplizitäten (Tabelle 2).

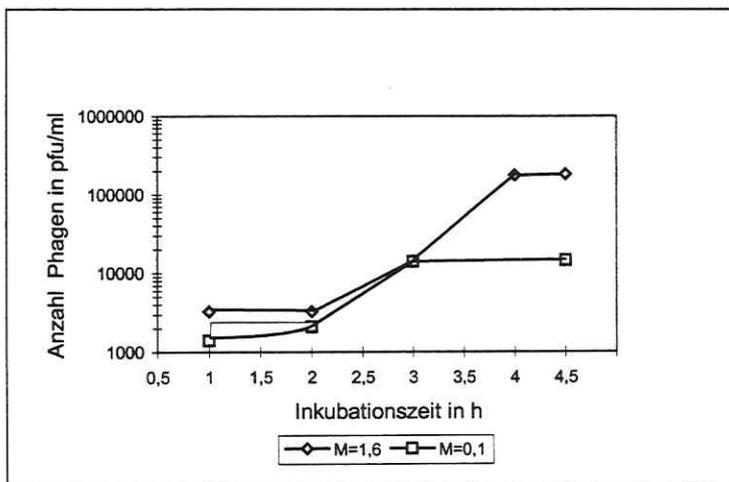


Abbildung 11: Einstufenwachstumsexperiment mit dem Phagen Acm6 auf *A. methanolicus* MB129

Auch für den Phagen Acm7 erfolgte die Ermittlung der Parameter der Phagenmultiplikation auf dem Stamm *A. methanolicus* MB129. Latenzzeit und Wurfgröße dieses Phagen differieren bei den gewählten Infektionsmultiplizitäten nur gering (Abbildung 12) und Tabelle 2).

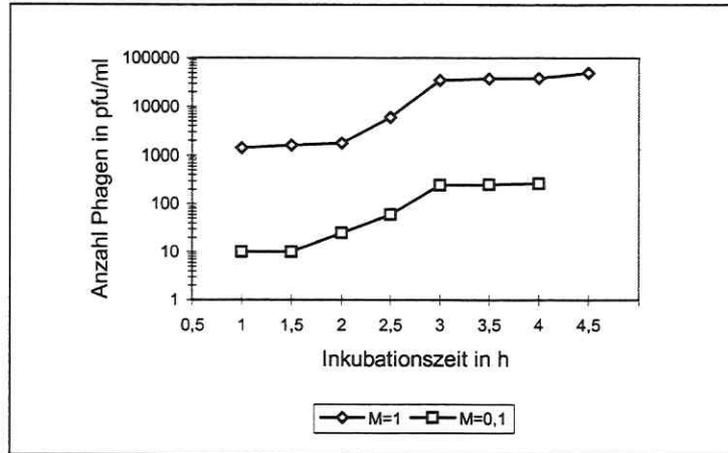


Abbildung 12: Einstufenwachstumsexperimente mit dem Phagen Acm7 auf *A. methanolicus* MB129

In Tabelle 2 sind die Resultate für Latenzzeiten und Wurfgrößen zusammengestellt.

Tabelle 2: Latenzzeit und Wurfgröße der Acm-Phagen in Abhängigkeit von der Infektionsmultiplizität (n.b. = nicht bestimmt)

| Phage | Latenzzeit (h) | | | Wurfgröße (pfu/ml) | | |
|-------|----------------|-----|-------|--------------------|------|-------|
| | M=0,1 | M=1 | M=4,5 | M=0,1 | M=1 | M=4,5 |
| Acm1 | 2,5 | 1,5 | 3 | 27,6 | 49,3 | 5,2 |
| Acm2 | n.d. | 2 | n.b. | n.b. | 17,1 | n.b. |
| Acm5 | 2 | 1,5 | n.b. | 73,3 | 66,6 | n.b. |
| Acm6 | 1,5-2 | 2 | n.b. | 10,3 | 55,4 | n.b. |
| Acm7 | 2 | 1,5 | n.b. | 26 | 35 | n.b. |

Die Latenzzeiten aller 5 Phagen sind im wesentlichen identisch, die Werte der Wurfgrößen liegen in der gleichen Größenordnung. Eine effektive Phagenvermehrung erfolgt bei einer MOI = 1, der erste Zyklus der Multiplikation ist nach 1,5 bis 2 h abgeschlossen.

Latenzzeit und Wurfgröße werden entscheidend determiniert durch die Synthesekapazität der Wirtszelle, abhängig von deren physiologischem Zustand. Somit ist eine Variabilität der beiden Größen vorgegeben (Hadas et al., 1997). Latenzzeit und Wurfgröße sind somit zwar wichtige Daten für die Effektivierung der Phagenpropagation, sie sind jedoch nicht oder nur bedingt heranzuziehen zur Beschreibung und zum Vergleich von Phagen.

3.1.4 Morphologie und Sensitivität gegen Umweltfaktoren

3.1.4.1 Ultrastruktur der Phagen

Zur Ermittlung der Ultrastruktur der 5 Acm-Phagen mittels Elektronenmikroskopie wurden hochgereinigte konzentrierte Phagenlysate verwendet. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die Morphologie der Acm-Phagen beschrieben und die Größe der Phagenpartikel bestimmt (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17).

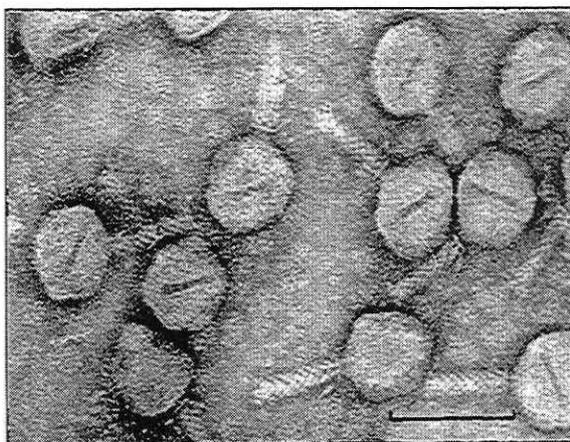


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm1, Maßstab = 100 nm

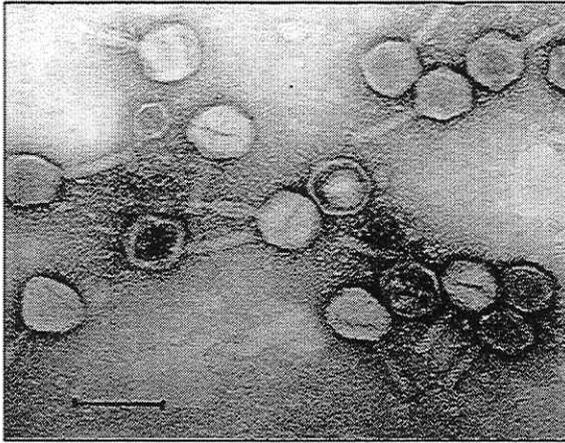


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen AcM2, Maßstab = 100 nm

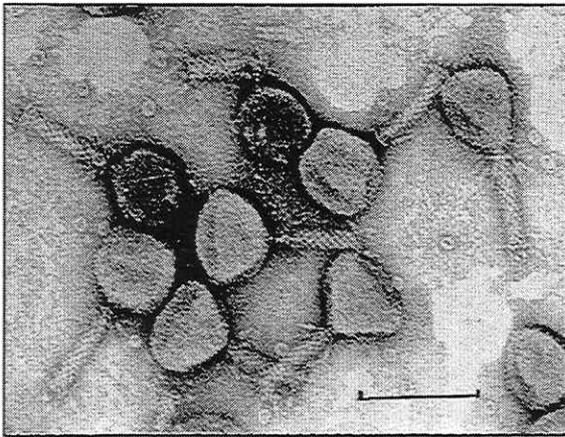


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen AcM5, Maßstab = 100 nm

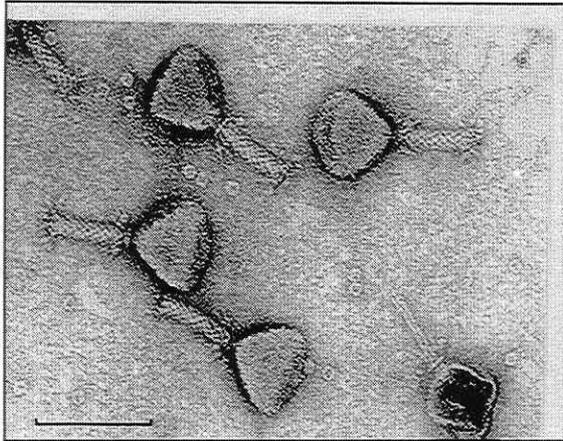


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm6, Maßstab = 100 nm

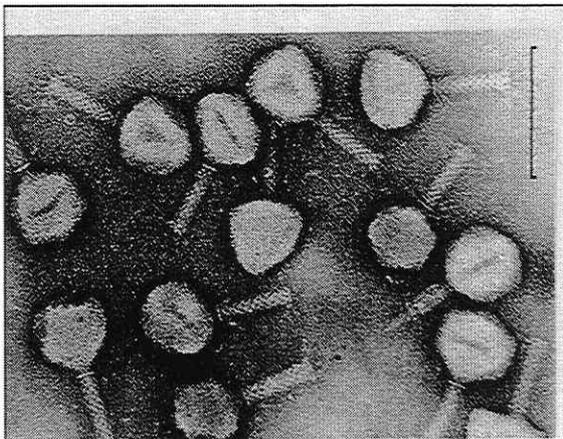


Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Darstellung des Phagen Acm7, Maßstab = 100 nm

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Phagen Acm1, Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7 ergab, daß die 5 Phagenstämme eine einheitliche Ultrastruktur aufweisen:

- Die Phagen besitzen eine typische Kopf-Schwanz-Struktur (*tailed phages*).
- Die Phagenköpfe haben eine ikosaedrische Form.
- Der Schwanzstift ist von einer Scheide umgeben.
- Die Scheide ist kontraktil.

- Als Besonderheit besitzen die Phagen am Kopf-Hals-Übergang einen Kragen mit 3-6 Kragenfilamenten, der Schwanzstift endet in einer Basalplatte mit mehreren Spikes und Fortsatzfibrillen.

Die morphologischen Merkmale dieser Phagengruppe sind in Abbildung 18 als Übersicht dargestellt.

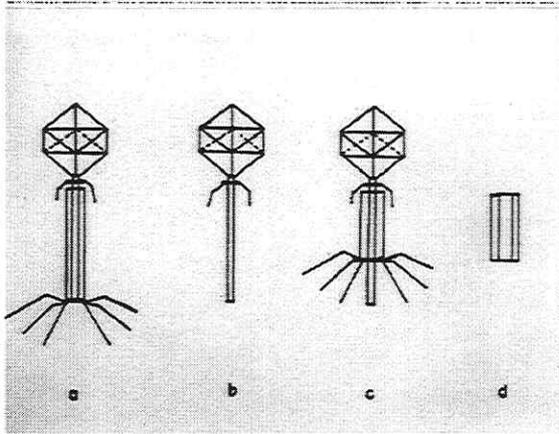


Abbildung 18: Übersicht über ultrastrukturelle Merkmale der Acm-Phagen

- a) kompletter Acm-Phage
- b) Acm-Phage mit abgestreifter Schwanzscheide
- c) Acm-Phage mit kontrahierter Schwanzscheide
- d) abgestreifte Schwanzscheide

Größenbestimmungen der Phagenpartikel ergaben identische Abmessungen für alle 5 Acm-Phagen (Tabelle 3).

Alle 5 Acm-Phagen sind aufgrund ihrer Morphologie den *Myoviridae* zuzuordnen (Ackermann, 1987).

Tabelle 3: Maße der Phagen Acm1, Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7 (in nm)

| Bezeichnung | Phagen Acm1 bis Acm7 |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Gesamtlänge | 140 +/- 2 |
| Kopf | 67 +/- 2 |
| Schwanz (unkontrahiert) | |
| Länge | 73 +/- 3 |
| Dicke | 17 |
| Schwanzstift (Dicke) | 4 |

Trotz identischer Morphologie wurden zunächst aufgrund der eindeutig unterschiedlichen Wirtsbereiche 5 Acm-Phagenstämme unterschieden.

3.1.4.2 Neutralisation mit Anti-Phagen-Seren

Für die Ermittlung serologischer Reaktionen standen Seren gegen die Phagen Acm1, Acm5 und Acm6 zur Verfügung. Geprüft wurde die Kreuzreaktivität der 3 Antiseren und damit die Möglichkeiten zur Differenzierung der Phagenstämme Acm1 bis Acm7 mittels serologischer Reaktionen. Nach Adams (1959) ist der K-Wert, den man erhält, wenn ein spezielles Antiserum gegen verschiedene Phagen getestet wird, ein Maß für den Grad der serologischen Verwandtschaft der Phagen. Tabelle 4 zeigt die K-Werte der serologischen Reaktionen der 5 Acm-Phagen mit den 3 Antiseren.

Tabelle 4: Serologische Reaktionen der Acm-Phagen mit 3 Antiseren (Angabe als K-Werte in min^{-1})

| Serum gegen | K-Werte für die Phagen | | | | |
|--------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| Acm1 | 64,6 | 39,9 | 37,9 | 67,3 | 76,4 |
| Acm5 | 23,4 | 26,0 | 62,7 | 77,3 | 62,1 |
| Acm6 | 9,8 | 16,6 | 61,3 | 70,1 | 46,3 |

Es zeigt sich, daß die 3 Antiseren mit allen 5 Acm-Phagen kreuzreaktiv sind, die K-Werte jedes einzelnen Antiserums aber mit den 5 Phagen Unterschiede aufweisen. Da hohe K-Werte eine starke Antigen-Antikörper-Reaktion repräsentieren, niedrige K-Werte für eine geringere Reaktivität stehen, ist folgendes abzuleiten:

- Die 5 Acm-Phagen haben gemeinsame antigene Strukturen, sind somit untereinander verwandt (Kreuzreaktivität), jedoch nicht identisch (Unterschiede in K-Werten).
- Anti-Acm1-Serum ist stark reaktiv mit Acm1, Acm6 und Acm7 und zeigt mit Acm2 und Acm5 eine schwächere Reaktion.
- Anti-Acm5-Serum reagiert stark mit Acm5, Acm6 und Acm7 und weist mit Acm 1 und Acm2 eine deutlich geringere Reaktion auf.
- Anti-Acm6-Serum weist starke Reaktionen mit Acm5 und Acm6 auf, eine etwas schwächere Reaktion mit Acm7, und eine deutlich schwächere Reaktion erfolgt mit Acm1 und Acm2.
- Es läßt sich anhand der Höhe der K-Werte eine Einteilung der Acm-Phagen in 2 Gruppen vornehmen.

Gruppe 1: Phagen mit hoher Reaktivität gegenüber dem verwendeten Antiserum

Gruppe 2: Phagen mit geringerer Reaktivität gegenüber dem verwendeten Antiserum

Die Zuordnung der Phagen in die beiden Gruppen ist für die 3 verwendeten Antiseren nicht völlig identisch (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Gruppierung der Acm-Phagen nach der Höhe der K-Werte

| Antiserum gegen: | Gruppe 1 | Gruppe 2 |
|------------------|---------------------|------------|
| Acm1 | Acm1; Acm6; Acm7 | Acm2; Acm5 |
| Acm5 | Acm5; Acm6; Acm7 | Acm1; Acm2 |
| Acm6 | Acm5; Acm6; (Acm7)* | Acm1; Acm2 |

- * Die Einordnung des Phagen Acm7 in Gruppe 1 erfolgt mit Vorbehalt. Der K-Wert liegt zwar höher als für Gruppe 2, er weicht jedoch auch von den Werten der Gruppe 1 stark ab.

3.1.4.3 Stabilität gegen physikalische und chemische Noxen

3.1.4.3.1 Thermische Inaktivierung freier Phagen

Das Temperaturoptimum für das Wachstum von *A. methanolicus* liegt bei 32°C. Bei Temperaturen von > 38°C wird das Wachstum dieser Stämme bereits stark eingeschränkt (Uhlig et al., 1986). Ihre Phagen tolerieren ein breiteres Temperaturspektrum (Tabelle 6). Bei gleichen Ausgangstitern von $1,2 \times 10^8$ pfu/ml wurden jedoch unterschiedliche Inaktivierungsverläufe festgestellt.

Tabelle 6: Überlebensraten der Acm-Phagen nach Temperatureinwirkungen von 1 h

| Phage | überlebende Phagen (in %) bei 1 h Temperatur-Exposition von: | | | | | |
|-------|--|------|------|------|------|-------|
| | 32°C | 37°C | 40°C | 50°C | 60°C | 70°C |
| Acm1 | 100 | 100 | 85 | 76 | 17 | 0 |
| Acm2 | 100 | 100 | 100 | 23,3 | 3,3 | 0,006 |
| Acm5 | 100 | 100 | 100 | 35 | 10,8 | 0 |
| Acm6 | 100 | 100 | 100 | 50 | 5 | 0 |
| Acm7 | 100 | 100 | 100 | 65 | 3,9 | 0 |

Temperaturen von 32°C bzw. 37°C haben keinen Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Acm-Phagen im Untersuchungszeitraum.

Erst bei Temperaturen ab 40°C sind Unterschiede in der Temperaturstabilität festzustellen. Der Phage Acm1 erfährt bereits bei 40°C eine geringe Inaktivierung, die auch bei Einwirkung von 50°C kaum fortschreitet. Für die Phagen Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7 ist bei Einwirkung von 40°C noch keine Inaktivierung nachzuweisen. Erst im Temperaturbereich von 50°C werden diese Phagen inaktiviert, die Inaktivierung ist dabei für Acm2 und Acm5 höher als für die Phagen Acm6 und Acm7. Steigt die Temperatur auf 60°C, werden alle 5 Phagen drastisch inaktiviert, wobei Acm2, Acm6 und Acm7 zu mehr als 95%, Acm1 und Acm5 zu mehr als 80% geschädigt werden. Bei einer Einwirkung von 70°C sind bereits nach 20 min alle Phagen irreversibel geschädigt.

Die Inaktivierungsverläufe der Acm-Phagen sind in Abbildung 19 zusätzlich graphisch dargestellt.

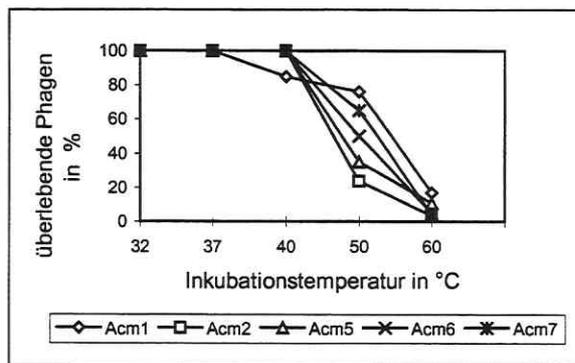


Abbildung 19: Inaktivierung der 5 AcM-Phagen über ein Temperaturintervall von 32°C bis 60°C

Diese Art der Darstellung zeigt für die Phagen Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7 einen Kurvenverlauf, der einer Kinetik 1. Ordnung folgt. Das ist nach Ackermann and DuBow (1987) ein Beleg für die Homogenität eines Phagenstammes. Anders der Inaktivierungsverlauf für den Phagen Acm1, diese Kurve weist einen biphasischen Verlauf auf, der mit einer vergleichsweise starken Inaktivierung beginnt und sich dann verlangsamt. Ackermann and DuBow (1987) erklären solche Inaktivierungsverläufe mit phänotypischer Heterogenität eines Phagen. Dieses Indiz für das Vorliegen eines Mischlysates konnte durch die Gewinnung des Phagen Acm2 aus dem Acm1-Lysat bestätigt werden.

3.1.4.3.2 pH-Toleranz freier Phagen

Acetobacter methanolicus-Stämme wachsen im Bereich von pH 3,5 bis 6,5. Das pH-Optimum liegt bei pH 4,0. Um den Toleranzbereich für AcM-Phagen zu ermitteln, war ein Puffersystem zu wählen, das einen weiten pH-Bereich überstreicht. Der Theorell-Stenhagen-Puffer mit einem pH-Bereich von 2 bis 12 erwies sich als geeignet. Er wurde bereits erfolgreich von Werner (1977) für die Untersuchung zur pH-Beständigkeit von Phagen methanotropher Bakterien eingesetzt.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur pH-Beständigkeit der Phagen Acm1, Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7.

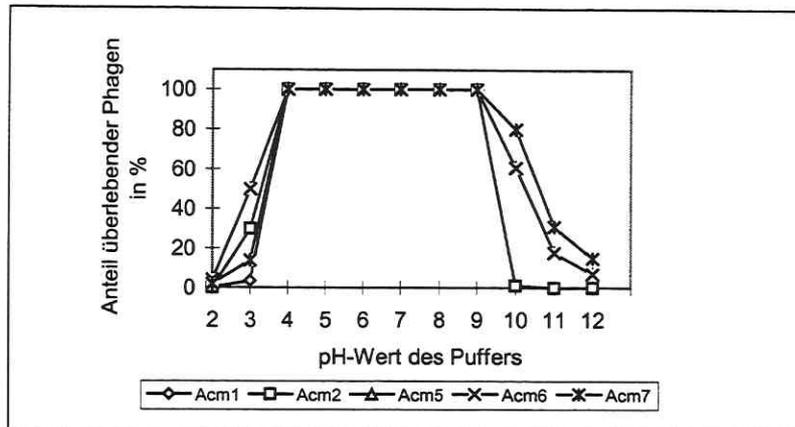


Abbildung 20: pH-Stabilität der Acm-Phagen nach 24 h Inkubation in Theorell-Stenhagen-Puffer unterschiedlicher pH-Werte

Alle 5 Phagen zeigen einen weitestgehend identischen Kurvenverlauf. Im Bereich von pH 4 bis pH 9 erfolgte innerhalb von 24 h Einwirkung in Theorell-Stenhagen-Puffer keine Inaktivierung der Phagen.

Werte unter pH 4 und über pH 9 bewirken jedoch einen starken Abfall des Phagentiters. Während die Inaktivierungsverläufe für die Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 bei Werten >pH 9 nahezu identisch sind und erst im Bereich >pH 10 eine starke Reduzierung der vermehrungsfähigen Partikel erfolgt, erfährt der Phage Acm2 bereits bei pH-Werten >pH 9 eine nahezu vollständige Inaktivierung. Er ist somit im alkalischen Milieu etwas instabiler.

Es ist festzustellen, daß die Acm-Phagen einen wesentlich größeren pH-Bereich tolerieren und gegenüber ihren Wirtsorganismen, die sich eine ökologische Nische im sauren Milieu erschlossen haben, hinsichtlich Überlebensfähigkeit im Vorteil sind. Die für Phagenpuffer üblichen pH-Bereiche von pH 8 sind somit für die Lagerung der Acm-Phagen ebenfalls geeignet. Unterschiede im pH-Toleranzbereich könnten Hinweise auf Unterschiede in der Struktur der Phagenhüllproteine sein.

3.1.4.3.3 Beständigkeit gegen Chloroform

Chloroform wird üblicherweise zur bakteriensterilen Konservierung von Phagenrohlysaten verwendet. Allerdings sind ca. 30% der gut untersuchten Phagen Chloroform-sensibel. Deshalb ist es wichtig, neu isolierte Phagenstämme auf ihre Empfindlichkeit gegen dieses Agens zu prüfen.

Für den Phagen Acm1 wurde beispielhaft der zeitliche Verlauf der Aktivität der Phagenpartikel nach Zugabe von Chloroform über einen Zeitraum von 48 Tagen verfolgt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluß von Chloroform auf den Phagen Acm1

| Inkubationszeit in Tagen | Phagentiter | Phagentiter |
|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | Acm1-Lysat mit 5% Chloroform | Acm1-Lysat ohne Chloroform |
| 0 | $6,8 \times 10^9$ | $6,8 \times 10^9$ |
| 3 | $4,0 \times 10^9$ | $4,2 \times 10^9$ |
| 4 | $6,8 \times 10^9$ | $5,4 \times 10^9$ |
| 7 | $7,4 \times 10^9$ | $6,7 \times 10^9$ |
| 21 | $5,0 \times 10^9$ | $5,1 \times 10^9$ |
| 48 | $2,0 \times 10^9$ | $2,5 \times 10^9$ |

Für die anderen Acm-Phagen wurde lediglich der 0-Wert und der Anteil überlebender Phagen nach 30 Tagen Inkubation bestimmt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Stabilität der Phagen Acm2-Acm7 gegen Chloroform

| Inkubationszeit in Tagen | Lysat des Phagen: | | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| 0-Wert: ohne Chloroform | $8,0 \times 10^9$ | $2,2 \times 10^9$ | $2,0 \times 10^{10}$ | $1,4 \times 10^{10}$ |
| mit Chloroform | $8,0 \times 10^9$ | $2,2 \times 10^9$ | $2,0 \times 10^{10}$ | $1,4 \times 10^{10}$ |
| 30 Tage: ohne Chloroform | $4,1 \times 10^8$ | $6,9 \times 10^7$ | $4,1 \times 10^9$ | $3,2 \times 10^9$ |
| mit Chloroform | $6,4 \times 10^9$ | $7,3 \times 10^9$ | $1,1 \times 10^{10}$ | $1,1 \times 10^{10}$ |

Lagerungsversuche unter Zusatz von 5% Chloroform bis zu 30 Tagen zeigten in keinem Fall eine Reduzierung des Phagentiters im Vergleich zum Kontroll-Lysat. Somit ist dieses Agens zur bakteriensterilen Lagerung der Acm-Lysate geeignet.

3.1.4.4 Zusammenfassung

In Tabelle 9 sind zusammenfassend alle unter 3.1.1 bis 3.1.4 ermittelten Ergebnisse zur klassischen Charakterisierung der Acm-Phagen dargestellt. Sieht man von der Wirtsspezifität der Acm-Phagen ab, ist eine sichere Identifizierung/Differenzierung nach morphologischen Merkmalen, Parametern der lytischen Entwicklung und Sensitivität gegen physikalische und chemische Noxen nicht möglich.

Tabelle 9: Charakteristika der Acm-Phagen

| Merkmal | Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
|---|--|-----------|----------|---------------|----------|
| Größe (nm): | | | | | |
| Kopf | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 |
| Schwanz | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Kragen | ja | ja | ja | ja | ja |
| Filamente | ja | ja | ja | ja | ja |
| serologische Reaktionen | kreuzreaktiv mit allen geprüften Antiseren | | | | |
| Wirtsbereich | MB58/4 | MB58/10 | MB70 | MB70 MB129 | MB129 |
| Plaque-morphologie | mit Halo | ohne Halo | mit Halo | mit Halo | mit Halo |
| Latenzzeit (h) | 1,5-2,5 | 2 | 1,5-2 | 1,5-2 | 1,5-2 |
| max. Wurfgröße | 49,3 | 17,1 | 77,3 | 55,4 | 35 |
| pH-Toleranz | 4-9 | 4-9 | 4-9 | 4-9 | 4-9 |
| Temperatur-inaktivierung (100 %) | 70°C | >70°C | >70°C | 70°C | >60°C |
| Chloroform-Beständigkeit | ja | ja | ja | ja | ja |

3.1.5 Bestandteile der Bakteriophagen

Phagen sind aufgrund ihrer parasitischen Lebensweise auf ein Minimum an lebenswichtigen Bausteinen reduziert. Selbst so fein strukturierte Phagen wie die *Myoviridae* setzen sich lediglich aus bis zu 28 verschiedenen Proteinen zusammen. Die in diesen Virionen enthaltene DNA kann bei geschwänzten Phagen zwischen 17 und 725 kb groß sein (Ackermann, 1998) und neben essentiellen Genen auch bis zu 40% unbekannte Information tragen. Somit wird ein Phage im wesentlichen determiniert und charakterisiert durch die Struktur und Funktion dieser beiden Komponenten.

Die bisherigen Kenntnisse über die 5 Acm-Phagen lassen eine nahe Verwandtschaft dieser Phagen vermuten, Wirtsbereiche und serologische Reaktionen weisen allerdings darauf hin, daß in der Struktur der Phagenhüllproteine Unterschiede nachzuweisen sein könnten, die sich im Phagen genom widerspiegeln sollten. Daher wurden im weiteren Teil der Arbeit wirtsunabhängige Merkmale der Phagen analysiert, um die Unterscheidung von 5 Phagenstämmen zu rechtfertigen und die Art der Unterschiede festzustellen.

3.1.5.1 Hüllproteine

Phagenhüllen, auch als Capside bezeichnet, setzen sich bei den *Myoviridae* zusammen aus dem Kopf, einem Schwanz, bestehend aus Schwanzstift und kontraktile Schwanzscheide, einer Basalplatte mit Spikes und/oder Fortsatzfibrillen. Außerdem wurden einige Anhänge wie Kragen mit und ohne Filamenten gefunden. Auch interne Proteine können vorhanden sein (Ackermann et al., 1995). Aus der Vielzahl der Komponenten resultiert naturgemäß eine hohe Anzahl nachzuweisender Proteine für diese Phagengruppe. Das trifft auch auf die Acm-Phagen zu.

Die Auswertung der Polyacrylamidgele mit den fraktionierten Hüllproteinen der Acm-Phagen ist in Abbildung 21 dargestellt. Bis zu 19 Banden unterschiedlicher Molekulargewichte wurden festgestellt.

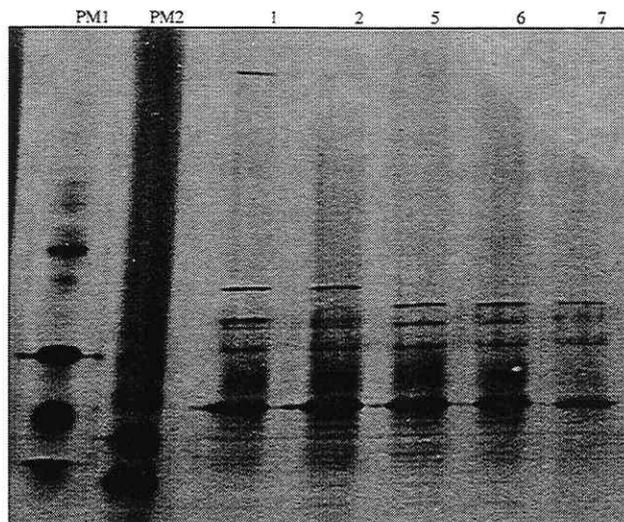


Abbildung 21: Analyse der Phagenhüllproteine der Phagen *Acml* (=1), *Acm2* (=2), *Acm5* (=5), *Acm6* (=6) und *Acm7* (=7) im PAA-Gradientengel, PM1= Proteinmarker 1; PM2= Proteinmarker 2.

Die Auswertung der Gele ergab nach Vergleich mit Molekulargewichtsstandards die in Tabelle 10 dargestellten Werte.

Tabelle 10: Molekulargewichte der Hüllproteine der Acm-Phagen (Molekulargewichte der einzelnen Banden in kD)

| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Am6 | Acm7 |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| 84 | 84 | - | - | - |
| - | - | 79 | 79 | 79 |
| 77,5 | 77,5 | - | - | 77,5 |
| 74 | 74 | 74 | 74 | 74 |
| 69 | 69 | 69 | 69 | 69 |
| 65 | - | - | - | - |
| - | - | 63 | 63 | 63 |
| 60 | 60 | - | - | - |
| - | - | - | 58 | - |
| - | - | - | 57 | - |
| 52 | 52 | 52 | 52 | 52 |
| 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 45(MP) | 45(MP) | 45(MP) | 45(MP) | 45(MP) |
| 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |
| 39 | 39 | 39 | 39 | 39 |
| 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| - | 34 | 34 | 34 | 34 |
| 31 | 31 | 31 | 31 | 31 |
| 29 | 29 | 29 | 29 | 29 |
| - | - | 28 | 28 | - |
| 27 | - | - | - | - |
| - | - | - | - | 25 |
| 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |

MP = Majorprotein

fett gedruckt: identische Banden

Da die Vielzahl der Banden die Auswertung sehr erschwert, wurden die Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Zusammensetzung der Hüllproteine in Tabelle 11 herausgestellt.

Tabelle 11: Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Zusammensetzung der Hüllproteine der Phagen Acm1-Acm7

| | Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
|---|------|------|------|------|------|
| Gesamtzahl Banden: | 17 | 16 | 16 | 18 | 17 |
| identisch | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| abweichend | 5 | 4 | 4 | 6 | 5 |
| MG abweichender Einzelbanden (in kD) | | | | | |
| 84 | + | + | - | - | - |
| 79 | - | - | + | + | + |
| 77,5 | + | + | - | - | + |
| 65 | + | - | - | - | - |
| 63 | - | - | + | + | + |
| 60 | + | + | - | - | - |
| 58 | - | - | - | + | - |
| 57 | - | - | - | + | - |
| 34 | - | + | + | + | + |
| 28 | - | - | + | + | - |
| 27 | + | - | - | - | - |
| 25 | - | - | - | - | + |

Die 5 Acm-Phagen besitzen eine sehr ähnliche Hüllproteinstruktur (Tabelle 10, fettgedruckte Werte). Sowohl die Banden für das Majorprotein (45 kD), das aufgrund seiner Dominanz die Kopfstrukturen der Phagen repräsentiert, als auch weitere 11 Polypeptide sind in allen Phagen identisch.

In einer geringeren Anzahl von Polypeptiden existieren Unterschiede, die jeden Phagen eindeutig charakterisieren (Tabelle 11). Die Muster der Phagen Acm1 und Acm2 differieren zu den anderen Phagen in 84, 77,5 und 60 kD großen Peptiden. Der Phage Acm1 hat zudem ein 65 kD- und ein 27 kD-Peptid, die dem Phagen Acm2 fehlen, dieser besitzt dafür ein 34 kD-Peptid, das dem Phagen Acm1 fehlt, das aber auch in den Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 vorhanden ist. Außerdem ist im Acm1-Hydrolysat ein sehr großes Polypeptid nachweisbar, das allen anderen Phagen fehlt, dessen Größe aber nicht bestimmt werden konnte.

Die Phagen Acm5 und Acm6 sind charakterisiert durch ein spezifisches 28 kD-Peptid. Außerdem besitzen sie 79 und 63 kD große Polypeptide, die auch im Acm7 vorkommen sowie ein 34 kD großes Peptid, das auch in Acm2 und Acm7 vorhanden ist. Der Phage Acm6 unterscheidet sich aber vom Phagen Acm5 durch 2 Polypeptide, die 58 und 57 kD groß sind und nur im Acm6 vorkommen.

Der Phage Acm7 weist mit den Proteinmustern beider Phagengruppen Ähnlichkeiten auf, es konnte sowohl das für Acm5/6 typische 79 und 63 kD-Polypeptid festgestellt werden als auch das Acm1/2-typische 77,5 kD-Polypeptid nachgewiesen werden. Der Phage Acm7 nimmt somit auch bei der Hüllproteinstruktur wieder eine Zwischenstellung ein.

Da sich die 5 Acm-Phagen durch ihre Wirtsspezifität unterscheiden, die nach Ackermann and DuBow (1987) durch spezifische Schwanzproteine determiniert ist, sollten die gefundenen Unterschiede im Proteinmuster in erster Linie die Struktur der Schwanzproteine der Acm-Phagen betreffen.

3.1.5.2 Nukleinsäuren

Strukturelle Unterschiede in den Hüllproteinen der Acm-Phagen sind bedingt durch unterschiedliche genetische Information. Naheliegend war daher, die Genome der Acm-Phagen einer eingehenden molekulargenetischen Analyse zu unterziehen.

3.1.5.2.1 Molekulargewichte der Restriktionsfragmente nach Restriktionsspaltung

Restriktionsendonucleasen haben spezifische Erkennungsregionen auf der DNA, die bei verschiedenen Organismen unterschiedlich auf der DNA angeordnet sind. Unterschiede im Restriktionsmuster können somit Anhaltspunkte für Differenzen in der Struktur der zu klassifizierenden DNA liefern. Allerdings wird die Mehrzahl dieser Enzyme durch modifizierte DNA beeinflusst (Nelson et al., 1993), so daß die so erzielten Ergebnisse kritisch zu bewerten sind.

Zur Charakterisierung der Genome der 5 Acm-Phagen wurden 8 Restriktionsendonucleasen ausgewählt, die die Acm-Genome unterschiedlich häufig schneiden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 und Tabelle 12 (Spaltungen mit HindIII, PstI und PvuII), Abbildung 23 und Tabelle 13 (Spaltungen mit BglI und SalGI) sowie Abbildung 24 und Tabelle 14 (Spaltungen mit EcoRI, EcoRV und ClaI) zusammengestellt.

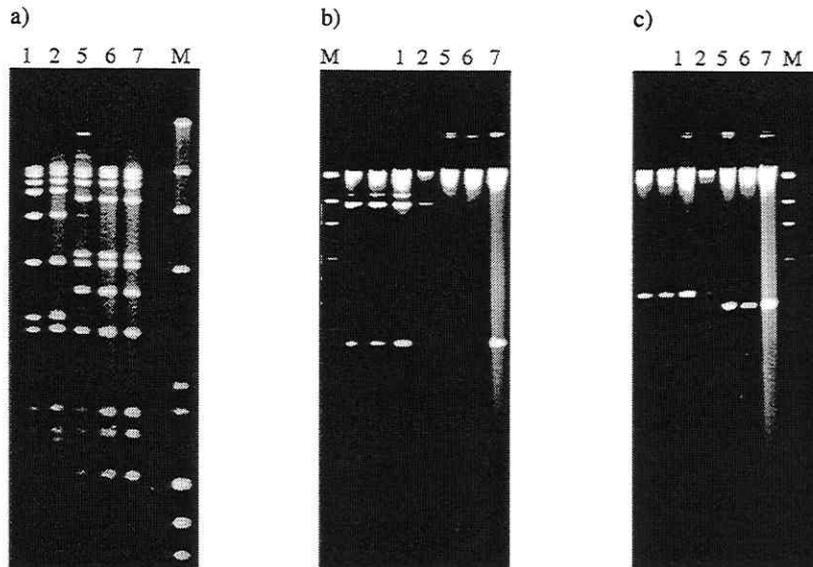


Abbildung 22: Spaltung der Acm-DNA mit den Restriktionsendonucleasen *HindIII* (a), *PstI* (b) und *PvuII* (c) [M=Marker 1; 1=Acm1; 2=Acm2; 5=Acm5; 6=Acm6; 7=Acm7]

Tabelle 12: Größe der Einzelfragmente der Acm-DNA aus Abb. 22 (a), 22 (b) und 22 (c)

| (a) Größe der Einzelfragmente nach <i>HindIII</i> -Spaltung (in kb) | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|
| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| 9,0 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | 9,0 |
| 8,5 | 8,5 | 8,5 | 8,5 | 8,5 |
| 8,2 | 8,2 | - | - | - |
| - | - | 7,8 | 7,8 | 7,8 |
| 6,9 | 6,9 | - | - | - |
| - | - | 5,4 | 5,4 | 5,4 |
| 5,1 | 5,1 | 5,1 | 5,1 | 5,1 |
| - | - | 4,2 | 4,2 | 4,2 |
| 3,5 | 3,5 | - | - | - |
| 3,4 | 3,4 | 3,4 | 3,4 | 3,4 |
| 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 |
| 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 |
| 1,6 | 1,6 | - | - | - |
| | | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 59,3 | 59,3 | 57,9 | 57,9 | 57,9 |

(b) Größe der Einzelfragmente in kb nach PstI-Spaltung (in kb)

| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| (12) | (12) | - | - | - |
| 9,5 | 9,5 | - | - | - |
| 2,0 | 2,0 | - | - | 2,0 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 51,5 | 51,5 | 28 | 28 | 30 |

Die in Klammern gesetzten Werte geben Minorbanden an.

(c) Größe der Einzelfragmente in kb nach PvuII-Spaltung (in kb)

| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 3,3 | 3,3 | - | - | - |
| - | - | 2,9 | 2,9 | 2,9 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 33,3 | 33,3 | 32,9 | 32,9 | 32,9 |

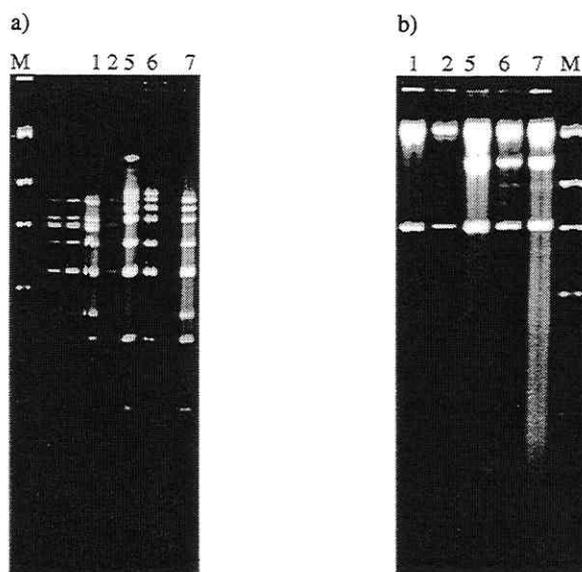


Abbildung 23: Spaltung der Acm-DNA mit den Restriktionsendonucleasen BglII (a) und SalGI (b) [M=Marker 1; 1=Acm1; 2=Acm2; 5=Acm5; 6=Acm6; 7=Acm7]

Tabelle 13: Größe der Einzelfragmente nach BglII-Spaltung (a) und SalGI-Spaltung (b)

| (a) Größe der Einzelfragmente nach BglII-Spaltung (in kb) | | | | |
|---|--------|-------|-------|-------|
| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| - | - | 7,9 | 7,9 | 7,8 |
| 7,6 | 7,6 | - | - | - |
| - | - | 7,2 | 7,2 | 7,2 |
| 6,6 | 6,6 | 6,6 | 6,6 | 6,6 |
| 6,2 Db | 6,2 Db | - | - | - |
| 5,6 | 5,6 | 5,7 | 5,7 | 5,6 |
| 4,8 | 4,8 | 4,8 | 4,8 | 4,8 |
| 3,8 | 3,8 | - | - | 3,8 |
| 3,3 | 3,3 | 3,3 | 3,3 | 3,3 |
| 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 40,1 | 40,1 | 37,7 | 37,7 | 41,3 |

Db - vermutete Doppelbande

(b) Größe der Einzelfragmente nach SalGI-Spaltung (in kb)

| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| - | - | 11,6 | 11,6 | 11,6 |
| - | - | - | (9,3) | (9,3) |
| 6,6 | 6,6 | 6,7 | 6,7 | 6,7 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 31,6 | 31,6 | 43,3 | 52,6 | 52,6 |

Die in Klammern gesetzte Werte geben Minorbanden an.

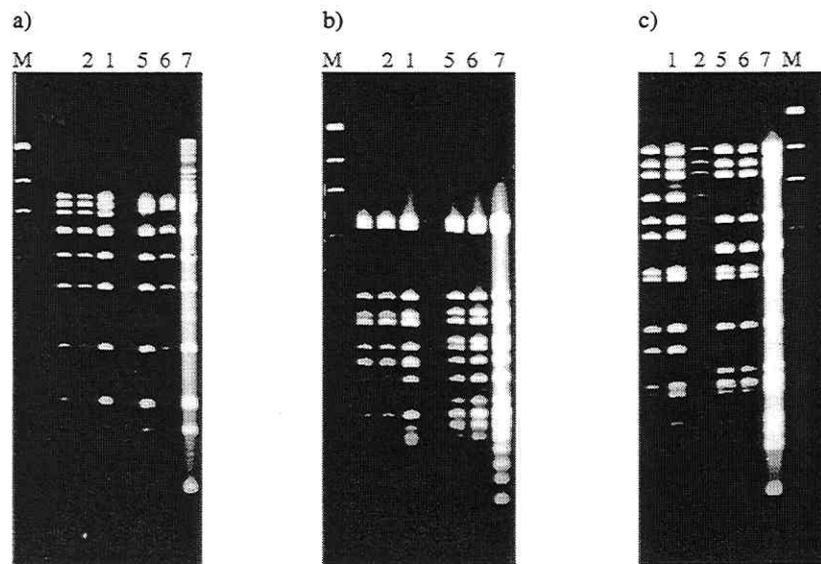


Abbildung 24: Spaltung der Acm-DNA mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI* (a), *EcoRV* (b) und *ClaI* (c)

[M=Marker 1; 1=Acm1; 2=Acm2; 5=Acm5; 6=Acm6; 7=Acm7]

Tabelle 14: Vergleich der Größe der Einzelfragmente nach EcoRI- (a), EcoRV- (b) und ClaI-Spaltung (c)

| (a) Größe der Einzelfragmente nach EcoRI-Spaltung (in kb) | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| 7,2 | 7,2 | - | - | nicht bestimmt (n.b.) |
| 6,6 | 6,6 | 6,6 Db | 6,6 Db | n.b. |
| 6,2 | 6,2 | - | - | n.b. |
| - | - | 6,0 | 6,0 | n.b. |
| 5,4 | 5,4 | - | - | n.b. |
| - | - | 5,2 | 5,2 | n.b. |
| 4,5 | 4,5 | - | - | n.b. |
| - | - | 4,3 | 4,3 | n.b. |
| 3,5 | 3,5 | 3,4 | 3,4 | n.b. |
| 2,26 | 2,26 | 2,15 | 2,15 | n.b. |
| 1,55 | 1,55 | 1,42 | 1,42 | n.b. |
| 1,22 | 1,22 | 1,17 | 1,17 | n.b. |
| 0,8 | 0,8 | 0,78 | 0,78 | n.b. |
| Summe | Summe | Summe | Summe | |
| 39,23 | 39,23 | 31,02 | 31,02 | |

| (b) Größe der Einzelfragmente nach EcoR V-Spaltung (in kb) | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| 5,0 | 5,0 | 5,0 Db | 5,0 Db | 5,0 Db |
| 4,7 | 4,7 | - | - | - |
| 2,75 | 2,75 | 2,7 | 2,7 | 2,7 |
| 2,45 | 2,45 | 2,45 | 2,45 | 2,45 |
| - | - | 2,25 | 2,25 | 2,25 |
| 2,32 | 2,32 | - | - | - |
| - | - | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| 1,85 | 1,85 | 1,85 | 1,85 | 1,85 |
| 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 | 1,65 |
| 1,45 | 1,45 | 1,45 | 1,45 | 1,45 |
| - | - | 1,15 | 1,15 | 1,15 |
| 1,1 | 1,1 | 1,07 | 1,07 | 1,07 |
| 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| - | - | 0,83 | 0,83 | 0,83 |
| 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| 0,66 | 0,66 | 0,64 | 0,64 | 0,64 |
| 0,56 | 0,56 | 0,56 | 0,56 | 0,56 |
| 0,46 | 0,46 | - | - | 0,49 |
| | | | | 0,4 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 26,6 | 26,6 | 25,25 | 25,25 | 27,29 |

(c) Größe der Einzelfragmente nach ClaI-Spaltung (in kb)

| Acm1 | Acm2 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 |
| 6,4 | 6,4 | 6,2 | 6,2 | 6,2 |
| 5,4 | 5,4 | - | - | - |
| 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 |
| 4,0 | 4,0 | (4,1) | (4,1) | ? |
| - | - | 3,7 | 3,7 | 3,7 |
| 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 |
| 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,1 |
| 1,75 | 1,75 | - | - | - |
| - | - | 1,45 | 1,45 | 1,45 |
| 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
| 1,35 | 1,35 | 1,35 | 1,35 | 1,35 |
| 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| - | - | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 | 0,86 |
| 0,64 | 0,64 | 0,64 | 0,64 | 0,64 |
| Summe | Summe | Summe | Summe | Summe |
| 42,5 | 42,5 | 41,4 | 41,4 | 37,3 |

Die in Klammern gesetzte Werte geben Minorbanden an.

Db - vermutete Doppelbande

3.1.5.2.2 Genomgröße

Restriktionsfragmentsummierung

Aus der Summe der Größen der Einzelfragmente wurde die Größe des jeweiligen Gesamtgenoms bestimmt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Gesamtgröße der Acm-Genome als Summe der Größe der Restriktionsfragmente

| Phagen- DNA | Enzyme mit wenigen Schnittstellen | | | Enzyme mit vielen Schnittstellen | | | | |
|----------------|-----------------------------------|-------|-------|----------------------------------|-------|------|-------|---------|
| | PstI | PvuII | SalGI | EcoRI | EcoRV | ClaI | BglII | HindIII |
| Acm1 | 51,5 | 33,3 | 31,6 | 39,23 | 26,6 | 42,5 | 40,1 | 59,3 |
| Acm2 | 51,5 | 33,3 | 31,6 | 39,23 | 26,6 | 42,5 | 40,1 | 59,3 |
| Acm5 | 28,0 | 32,9 | 43,3 | 31,02 | 25,25 | 41,4 | 37,7 | 57,9 |
| Acm6 | 28,0 | 32,9 | 52,6 | 31,02 | 25,25 | 41,4 | 37,7 | 57,9 |
| Acm7 | 30,0 | 32,9 | 52,6 | n.b. | 27,29 | 37,3 | 41,3 | 57,9 |

Die Größen der Phagen Genome variieren drastisch (Tabelle 15). Das betrifft sowohl die Spaltungen der 5 Phagen Genome mit je einem Enzym, was zunächst auf gravierende Unterschiede zwischen den Phagen hindeuten sollte, als auch die Restriktionsspaltungen eines Phagen Genoms mit den verschiedenen Enzymen. Das zeigt die Fehlerhaftigkeit der ersten Annahme und erfordert weitere Analysen.

Eine zuverlässige Bestimmung der durchschnittlichen Gesamtgröße der Phagen Genome aus den einzelnen Restriktionsendonuclease-Spaltungen ist also nicht möglich. Allerdings könnten die mit HindIII ermittelten Maximalwerte ein Anhaltspunkt für die Mindestgröße der Acm-Genome sein.

Mehrfachspaltungen der DNA des Phagen Acm1

Restriktionskarten von kleinen Genomen wie Plasmiden und Bakteriophagen lassen sich prinzipiell durch Vergleiche von Einfach- und Mehrfachspaltungen dieser DNA mit selten schneidenden Enzymen erstellen. Wie zuvor gezeigt, erfüllen die Restriktionsendonucleasen PstI, PvuII und SalGI diese Bedingungen für die Spaltung von Acm-DNA.

Die Ergebnisse der Einfach- und Mehrfachspaltungen der DNA des Phagen Acm1 sind in Abbildung 25 dargestellt.

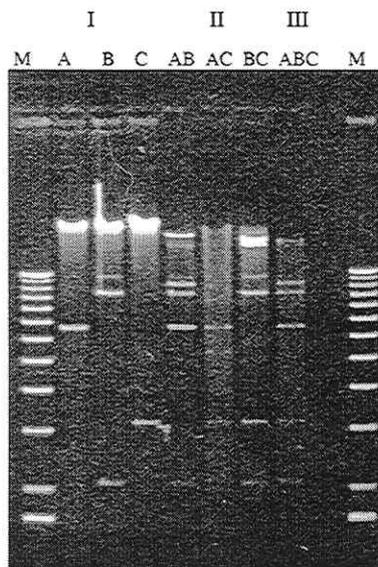


Abbildung 25: Spaltung von *Acml*-DNA mit den Restriktionsendonucleasen *SalGI* (A), *PstI* (B) und *PvuII* (C)
 M=Marker 2; I = Einzelspaltungen; II = Doppelspaltungen; III = Dreifachspaltung

Aus den Laufstrecken der Fragmente konnten folgende Fragmentgrößen bestimmt werden (Tabelle 16):

Tabelle 16: Größe der Fragmente nach Einzel- und Mehrfachspaltungen von DNA des Phagen

Acml

| SalG I | Pst I | Pvu II | Sal/Pst/Pvu |
|---------------|--------------|---------------|--------------------|
| 25 | 28 | 30 | 18,5 |
| | 12 (Minor) | | 12 (Minor) |
| | 9,5 | | 11 |
| 6,6 | | | 9,5 |
| | | 3,3 | 6,6 |
| | 2 | | 3,3 |
| | | | 2 |
| Summe | Summe | Summe | Summe |
| 31,6 | 51,5 | 33,3 | 62,9 |

Die Summierung der Einzelfragmente nach Mehrfachspaltung mit SalGI, PstI und PvuII ergibt ein wesentlich höhere Genomgröße als die durch Einzelverdau gewonnenen Werte, korreliert aber gut mit der durch HindIII-Einzelspaltung ermittelten Gesamtgröße von 59,3 kb. Das läßt den Verdacht auf Dopplung von Fragmenten in der Einzelspaltung zu.

Folgt man dieser Überlegung, sollten beide Fragmente der SalGI-Spaltung als Doppelbanden vorliegen, die Summe der Einzelfragmente würde dann einen Wert von 63,2 kb ergeben.

Anders verhält es sich bei der PstI-Spaltung. Hier könnte ein 28 kb Fragment neben Doppelbanden von 9,5 und 2 kb und einer als Minorbande von 12 kb bestimmten Einzelbande nach Spaltung vorliegen. Die Summe der so zugeordneten Einzelfragmente ergibt wiederum einen Gesamtwert von 63 kb.

Für die PvuII-Spaltung würde sich dann als logische Konsequenz ein 30 kb großes Doppel-Fragment und eine 3,3 kb großes Einzelfragment mit ebenfalls 63,3 kb Gesamtgröße errechnen. Eine Restriktionskarte für den Phagen Acml ließ sich auch unter Berücksichtigung der oben postulierten Dopplungen nicht erstellen. Die 12; 9,5; 6,6; 3,3 und 2 kb großen Fragmente der Einzelspaltungen erscheinen unverändert in der Mehrfachspaltung, so daß eine weitere Zuordnung der Fragmente zu einer Restriktionskarte nicht möglich ist.

Direkte Längenmessungen der Phagen-DNA mittels Elektronenmikroskopie

Die Relevanz der ermittelten Molekulargewichte der Acml-Phagen durch Restriktionsspaltung wurde für den Phagen Acml durch Längenmessung der Genome mittels Elektronenmikroskopie überprüft. 5 Genome der gespreiteten DNA, beispielhaft für Acml in Abbildung 26 gezeigt, wurden vermessen und anhand der Standards pBR322 und M13 die jeweiligen Genomgrößen bestimmt (Tabelle 17).

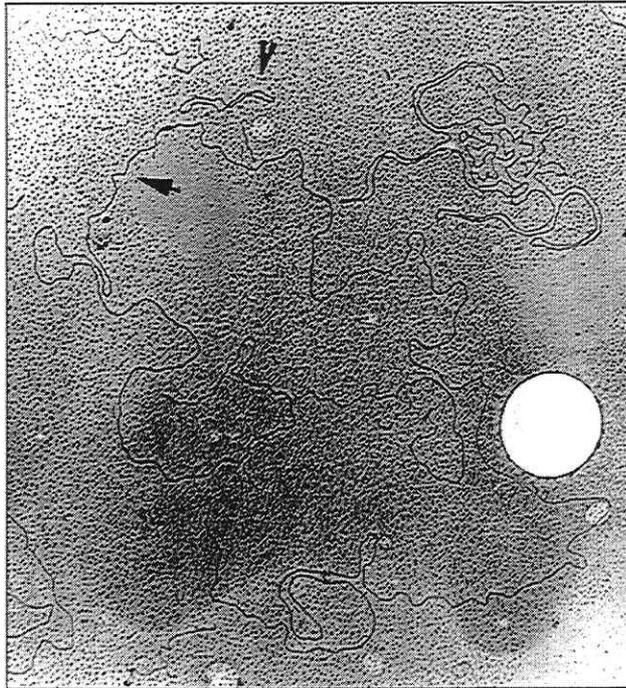


Abbildung 26: Lineares AcM1-Genom (Pfeil) und zirkuläres pBR322-DNA (Pfeil) als Referenz nach Spreitung.

Tabelle 17: Größe der AcM1-Genome, ermittelt durch Längenmessung der DNA

| Genom | Größe (kb) | Mittelwert (kb) |
|-------|------------|-----------------|
| 1 | 66,8 | |
| 2 | 63,9 | |
| 3 | 59,5 | 63,6 |
| 4 | 62,5 | |
| 5 | 65,1 | |

Die durchschnittliche Größe der DNA des Phagen AcM1, ermittelt durch direkte Längenmessung, beträgt 63,6 kb. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit der durch Hind III-Spaltung ermittelten Genomgröße des Phagen AcM1 von 59,3 kb und der durch Mehrfachspaltung bestimmten Größe von 62,9 kb.

Da die Größen der anderen AcM-Phagen nach Restriktionsanalyse nur geringfügig differieren, ist auch für die anderen AcM-Phagen von dieser Genomgröße auszugehen.

Zusätzlich zur Längenmessung wurde auch die Struktur der DNA des Phagen Acm1 aufgeklärt. Homoduplexmoleküle der DNA dieses Phagen wurden auf das Vorkommen von einsträngigen Enden untersucht (Abbildung 27).

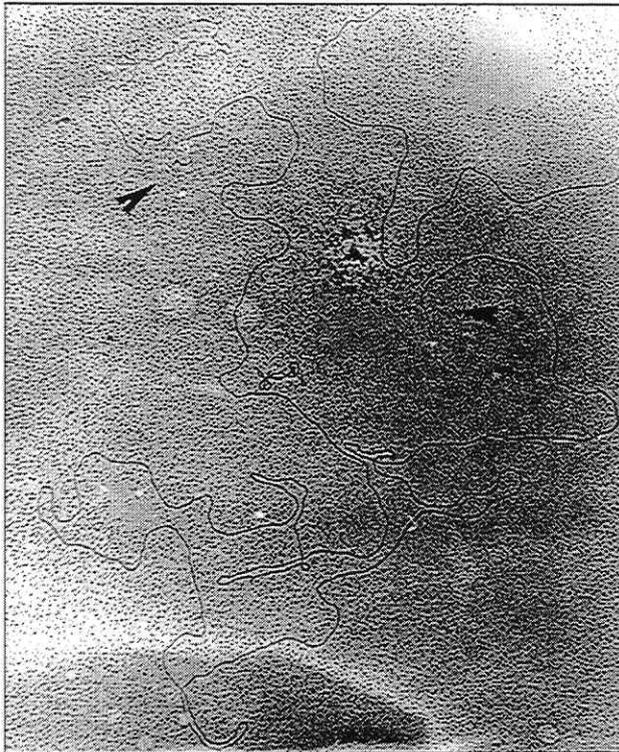


Abbildung 27: Homoduplices von Acm1-DNA mit einsträngigen Enden (mit Pfeil markiert).

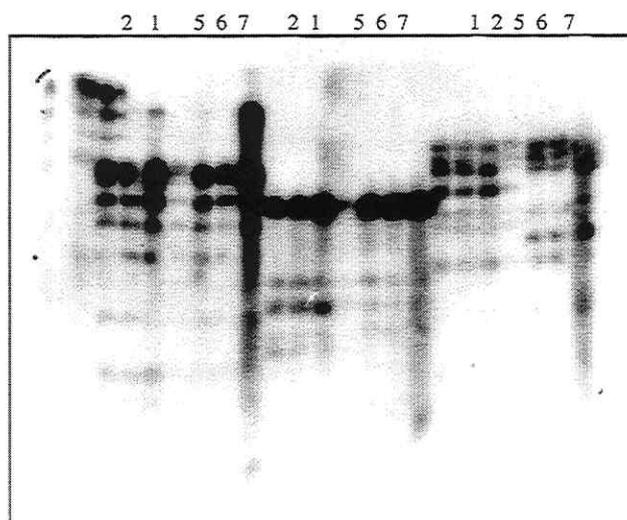
Im Vergleich mit der Spreitung ohne Homoduplexbildung (Abbildung 26) ergab die Auswertung, daß die Acm1-Homoduplices an beiden Seiten kurze einsträngige Bereiche aufweisen (durch Pfeile gekennzeichnet). Diese bei geschwänzten Phagen häufig auftretenden terminalen Wiederholungen können zwischen 0,7 und 12% der Größe des Gesamtgenoms betreffen (Ackermann and DuBow, 1987). Für die DNA der Acm-Phagen wären somit 1 bis 7 kb des Gesamtgenoms als Wiederholungen zu betrachten. Da auch in diesen Bereichen Restriktionsschnittstellen liegen, könnte terminale Redundanz ein weiterer Grund für die Entstehung von Minorbanden sein und auch eine weitere Ursache für die Schwierigkeiten bei der Erstellung von Restriktionskarten darstellen.

Das Auftreten von einsträngigen Enden ist zudem ein Anhaltspunkt für die Art der Verpackung der Phagen-DNA. Sie sollte beim Acm1-Phagen durch den Kopfvoll-Mechanismus erfolgen (Streisinger et al., 1967).

3.1.5.2.3 Homologien zwischen den Nukleinsäuren der Acm-Phagen

Nachdem die DNA des Phagen Acm1 gut untersucht war, galt es zu klären, wie nahe verwandt die Acm-Phagen tatsächlich sind und ob die Unterschiede in den Restriktionsmustern auf heterologe Bereiche zwischen den Genomen dieser Phagen hinweisen. Für den direkten Nachweis der Verwandtschaft der untersuchten Phagen wurde deshalb die Methode der DNA-DNA-Hybridisierung mit ^{32}P -markierter Phagen-DNA angewandt. Als Sonde wurde sowohl DNA des Phagen Acm1 als auch des Phagen Acm6 (nach Restriktionsmustern und Serologie mit den größten Unterschieden zu Acm1) eingesetzt. Die bereits vorgestellten Spaltungen der DNA aller 5 Acm-Phagen mit EcoRI, EcoRV und ClaI (vergleiche Abbildung 24) wurden als Zielsequenzen ausgewählt und mit beiden Sonden hybridisiert (Abbildung 28 a, b).

a)



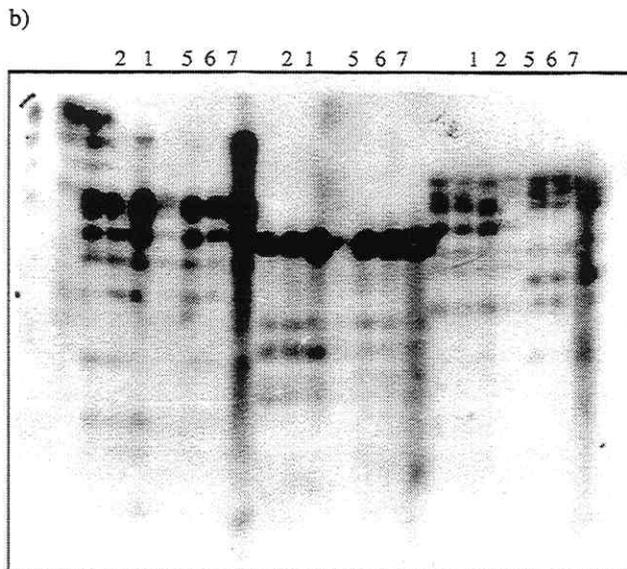


Abbildung 28: Hybridisierungsmuster gesplittener DNA der 5 Acm-Phagen mit ^{32}P -markierter Acm1-DNA (a) und Acm6-DNA (b) [1=Acm1; 2=Acm2; 5=Acm5; 6=Acm6; 7=Acm7]

Der Vergleich der 3 Spaltmuster der Phagen-DNA mit den Hybridisierungsmustern läßt erkennen :

- Die Hybridisierungsmuster der gesplittener DNA der 5 Phagen mit markierter Acm1- und Acm6-DNA sind identisch.
- Die Hybridisierungsmuster der EcoRI-Splattungen waren vollständig auswertbar, alle 10 Fragmente (Acm1; Acm2) bzw. 9 Fragmente (Acm5; Acm6; Acm7) paaren mit beiden Sonden.
- Die Fragmente der EcoRV Splattungen hybridisieren ebenfalls mit beiden Sonden gleich stark, allerdings lassen sich aufgrund der Auflösbarkeit der Hybridisierungssignale für die kleinen Fragmente <1 kb keine Aussagen mehr treffen.
- Auch die Fragmente der ClaI-Splattungen geben mit beiden Sonden identische Signale. Die Auswertung erlaubt allerdings ebenfalls nur einen Homologievergleich bis zu 1,1 kb.

Damit konnte nachgewiesen werden, daß die DNA aller 5 Acm-Phagen keine zur DNA der Phagen Acm1 und Acm6 heterologen Bereiche in der Größe der untersuchten Restriktionsfragmente aufweist (bis 1 kb). Die markierte DNA beider Phagen paart vollständig mit den Restriktionsfragmenten der DNA der anderen Phagen. Restriktionsfragmente mit

veränderter Laufstrecke (siehe dazu Tabelle 14) hybridisieren ebenfalls mit beiden Sonden, so daß auch hier keine heterologen Bereiche in Größe der Fragmente vorliegen.

3.1.5.3 Zusammenfassung

- Die Zusammensetzung der Hüllproteine der Acm-Phagen ist sehr ähnlich, aber nicht identisch, jeder Acm-Phage hat einige Polypeptide, die ihn charakterisieren. Acm1 und Acm2 sind sich sehr ähnlich; Acm5, Acm6 und Acm7 sind sich ebenfalls sehr ähnlich mit deutlichen Unterschieden zu Acm1 und weniger gravierenden Unterschieden zu Acm2.
- Auch die Muster der Restriktionsanalysen sind gleichfalls sehr ähnlich, aber nicht immer identisch (Ausnahme Acm1 und Acm2 mit völliger Übereinstimmung). Acm5 und Acm6 differieren nur in einer Minorbande der SalGI-Spaltung, Acm7 weicht von beiden Phagen in der PstI- und BglII-Spaltung mit je 1 Bande ab, die sich mit dem Muster des Acm1/Acm2 deckt; Spaltungen von DNA der Phagen Acm1 und Acm2 sind untereinander zwar identisch, aber verschieden von Acm5, Acm6 und Acm7.
- Die Genomgrößen der Acm-Phagen nach Summierung der Einzelfragmente betragen für alle Phagen 30 bis 60 kb.
- Mehrfachspaltungen der Acm1-DNA bestätigten die Genomgröße von ca. 60 kb.
- Direkte Längenmessungen der Acm1-DNA ergaben eine Größe von 63,6 kb.
- Homoduplices der Acm1-DNA zeigen einsträngige Enden und belegen zirkuläre Permutation bei terminaler Redundanz.
- Die Genome der 5 Phagen sind zur DNA der Phagen Acm1 und Acm6 vollständig homolog.

3.2 Lysogenie bei *Acetobacter methanolicus*

3.2.1 Mikrobiologischer Nachweis induzierter Phagen

Die Mitomycin C-induzierten Proben der *Acetobacter methanolicus*-Stämme zeigten durchweg im Tropftest sowohl gegen die Herkunftkultur als auch gegen alle anderen in 2.1.1 aufgeführten *A. methanolicus*-Stämme keine konfluente Lyse oder Plaquebildung. Allerdings waren schwache Aufhellungen des Indikatorrasens im Tropfenbereich zu beobachten, wie sie für inkomplette Phagen oder Bacteriocine beschrieben sind (Bradley, 1967).

Somit waren aus den untersuchten Stämmen keine Phagen freizusetzen, die sich auf den einbezogenen Stämmen vermehren konnten.

3.2.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Phagenpartikeln

Die gewonnenen Überstände wurden trotz des Negativergebnisses aus 3.2.1 auf induzierte Partikel untersucht. In konzentrierten Kulturfiltraten aller induzierten *A. methanolicus*-Stämme wurden phagenähnliche Strukturen festgestellt (Abbildung 29 a-l).

Abbildung 29: Mit Mitomycin C induzierte Phagenpartikel aus *A. methanolicus*-Stämmen (a-l)
(Primärvergrößerungen 24 000 fach)

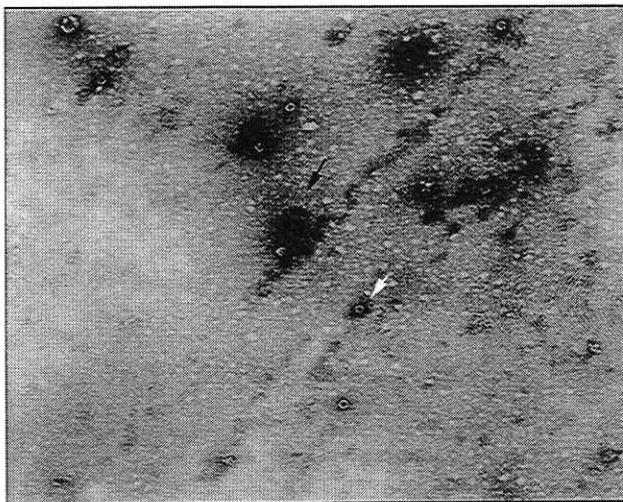


Abb. 29a: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB55;
Morphotyp1 (schwarzer Pfeil); Morphotyp2 (weißer Pfeil)

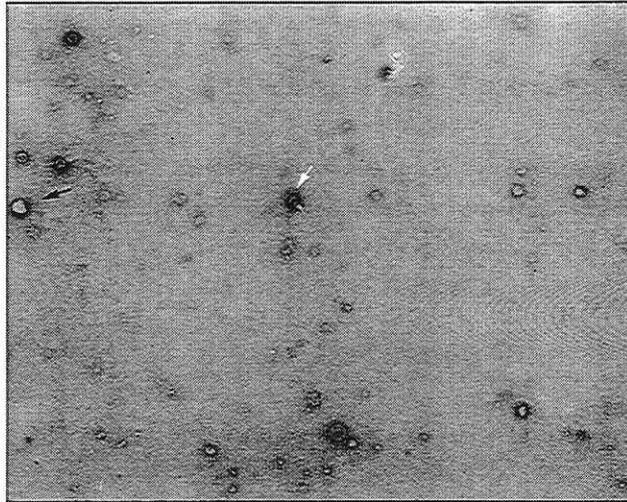


Abb. 29b: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB56;
Morphotyp1 (schwarzer Pfeil); Morphotyp2 (weißer Pfeil)

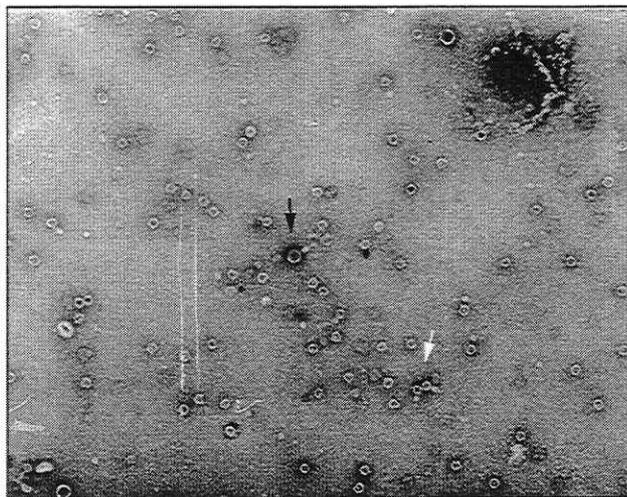


Abb. 29c: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB57;
Morphotyp1 (schwarzer Pfeil); Morphotyp2 (weißer Pfeil)

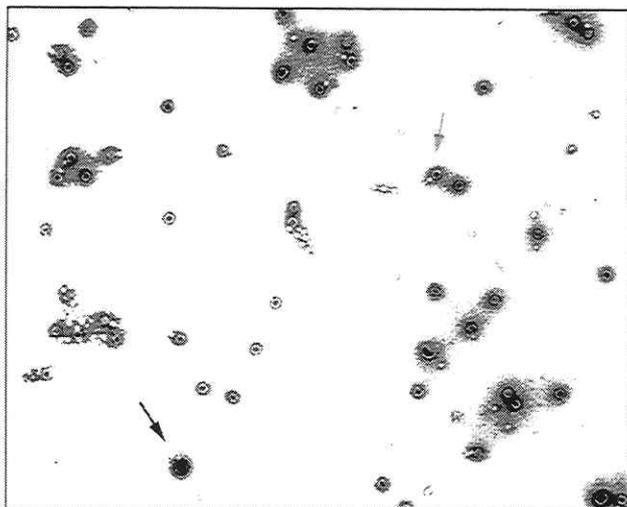


Abb. 29d: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB58;
Morphotyp1 (schwarzer Pfeil); Morphotyp2 (weißer Pfeil)

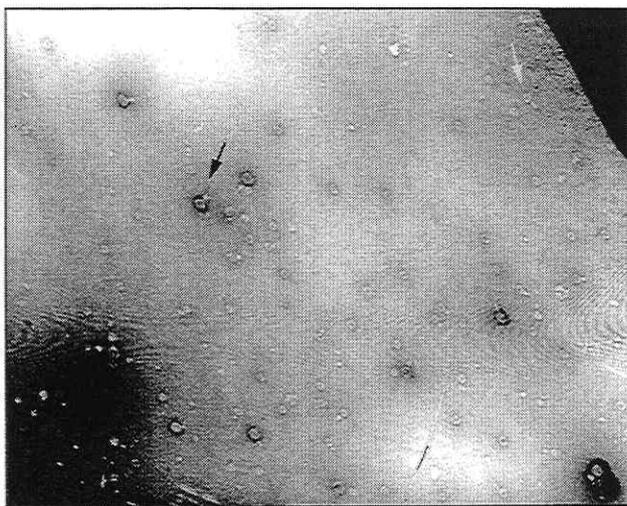


Abb. 29e: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB59;
Morphotyp1 (schwarzer Pfeil); Morphotyp2 (weißer Pfeil)

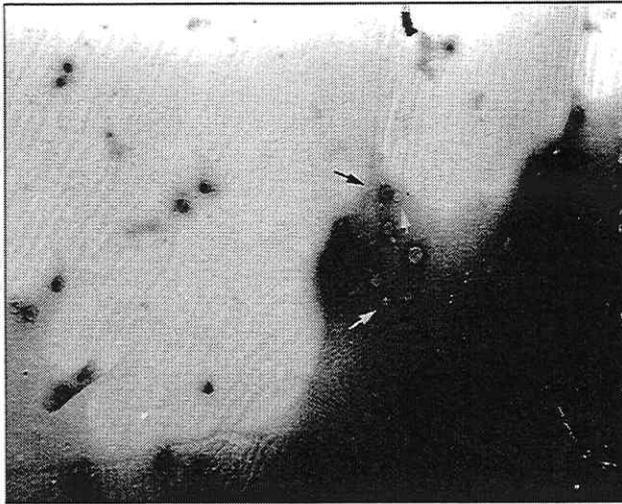


Abb. 29f: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB60;
Morphotyp1 (schwarzer Pfeil); Morphotyp2 (weißer Pfeil)

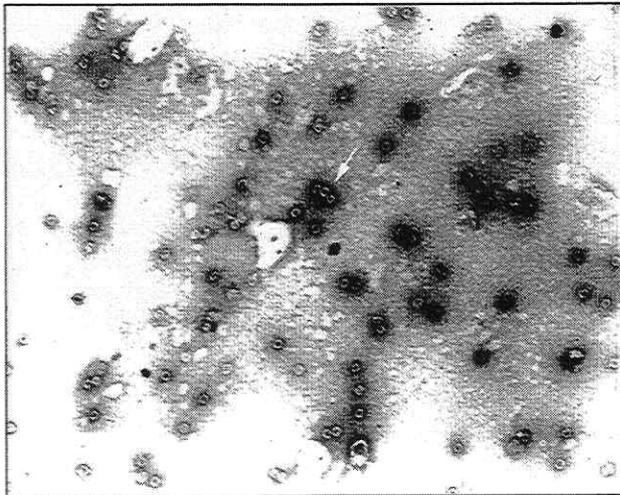


Abb. 29g: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB58/4;
Morphotyp2 (weißer Pfeil)

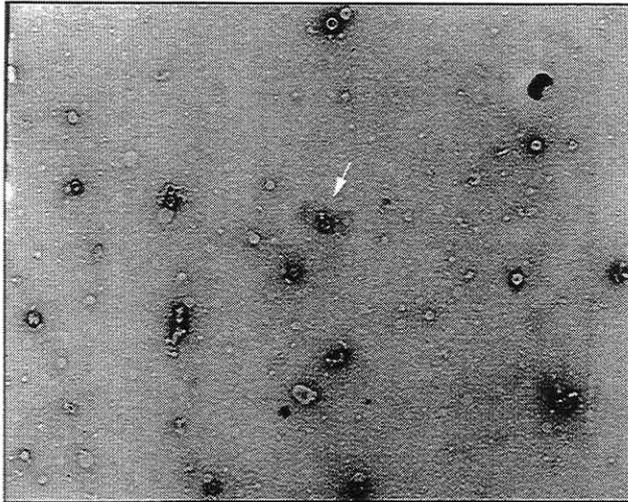


Abb. 29h: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB58/10;
Morphotyp2 (weißer Pfeil)

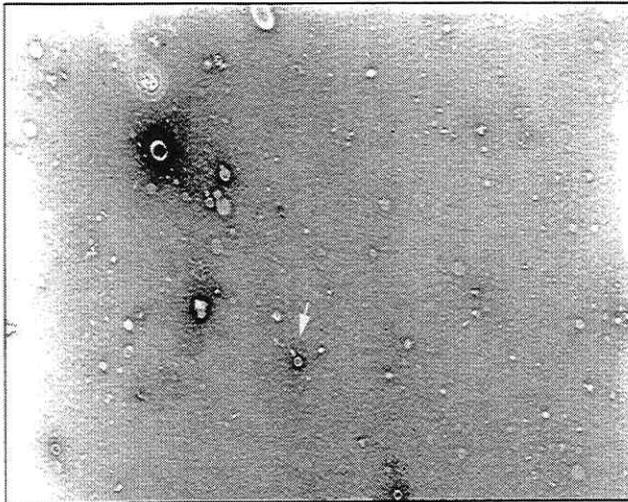


Abb. 29i: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB70;
Morphotyp2 (weißer Pfeil)

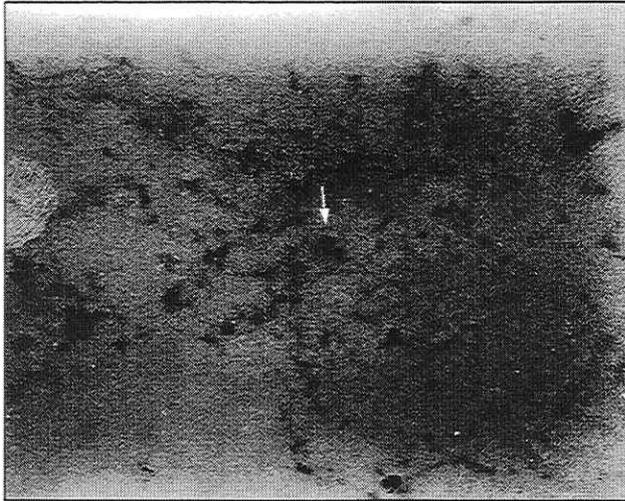


Abb. 29k: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB129;
Morphotyp2 (weißer Pfeil)

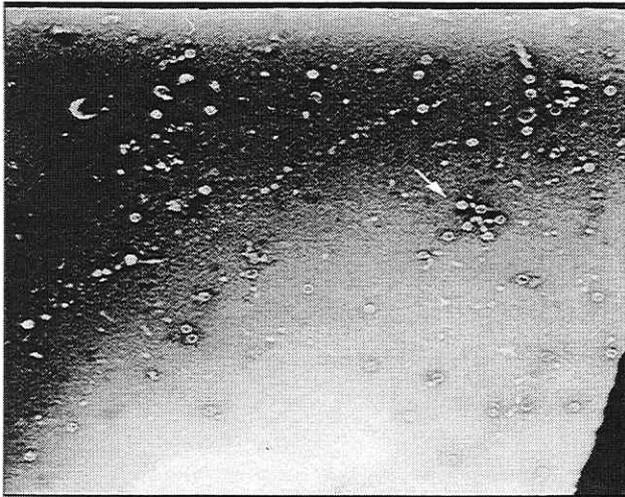


Abb. 29l: Induzierte Partikel aus *A. methanolicus* MB135;
Morphotyp2 (weißer Pfeil)

Anhand struktureller Vergleiche lassen sich 2 Morphotypen unterscheiden. Morphotyp1 ist ein großer Phage, der eine kontraktile Schwanzscheide und eine Basalplatte besitzt. Dieser Morphotyp ähnelt sehr den bisher beschriebenen Acm-Phagen. Morphotyp2 hat einen deutlich kleineren Kopf, die Schwanzstrukturen sind ebenfalls kontraktile, es treten allerdings auch viele

inkomplette Köpfe auf. Tabelle 18 zeigt die Zuordnung der Morphotypen zu den untersuchten *A. methanolicus*-Stämmen.

Tabelle 18: Zuordnung der induzierten Morphotypen zu den *A. methanolicus* Stämmen

| Morphotyp1 | Morphotyp2 |
|------------|------------|
| MB55 | MB55 |
| MB56 | MB56 |
| MB57 | MB57 |
| MB58 | MB58 |
| MB59 | MB59 |
| MB60 | MB60 |
| - | MB58/4 |
| - | MB58/10 |
| - | MB70 |
| - | MB129 |
| - | MB135 |

Interessant ist, daß alle Wirte für die Acm-Phagen den Morphotyp2, aber nicht den Morphotyp1 freisetzen. Auch aus dem phagenresistenten Stamm *A. methanolicus* MB135 wurde nur der Morphotyp2 induziert. Dieser Stamm trägt noch ein Plasmid, wie Jorks (pers. Mitteilung) zeigen konnte. Aus dem phagenresistenten Ausgangsstamm *A. methanolicus* MB58 dagegen werden beide Morphotypen freigesetzt.

Auch *Acetobacter methanolicus*-Stämme, die aus anderen Habitaten stammen (2.1.1) setzen den Morphotyp2 frei (MB55, MB56, MB57, MB59, MB60), tragen aber außerdem einen zum Morphotyp1 gehörenden weiteren Prophagen.

Versuche zur Isolation von DNA aus den induzierten Partikeln waren nicht erfolgreich, so daß die Phagen vom Morphotyp1 und Morphotyp2 weder untereinander, noch mit den Acm-Phagen auf Homologien ihrer DNA verglichen werden konnten.

3.2.3 Homologie zwischen Phagen-Genom und Chromosomen der *A. methanolicus*-Stämme

Abbildung 30a zeigt das Ergebnis der HindIII-Spaltung der chromosomalen DNA der *A. methanolicus*-Stämme MB55, MB56, MB58, MB58/4, MB58/10, MB59, MB60, MB70, MB129 und MB135 nach gelelektrophoretischer Trennung. Die DNA ist vollständig verdaut.

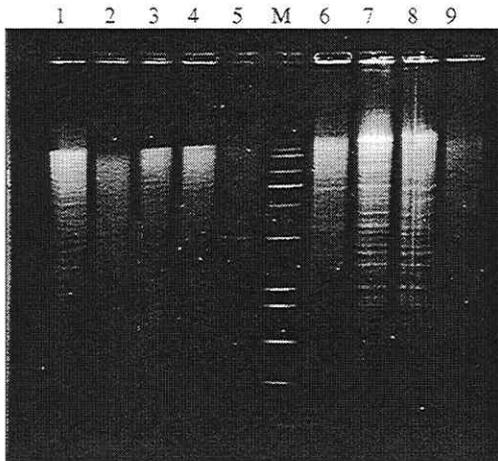


Abb 30a: Chromosomale DNA (mit HindIII gespalten) der *A. methanolicus*-Stämme MB58 (1), MB58/4 (2), MB58/10 (3), MB70 (4), MB129 (5), Raoul-Marker (M), MB55 (6), MB56 (7), MB60 (8), MB135 (9).

In Abbildung 30b sind die Ergebnisse nach Hybridisierung mit DIG-markierter *Acm1*-DNA dargestellt.

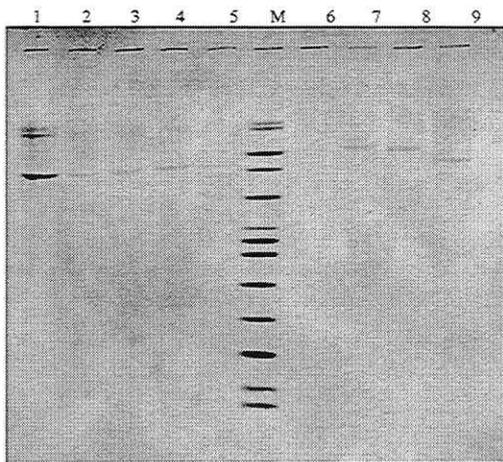


Abbildung 30b: Homologien zwischen *Acm1*-DNA und chromosomaler DNA der *A. methanolicus*-Stämme aus Abb. 30a [1=MB58, 2=MB58/4, 3=MB58/10, 4=MB70, 5=MB135, 6=MB55, 7=MB56, 8=MB60, 9=MB129, M=Raoul-Marker] nach Hybridisierung mit DIG-markierter *Acm1*-DNA

Es zeigte sich, daß es Differenzen in den Hybridisierungsmustern der einzelnen Stämme gibt. Es lassen sich 2 Gruppen herausstellen. Während die Stämme *A. methanolicus* MB55, MB56 und MB60 der Gruppe I angehören, die mit *Acm1*-DNA ein einzelnes Hybridisierungssignal mit einem 9,2 kb großen Fragment gibt, hybridisiert die DNA des *Acm1*-Phagen mit 3 Banden (18,5; 14,9 und 7,4 kb [= 40,8 kb]) der chromosomalen DNA der *A. methanolicus*-Stämme MB58, MB58/4, MB58/10, MB70, MB129 und MB135. Drei der 5 Stämme sind die Wirtsstämme der *Acm*-Phagen und beherbergen, wie zuvor gezeigt, einen Prophagen vom Morphotyp2, nicht aber den Morphotyp1. Die zwei *Acm*-resistenten Stämme dieser Gruppierung tragen entweder noch einen weiteren Prophagen (MB58; Tabelle 18) oder ein Plasmid (MB135; Jorks, pers. Mitteilung), welche die *Acm*-Propagation in diesen Stämmen behindern könnte.

3.2.4 Zusammenfassung

- Alle untersuchten *A. methanolicus*-Stämme setzen nach MC-Induktion Phagenpartikel frei, die sich auf keinem der Stämme vermehren.
- Zwei Morphotypen wurden unterschieden; Acm-sensitive Stämme (und MB135) setzen nur den Morphotyp2 frei, Acm-resistente Stämme setzen Morphotyp1 und Morphotyp2 frei.
- Die chromosomale DNA der *A. methanolicus*-Stämme weist Homologien mit Acm1-DNA auf; Stämme der „MB58-Gruppe“ hybridisieren mit 3 Banden von insgesamt 40 kb, andere Stämme mit 1 Bande von 9 kb.

3.3 Gentransfer im System *Acetobacter methanolicus*/ Acm-Phagen

3.3.1 Transduktion

3.3.1.1 Auswahl geeigneter Rezipientenstämme

Aus einer Kollektion von Auxotrophiemutanten, die nach Kombination von UV-Exposition und MNNG-Behandlung gewonnen wurden (Sydow, 1985), konnten 6 Stämme anhand ihrer Reversionsrate zur Prototrophie (R) und Plattierungseffektivität (EOP) ausgewählt werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht über Plattierungseffektivität EOP und spontane Reversionshäufigkeit zur Prototrophie R ausgewählter Mutanten von *A. methanolicus* MB 58/4

| Stamm | Marker | EOP | R |
|-------------|------------------|------|----------------------|
| MB 58/4-3 | Met ⁻ | 1 | 2,5x10 ⁻⁹ |
| MB 58/4-77 | Arg ⁻ | 0,47 | 7,4x10 ⁻⁹ |
| MB 58/4-100 | His ⁻ | 1,1 | 4,0x10 ⁻⁸ |
| MB 58/4-101 | His ⁻ | 1,1 | 5,0x10 ⁻⁹ |
| MB 58/4-116 | Leu ⁻ | 0,11 | 5,0x10 ⁻⁹ |
| MB 58/4-134 | Tyr ⁻ | 0,15 | 7,0x10 ⁻⁹ |

R: Quotient aus der Anzahl koloniebildender Einheiten unter restriktiven Bedingungen und der Anzahl koloniebildender Einheiten unter permissiven Bedingungen

EOP: Quotient aus dem Phagentiter eines Ausgangslysates, ermittelt auf einer Mutante und dem Phagentiter desselben Lysates auf dem Wildtyp

Alle Stämme wiesen eine genügend hohe Stabilität der Marker auf. Die Plattierungseffektivitäten dagegen differierten. Für die Optimierung der Versuchsbedingungen wurde zunächst eine der 3 Mutanten mit hoher EOP gewählt. Da *A. methanolicus* MB58/4-101 zudem noch ein mit dem Wildtyp identisches Wachstumsverhalten zeigte, wurde diesem Stamm trotz der geringfügig höheren Reversionsrate der Vorzug gegeben.

3.3.1.2 Transduktion nach Standardprozedur

Mittels Standardmethode wurden Phagenrohlysate im Multiplizitätsspektrum MOI=8,9; 4,4; 2,2; 0,89; 0,4 und 0,2 getestet. Es konnten für alle 6 Rezipientenstämme (Tabelle 19) keine Transduktanten nachgewiesen werden.

3.3.1.3 Optimierung der Transduktion mit dem Rezipientenstamm MB 58/4-101

3.3.1.3.1 Einfluß von UV-Licht

Die Einwirkung von UV-Licht bewirkt in DNA hauptsächlich die Ausbildung von Pyrimidindimeren. Bei niedrigen Dosen können sie die Aktivierung mehrerer Reparatursysteme mit unterschiedlichen Auswirkungen auf eine Zelle auslösen (Photoreaktivierung; Excisionsreparatur und Rekombinationsreparatur) (Lewin, 1998). Nur die Rekombinationsreparatur hat einen förderlichen Einfluß auf die Höhe der Transduktionsrate (Helling, 1973). Hohe UV-Dosen haben einen letalen Effekt auf lebende Systeme. Das nutzt man, um nichttransduzierende Phagen zu inaktivieren und Sekundärinfektionen der Transduktanten zu reduzieren, vorausgesetzt, die Rezipienten verfügen nicht über ein Photoreaktivierungssystem.

Um den Einfluß von UV-Licht auf das Transduktionssystem zu beurteilen, wurden der Rezipient und der Phage allein und im Transduktionsansatz steigenden UV-Dosen ausgesetzt.

Ausschluß der Photoreaktivierung im Rezipienten *A. methanolicus* 58/4-101

Die Koloniebildungsfähigkeit wurde als Maß für die Inaktivierung durch UV-Licht angesehen. Vom Wildtyp *A. methanolicus* MB58/4 wurde nur der Inaktivierungsverlauf unter Lichteinfluß als Kontrolle aufgenommen. Die Inaktivierung der Mutante MB58/4-101 dagegen wurde sowohl mit und ohne Lichteinfluß betrachtet. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse für beide Stämme dargestellt.

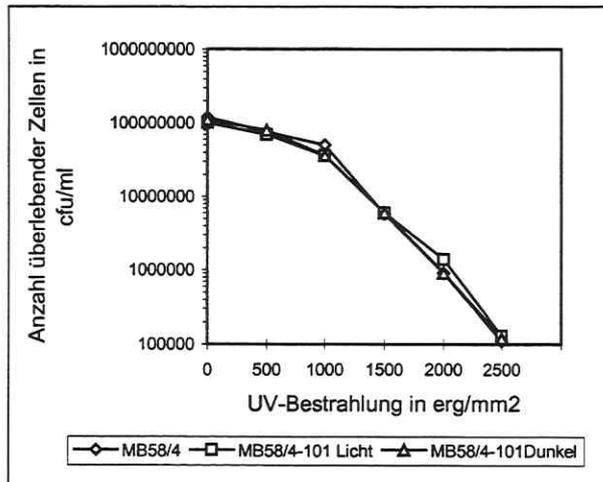


Abbildung 31: Überlebenskurven der Stämme *A. methanolicus* MB58/4 und MB58/4-101 nach UV-Exposition.

Die Überlebenskurve des Wildtypes *A. methanolicus* MB58/4 ist deckungsgleich mit denen des Rezipienten MB58/4-101. Somit hat der Rezipient keine Veränderungen in der UV-Reparatur durch die MNNG-Mutagenese erfahren. Auch die Überlebenskurven für die Mutante mit und ohne Lichteinfluß sind identisch, eine Photoreaktivierung kann ausgeschlossen werden.

UV-Inaktivierung freier Phagen

Die UV-Inaktivierung der Plaquebildung des Phagen Acml ist eine weitere Größe, die zur Ermittlung der Transduktion von Bedeutung ist (Süss, 1981). Den Verlauf der Inaktivierung zeigt Abbildung 32.

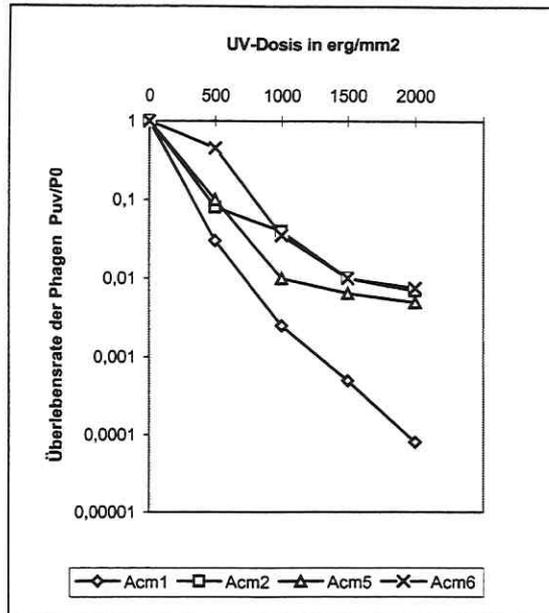


Abbildung 32: Inaktivierung der Phagen Acm1, Acm2, Acm5 und Acm6 durch UV-Licht

Die Inaktivierungskurve des Phagen Acm1 zeigt einen linearen Verlauf. Die zum Vergleich herangezogenen Phagen Acm2, Acm5 und Acm6 werden nicht so stark inaktiviert wie der Phage Acm1. Der Phage Acm1 ist somit von den 4 untersuchten Phagen als am UV-empfindlichsten einzustufen. Bei $2000 \text{ erg}/\text{mm}^2$ wird nur noch eine Überlebensrate von 8×10^{-5} ermittelt. UV-Licht eignet sich somit zur Inaktivierung von Acm1-Phagen.

Transduktionsexperimente unter Einfluß von UV-Licht

Ergebnisse von Transduktionsexperimenten mit Acm1-Lysat, das mit steigenden UV-Dosen bestrahlt wurde, sind in Tabelle 20 dargestellt. Unter diesen Versuchsbedingungen waren erstmals Transduktionsergebnisse nachweisbar.

Tabelle 20: Einfluß der UV-Bestrahlung der Acml-Phagen auf die Höhe der Transduktion des His-Markers

| <u>Bestrahlungsintensität (erg/mm²)</u> | <u>Transduktionseffektivität (EOT)</u> |
|--|---|
| 0 | 0 |
| 500 | 1x10 ⁻⁷ bis 2,5x10 ⁻⁸ |
| 1 000 | 7x10 ⁻⁸ |
| 1 500 | 1,4x10 ⁻⁶ bis 6x10 ⁻⁷ |
| 2 000 | 2,3x10 ⁻⁷ |

Bei einer UV-Dosis von 1500 erg/mm² konnte die höchste EOT ermittelt werden, diese Bestrahlungsintensität wurde daher für alle weiteren Experimente gewählt. Allerdings variierte die Anzahl der Transduktionseignisse innerhalb paralleler Versuchsreihen erheblich.

Eine Kombination der Bestrahlung von Rezipienten und Transduktions-Lysat hatte keinen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der EOT. Es war auch keine Erhöhung der Transduktionsrate zu beobachten, das Gegenteil trat ein, und Transduktionseignisse waren wie bei der Standardprozedur nicht nachweisbar (EOT < R).

Für alle weiteren Transduktionsexperimente wurde deshalb nur das Transduktionslysate mit einer UV-Dosis von 1500 erg/mm² vorbehandelt.

3.3.1.3.2 Erhöhung der Transduktionseffektivität durch Verringerung der Sekundärinfektionen

Die Streuung der ermittelten EOT-Werte war in allen Versuchen sehr groß. Es war deshalb zu prüfen, ob neben der UV-Inaktivierung der Phagen weitere Maßnahmen zur zuverlässigen Verhinderung von Sekundärinfektionen eine Reproduzierbarkeit des EOT-Höchstwertes von 1x10⁻⁶ (vergleiche Tabelle 20) ergeben würde. So wurde geprüft, inwieweit eine Neutralisierung nicht adsorbierter Phagen sowohl im Transduktionsgemisch als auch auf den Transduktionsplatten durch Zusatz von Antiserum gegen den Phagen Acml erreicht werden kann.

Weiterhin wurde die Adsorptionszeit des Phagen Acml an den Rezipienten von 10 min auf 1 min reduziert sowie das Infektionsgemisch vor dem Plattieren auf Standardagarplatten mit dem entsprechenden Medium gewaschen, um freie Phagen zu entfernen.

Mit diesen Maßnahmen konnte der bisher ermittelte Maximalwert für die Transduktionseffektivität von 1×10^{-6} zwar mehrfach bestätigt werden, eine generelle Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Werte war aber nicht zu erreichen.

3.3.1.3.3 Einfluß der Wachstumsphase des Rezipienten auf die Höhe der EOT

Untersucht wurde der Einfluß der Wachstumsphase des Rezipienten *A. methanolicus* MB58/4-101 auf die Effektivität der Transduktion. Abbildung 33 zeigt die Korrelation beider Prozesse.

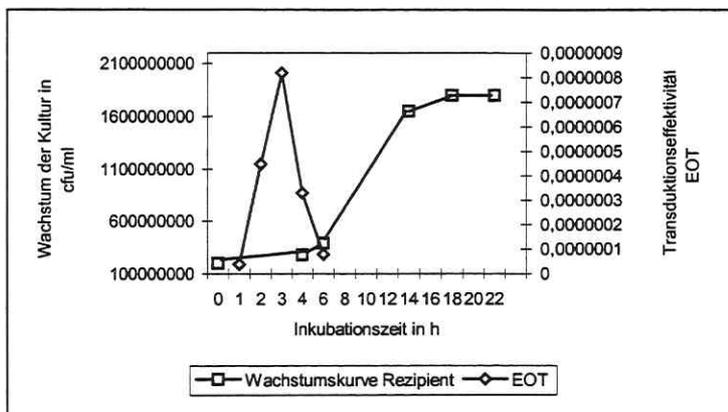


Abbildung 33: Einfluß des Wachstumszustandes des Rezipienten *A. methanolicus* MB58/4-101 auf die Transduktionseffektivität mit dem Phagen Acml

Zum Beginn der sehr frühen logarithmischen Wachstumsphase sind erste Transduktionsereignisse nachzuweisen. Bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase ist eine Erhöhung der EOT-Werte zu verzeichnen mit einem Maximum nach 3 h Kultivierung. Danach sinkt die Transduktionseffektivität wieder ab und es konnte auch kein nochmaliges Ansteigen zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung des Rezipienten beobachtet werden. Diese Werte korrelieren mit den Optima für eine effiziente Infektionsrate. Phagen-Rezeptorstrukturen sind in der frühen logarithmischen Wachstumsphase gut zugänglich, so daß eine hohe Adsorptionsrate und damit auch Infektion durch einen entsprechenden Phagen erfolgen kann. Zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase kommt es, bedingt durch Limitationen, zur Ausbildung von Dauerformen der Zellen mit Zellwandumbau und Einlagerungen.

Auch die Manifestierung der durch Transduktionseignisse eingebrachten genetischen Information erfolgt nur bei einem sehr eng begrenzten physiologischen Zustand des Rezipienten, charakterisiert durch eine hohe Syntheserate der Nucleinsäuren und rekombinative Vorgänge.

Die Infektion der Rezipientenkultur im optimalen physiologischen Zustand ergab erstmals reproduzierbare Resultate in parallelen Transduktionsexperimenten (Tabelle 21), so daß nunmehr gesicherte Ergebnisse für den Nachweis der Transduktion mit dem System *A. methanolicus* MB 58/4-Phage Acml vorliegen.

Tabelle 21: Vergleich von parallelen Transduktionsexperimenten unter optimierten Bedingungen und einer $MOI = 1$

| Kultivierungszeit des Rezipienten (h) | EOT | EOT |
|--|----------------------|----------------------|
| | Experiment 1 | Experiment 2 |
| 2 | $4,3 \times 10^{-7}$ | $1,5 \times 10^{-7}$ |
| 4 | $1,1 \times 10^{-7}$ | $1,2 \times 10^{-7}$ |
| 6 | $4,6 \times 10^{-8}$ | $9,5 \times 10^{-8}$ |

3.3.1.4 Stabilitätsuntersuchungen an den Transduktanten

Aus optimierten Transduktionsexperimenten mit dem Rezipienten *A. methanolicus* MB 58/4-101 wurden 1500 prototrophe Transduktanten isoliert. Diese Isolate wurden auf Sensitivität gegen den Phagen Acml und Stabilität des übertragenen Markers untersucht. Es zeigte sich, daß alle Isolate sensitiv gegen den Phagen Acml waren.

Auf dem Donorstamm *A. methanolicus* MB 58/4 wurde nach Anzucht der Transduktantenklone in MM-Medium mit Methanol und Panthotensäure außerdem die Segregation von Acml-Phagen getestet. 441 Isolate (=30%) setzten zunächst noch Phagen frei. Nach zweimaliger Passagierung der Isolate unter Zusatz von Antiserum gegen den Phagen Acml und nochmaliger Prüfung im Doppelschichtagar-Test konnten erneute Phageninfektionen der Klone ausgeschlossen werden und damit keine weitere Phagenfreisetzung beobachtet werden.

50 Transduktanten wurden hinsichtlich Stabilität des transduzierten His-Markers charakterisiert und dazu in 5 aufeinander folgenden Passagen in VM-Medium passagiert. Auf VM-Agarplatten wurden serielle Verdünnungen plattiert und geeignete Verdünnungsstufen mittels Replika-

Technik auf MM-Agar mit Methanol und Pantothenat übertragen. Alle untersuchten Kolonien gaben den His-Marker stabil weiter.

3.3.1.5 Transduktion weiterer Marker mit dem optimierten Transduktionssystem

Unter den für den Rezipienten *A. methanolicus* MB58/4-101 ermittelten Optimalbedingungen (UV-Dosis für den Phagen von 1500 erg/mm^2 , der Rezipient in der frühen log.-Phase, Nachbehandlung des Transduktionsgemisches mit Acml-Antiserum) wurden weitere Mutanten auf erfolgreiche Transduktion analysiert (Tabelle 22).

Tabelle 22: Transduktionseffektivität (EOT) weiterer auxotropher Marker

| Rezipientenstämme | | |
|--|------------------|----------------------|
| (Auxotrophievarianten von <i>A. methanolicus</i> MB 58/4) | | |
| | Marker | EOT |
| MB 58/4-3 | Met ⁻ | 0 |
| MB 58/4-77 | Arg ⁻ | 0 |
| MB 58/4-100 | His ⁻ | $6,4 \times 10^{-6}$ |
| MB 58/4-101 | His ⁻ | $8,2 \times 10^{-7}$ |
| MB 58/4-116 | Leu ⁻ | $1,4 \times 10^{-6}$ |
| MB 58/4-134 | Tyr ⁻ | $6,6 \times 10^{-8}$ |

Es zeigte sich, daß der Phage Acml in der Lage ist, mehr als einen Marker zu transduzieren. Allerdings werden nicht alle Gene mit gleicher Häufigkeit verpackt, was durch Fehlen von Transduktionsereignissen mit den Auxotrophievarianten *A. methanolicus* MB58/4-3 und MB58/4-77 belegt wird.

3.3.1.6 Zusammenfassung

- Der Phage Acml ist in der Lage, mehrere Aminosäureauxotrophiemarker zu transduzieren, er ist daher als generell transduzierender Phage einzuordnen. Sein enges Wirtsspektrum reduziert den Gentransfer auf seinen Wirt *A. methanolicus* MB58/4 und verschiedene

Mutanten. Das Transduktionssystem ist somit nur zur Feinkartierung von Genen dieses Stammes einsetzbar.

- Die Transduktion ist durch UV-Bestrahlung beeinflussbar, das Optimum liegt bei 1500 erg/mm². Die Wirkung der UV-Strahlung besteht ausschließlich in der Inaktivierung der Phagen. Eine zusätzliche Steigerung der EOT durch UV-Bestrahlung des Rezipienten ist nicht möglich.
- Voraussetzung für eine hohe Transduktionseffektivität ist, daß sich der Rezipient im Bereich der frühen logarithmischen Wachstumsphase befindet.
- Die Transduktionseffektivität für den Phagen Acml konnte mit $6,4 \times 10^{-6}$ als Maximalwert bestimmt werden.
- Die Transduktantenklone sind weiter phagensensibel, das erhöht das Risiko von Sekundärinfektionen und reduziert die Anzahl nachweisbarer Transduktionsereignisse im Experiment.
- Ein sicherer Schutz gegen Sekundärinfektionen konnte nicht gefunden werden, mit einer Reihe vorbeugender Maßnahmen konnten jedoch reproduzierbare EOT-Werte ermittelt werden.
- Alle Marker werden stabil transduziert, abortive Transduktion konnte ausgeschlossen werden.

3.3.2 Transfektion für das System *A. methanolicus* und seine Phagen

3.3.2.1 Nachweis der Transfektion

Nach der von Verma et al., (1989) entwickelten Methode zur Sphäroplastenbildung und anschließender Verdünnung mit *A. bidest.* wurde auf dem Regenerationsmedium für die Bakterienstämme *A. methanolicus* MB58/4, MB70 und MB129 eine nahezu 100%ige Regeneration der Sphäroplasten erreicht (95%; 91%; 92%).

Obwohl die Sphäroplastenbildung bei allen Stämmen erfolgreich verlief, war bei anschließenden Transfektionsexperimenten mit DNA der Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 nur der Stamm *A. methanolicus* MB58/4 transfizierbar (Tabelle 23). Überraschend war, daß nicht nur mit der DNA des Phagen Acm1, sondern auch mit der DNA der anderen 3 Phagen Transfektionsereignisse nachzuweisen waren (Tabelle 23).

Tabelle 23: Transfektion von *A. methanolicus*-Stämmen mit DNA der Acm-Phagen

| <i>A. methanolicus</i> | Anzahl von Transfektionsereignissen (als pfu/ μ g eingesetzte Phagen-DNA) | | | |
|------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Acm1 | Acm5 | Acm6 | Acm7 |
| MB58/4 | $7,4 \times 10^2$ | $7,4 \times 10^2$ | $8,2 \times 10^2$ | $8,6 \times 10^2$ |
| MB70 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MB129 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Die für *A. methanolicus* MB58/4 ermittelten Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit Transferraten, die von Okumura et al. (1985) für *Acetobacter aceti* bestimmt wurden (10^2 bis 10^3 Transformanten/ μ g DNA). Allerdings wurde hier chromosomale bzw. plasmidale DNA transferiert.

3.3.2.2 Charakterisierung der durch Transfektion gewonnenen Phagen

Phagenpartikel, die nach Transfektion in *A. methanolicus* MB58/4 gebildet wurden, erhielten die Bezeichnungen TAcml, TAcml5, TAcml6 bzw. TAcml7. Sie zeigten gegenüber ihren Ursprungsphtagen ein überraschend verändertes und eingeschränktes Wirtsspektrum (Tabelle 24).

Tabelle 24: Wirtsbereiche von durch Transfektion entstandenen (TAcml) und Wildtypphagen auf *A. methanolicus*- Stämmen

| Phage | MB58/4 | MB70 | MB129 |
|--------|--------|------|-------|
| Acm1 | + | - | - |
| TAcml | + | - | - |
| Acm5 | - | + | - |
| TAcml5 | + | - | - |
| Acm6 | - | + | + |
| TAcml6 | + | - | - |
| Acm7 | - | - | + |
| TAcml7 | + | - | - |

+ virulente Vermehrung
- keine Vermehrung des Phagen

Wie Tabelle 24 zeigt, waren die TAcml-Phagen nur noch auf dem Wirtsstamm MB58/4 vermehrungsfähig, auf ihrem Ursprungswirt erfolgte keine Vermehrung mehr.

3.3.2.3 Vergleich von Acm- und TAcml-Phagen

Vergleich der Restriktionsmuster

Zur Aufklärung der Ursachen für die Veränderungen im Wirtsbereich wurde die DNA der TAcml-Phagen mit Restriktionsendonucleasen charakterisiert. Die Ergebnisse der HindIII-Spaltung der DNA von Acm- und TAcml-Phagen sind in Abbildung 34 dargestellt.

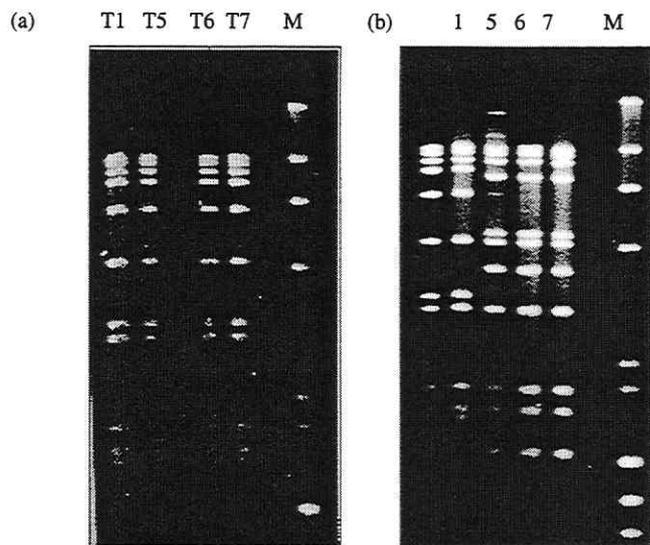


Abbildung 34: Vergleichende Restriktionsanalysen der DNA aus (b) AcM- und (a) TAcM-Phagen durch HindIII-Spaltung

Es ist deutlich zu sehen, daß die Spaltmuster der DNA aller TAcM-Phagen mit dem Muster des Phagen AcM1 identisch sind, sich jedoch von den Spaltmustern der entsprechenden Ausgangsphagen unterscheiden.

Da die zur Transfektion eingesetzte Phagen-DNA in Tropftesten auf Abwesenheit infektiöser Phagenpartikel geprüft wurde, konnte ein Verschleppen von intakten Phagen ausgeschlossen werden. Die Ermittlungen der Wirtsbereiche der AcM-Phagen weisen außerdem aus, daß die 4 untersuchten Phagen keine Mischlysate darstellen (siehe 3.1.2), so daß der Phage AcM1 nicht in den Lysaten der Phagen AcM5, AcM6 und AcM7 enthalten sein kann.

Vergleich der Hüllproteinmuster der AcM- und TAcM-Phagen

Naheliegender war, auch die Zusammensetzung der Hüllproteine der AcM- und TAcM-Phagen zu vergleichen, da veränderte Wirtsbereiche verbunden sein können mit Veränderungen im Adsorptionsapparat der Phagen.

Die Hüllproteinmuster der AcM- und TAcM-Phagen sind in Abbildung 35 dargestellt. Es zeigt sich, daß alle TAcM-Phagen und AcM1 ein identisches Proteinmuster aufweisen.

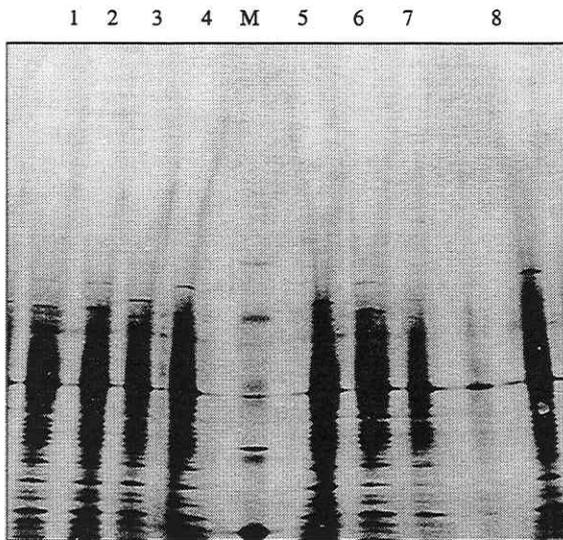


Abbildung 35: Vergleich der Muster der Hüllproteine von Acm- und TAcM-Phagen (M=Eichprotein; 1=Acm1; 2=TAcM1; 3=Acm5; 4=TAcM5; 5=Acm6; 6=TAcM6; 7=Acm7; 8=TAcM7)

Das 79 kD-große Peptid der Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 wird offensichtlich ersetzt durch das Acm1-typische 84 kD-Peptid. Insbesondere diese beiden Proteine sollten daher den Wirtsbereich des damit ausgestatteten Phagen determinieren.

3.3.2.4 Zusammenfassung

- Die Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 können *Acetobacter methanolicus* durch Transfektion infizieren.
- Als Transfektionswirt eignet sich nur der Stamm MB58/4. MB70 und MB129 sind keine Transfektionswirte für die DNA ihrer Phagen.
- Transfektion in MB58/4 führt zur genotypischen und phänotypischen Wandlung der Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 zum Phagen Acm1.

4. Diskussion

4.1 Phagen für *A. methanolicus*

Für das fakultativ methylotrophe Bakterium *Acetobacter methanolicus* wurden 5 Phagen isoliert und umfassend charakterisiert. Wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Acm-Phagen zeigen, sind die Phagen Acm1, Acm2, Acm5, Acm6 und Acm7 gleich strukturiert, besitzen einen ikosaedrischen Kopf und einen Schwanz mit kontraktile Schwanzscheide.

Basierend auf diesen morphologischen Daten sind die Acm-Phagen der Familie *Myoviridae* zuzuordnen (Ackermann et al., 1995, Hyypiä et al., 1997). Neben essentiellen Kopf- und Schwanzstrukturen finden sich in der Familie *Myoviridae* auch außergewöhnliche, fakultative Strukturen wie Basalplatte, Spikes, Fibrillen und Kragen mit und ohne Kragenfilamenten. Beispielhaft seien hier der Phage T4 (hexagonaler Kragen, Basalplatte mit 6 Schwanzfibrillen und Spikes) oder der Phage ϕ 29 (Kragen mit 12 Kragenfilamenten) genannt (Ackermann, 1998). Diese außergewöhnlichen Strukturen finden sich auch bei den Acm-Phagen. Nach der Anzahl der Kragenfilamente und Spikes (zwischen 3-6) sollten Acm-Phagen der Virusgattung „T4-like“ zuzuordnen sein, da bei Acm-Phagen die Kragenfilamente ebenfalls in 6-facher Zahl gefunden wurden. Als Funktion dieser Kragenfilamente wird von Kutter et al. (1996) Stabilisation beim Zusammenbau der langen Schwanzfibrillen angegeben, ein Fakt, der das Vorhandensein solcher langen Fibrillen neben den kurzen Spikes auch bei den Acm-Phagen vermuten läßt, die aber in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zweifelsfrei dokumentiert werden konnte.

4.1.1 Vergleich der Acm-Phagen mit Phagen anderer methylotropher sowie acidophiler Bakterien

Die Art *Acetobacter methanolicus*, Wirt der Acm-Phagen, ist sowohl ein Essigsäurebakterium als auch ein fakultativ methylotrophes Bakterium. Deshalb wurden die Acm-Phagen mit Phagen für beide physiologische Gruppen verglichen.

Aufgrund ihrer Morphologie unterscheiden sich die Acm-Phagen deutlich von den bisher beschriebenen Phagen anderer methylotropher Bakterien (Übersicht bei Kiesel et al., 1989a). Phagen obligat methanotropher Bakterien haben entweder einen wesentlich kürzeren Schwanz

als Acm-Phagen und sind den *Podoviridae* zuzuordnen, oder sie besitzen einen wesentlich längeren, nicht kontraktilen Schwanz und gehören in die Familie der *Siphoviridae*.

Die Mehrzahl der Phagen obligat methanolassimilierender Bakterien gehört ebenfalls in die Familie der *Podoviridae* (5 Phagen) oder *Siphoviridae* (2 Phagen) (Kiesel et al., 1989a). Lediglich ein *Methylobacillus* sp.-Phage (Fischer et al., 1984) und ein Phage für *Methylomonas ceredia* (Ichikawa et al., 1977) wurden als *Myoviridae*-Phage eingeordnet. Da für diese Phagen jedoch kein Kragen mit Filamenten und auch keine Spikes und Fortsatzfibrillen festgestellt wurden, sind sie den Acm-Phagen nicht ähnlich.

Phagen für fakultativ methylotrophe Bakterien sind bis auf die Acm-Phagen nicht bekannt.

Auch für nicht-methylotrophe *Acetobacter/Acidomonas*-Species sind keine Phagen beschrieben. Lediglich aus Essigsäurefermentationen mit einer nicht näher bezeichneten Starterkultur wurde über elektronenmikroskopische Techniken ein Phage mit hexagonalem Kopf und kontraktilem Schwanzscheide festgestellt (Teuber and Andresen, 1987).

Auffällig ist dagegen die Übereinstimmung der Morphologie der Acm-Phagen mit dem *Gluconobacter oxydans*-Phagen A-1 (Schocher et al., 1977) und, abgesehen von der Größe, mit dem Phagen GW 6210 von (Robakis et al., 1985a). Beide Phagen besitzen wie die Acm-Phagen einen Kragen mit Kragenfilamenten. Sie haben aber nicht den eingeschränkten Wirtsbereich wie die Acm-Phagen. Die Restriktionskarte des Phagen A-1 (Robakis et al., 1985b) entspricht zudem nicht den Restriktionsmustern der Acm-Phagen.

Die Acm-Phagen sind somit die ersten Phagen für fakultativ methylotrophe Bakterien, für die Art *Acetobacter methanolicus* und die ersten umfassend charakterisierten Phagen für *Acetobacter*. Sie haben morphologisch große Ähnlichkeit mit Phagen der Art *Gluconobacter oxydans*, einem weiteren Vertreter der *Acetobacter/Gluconobacter*-Gruppe.

4.1.2 Acm-Phagen - eine neue Phagenart?

Laut Definition des Internationalen Komitees für Taxonomie von Viren (ITCV) ist eine Virus-Art „eine polythetische Klasse von Viren, die einen gemeinsamen Ursprung haben und eine bestimmte ökologische Nische besetzen“ (van Regenmortel et al., 1997). Kriterien für einen gemeinsamen Ursprung sind Übereinstimmungen in Morphologie, Proteinzusammensetzung, Nukleinsäure, Basensequenz-Ähnlichkeiten, Wirtsbereich und Infektionskriterien der einzuordnenden Viren. Unterhalb des Art-Levels wird zwar nicht weiter klassifiziert (Mayo and Pringle, 1998), Phagenstämme werden jedoch unterschieden.

Die Kriterien für die Etablierung einer eigenen Virus-Art sind für die Acm-Phagen somit gegeben. Die 5 Acm-Phagen sind streng wirtsspezifisch. Die Wirtsbereiche der Acm-Phagen beschränken sich auf wenige Stämme der Art *A. methanolicus*, die durch ihre fakultativ methylotrophe Lebensweise im sauren Milieu eine eigene ökologische Nische besetzen. Die Charakterisierung der Acm-Phagen zeigt weitestgehende Übereinstimmung in allen geforderten „Art“-Kriterien bei gleichzeitiger eindeutiger Unterscheidbarkeit im Wirtsbereich und einzelnen Komponenten der Hüllproteine.

Wie in 4.3.1 noch ausgeführt wird, handelt es sich bei den Acm-Phagen ausschließlich um phänotypische Modifikationen der Phagen in der Wirtszelle. Die Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 lassen sich in den Phagen Acm1 wandeln, so daß nur ein Acm-Phage existent ist.

4.1.3 Acm-Phagen - verschiedene Stämme einer Phagen-Art?

DNA-Vergleiche

Wichtig für eine Klassifizierung der Phagen sind neben der Morphologie der Virionen auch die Art der Nukleinsäuren und deren Replikation (Mayo and Pringle, 1998). Die Genome der geschwänzten Phagen sind bis auf wenige Ausnahmen lineare Doppelstränge, die Molekulargewichte der Genome variieren zwischen 17 und 725 kb, mit einem scharfen Peak bei 50 kb (Ackermann and DuBow, 1987b) für Phagen mit einem Kopfdurchmesser um 60 nm. Restriktionsspaltungen der DNA der Acm-Phagen und Längenmessungen von Acm1-Genomen weisen lineare Doppelstrang-DNA und Genomgrößen von 58 (Restriktionsspaltung) bis 63 kb (DNA-Längenmessung) aus und korrelieren gut mit den Literaturdaten.

Homoduplexanalysen der DNA des Phagen Acm1 zeigen zudem das Vorhandensein von unterschiedlich großen einsträngigen Überhängen. Solche Strukturen treten auf, wenn zirkulär permutierte und terminal redundante DNA über den „headful“-Mechanismus verpackt wird (Streisinger, 1967). Das Vorliegen zirkulär permutierter und terminal redundanter DNA wird auch gestützt durch das Auftreten von Minorbanden in den Restriktionsspaltungen mit einzelnen Restriktionsendonucleasen, ein Befund, der schon von Mamat (1989) für DNA des Phagen Acm1 beschrieben wurde und auch bei einer Reihe weiterer geschwänzter Phagen auftritt (Ratcliff et al., 1979 [*Bacillus*-Phage SPP1]; Spanier and Cleary, 1983 [*Streptococcus*-Phage SP24]; Mosig et al., 1995 [Übersicht für *E. coli*-Phage T4]).

Minorbanden wurden auch in den Restriktionsmustern der anderen Acm-Phagen gefunden, ein Hinweis, daß alle Acm-Phagen über einen gleichartigen Replikationsmechanismus verfügen.

Somit erklärt sich auch die Unmöglichkeit der Erstellung von Restriktionskarten für die lineare DNA der Acm-Phagen.

Die Acm-Phagen sind in der Struktur ihrer DNA identisch; Hybridisierungsexperimente weisen eine nahezu 100%ige Homologie zwischen den Genomen der Acm-Phagen auf. Trotzdem konnten Unterschiede in den Restriktionsmustern festgestellt werden.

Modifikationen einzelner Basen durch bakterielle Modifikations-Restriktionssysteme (Krüger and Bickle, 1983) sowie der Einbau ungewöhnlicher Basen ins Phagengenom sind ein weiteres Merkmal geschwänzter Phagen (Kutter et al., 1996; Monod et al., 1997) und daher auch für die Acm-Phagen zu betrachten. Neben Cytosinresten, die in den Phagen T2, T4 und T6 ersetzt sind durch Hydroxymethylcytosin, und zusätzlichen Glycosylierungen sind auch Analoga von Adenin, Guanin und Thymin gefunden worden (Ackermann, 1998). Die ungewöhnlichen Basen können die normalen Basen in geschwänzten Phagen völlig oder auch nur zum Teil ersetzen und machen Phagen-DNA resistent gegen eine große Anzahl von Typ II-Restriktionsenzymen. Außerdem beeinflussen ortsspezifische Methylierungen nicht nur die Restriktionsendonucleasen, sondern haben auch Einfluß auf DNA-modifizierende Methyltransferasen (Nelson et al., 1993). Das Resultat sind scheinbare Verluste von Erkennungsstellen und Veränderungen der Größe einzelner Fragmente bei gleichem Informationsgehalt - Ergebnisse, die sich auch aus den Untersuchungen der DNA der Acm-Phagen ergeben.

Für mehrere Arten der Gattung *Acetobacter* wurde das Vorhandensein von Modifikations-Restriktionssystemen dokumentiert (*A. aceti* [Sato et al., 1990]; *A. pasteurianus* [Suzuki et al., 1996]; *A. xylinum* [Petroni et al., 1996]). Der rasche Abbau von DNA-Präparationen aus *A. methanolicus*-Stämmen zeigt zudem das Vorkommen von Nucleaseaktivität, die allerdings nicht näher charakterisiert wurde. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird für *A. methanolicus* und die Acm-Phagen eine klassische wirtskontrollierte Modifikation postuliert. M/R-Systeme erklären jedoch nicht die Ergebnisse der Proteinanalyse der Acm-Phagen, sie können also nicht als alleinige Ursache für die Herausbildung der 5 Acm-Phagen angesehen werden.

Proteinvergleiche

Unterschiedliche Reaktionen der Acm-Phagen auf pH-Veränderungen, Temperatureinwirkungen und UV-Bestrahlung deuteten auf verschiedenartige Proteinstrukturen

der Phagen hin. Diese Annahme konnte durch Neutralisationsexperimente der Acm-Phagen mit Anti-Phagen-Seren verifiziert werden.

Schon Franklin (1961) beschreibt, daß bei der Herstellung von Antiserum gegen den Phagen T2 Anti-Kopf und Anti-Schwanz Antikörper gebildet werden, von denen nur letztere, bestehend aus Antikörpern gegen Schwanzfibrillen und Schwanzscheide, zu einer Phageninaktivierung führt. Die Schwanzfibrillen sind sowohl potente Immunogene (Tetart et al., 1998) als auch Orte der primären Anheftung des Phagen an seinen Wirt, was schon früh an geradzahligen T-Phagen gezeigt wurde (Williams and Fraser, 1956; Kellenberger et al., 1965).

Dieser Zusammenhang konnte auch für die Acm-Phagen hergestellt werden. Die Acm-Phagen sind zwar gegen die 3 getesteten Antiseren kreuzreaktiv, unterscheiden sich aber deutlich in der Höhe ihrer Inaktivierungskapazitäten. Das zeigt zum einen ihre strukturelle Ähnlichkeit in den Schwanzstrukturen, belegt aber auch, daß keine Identität der 5 Phagen vorliegt. Bei weitestgehend identischen Hüllproteinmustern der 5 Acm-Phagen wurden einzelne Banden mit Unterschieden in den Molekulargewichten bei allen Acm-Phagen festgestellt. Diese Unterschiede betreffen 1 bis 5 Polypeptide, die unterschiedlichen Proteinmuster charakterisieren somit die 5 Acm-Phagen eindeutig und lassen zudem Verwandtschaftsgruppen erkennen.

Die Polypeptide 84 kD und 60 kD charakterisieren eindeutig die Gruppe 1, bestehend aus den Phagen Acm1 und Acm2; zwei weitere Polypeptide von 65 kD und 27 kD kommen nur beim Phagen Acm1 vor; Phage Acm2 zeigt ein Peptid von 34 kD. Damit sind molekular begründete Unterschiede zwischen diesen Phagen sichtbar. Da es sich bei der Adsorption des Phagen Acm1 um einen mehrstufigen Prozeß handelt, bei dem der Phage zuerst die Kapsel durchdringt und dann an der Zellwand bindet, der Wirt des Phagen Acm2 aber keine oder eine stark reduzierte Kapsel aufweist (Mamat, 1989), läßt sich folgender funktioneller Zusammenhang postulieren: Die in beiden Phagen auftretenden Peptide von 84 und 60 kD sollten die für eine irreversible Bindung an der Zellwand des Wirtes MB58/4 und des lysogenisierten Stammes MB58/10 erforderlichen Strukturen ausweisen, die im Acm2 fehlenden Proteinstrukturen von 65 und 27 kD dagegen das Kapselmaterial spaltende Enzym repräsentieren.

Auch die Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 besitzen gemeinsame Gruppen-Grundstrukturen von 79 und 63 kD, was wiederum auf gemeinsame Rezeptorstrukturen in den Wirtsstämmen MB70 und MB129 schließen läßt. Neben den gemeinsamen Grundstrukturen dieser Phagen gibt es wiederum Proteine, die jeden dieser Phagen charakterisieren und Bestandteil des kapselsplattendes Enzyms sein sollten. Die Phagen Acm5 und Acm6 haben außerdem ein

gemeinsames 28 kD großes Peptid und lysieren beide den Stamm MB70. Der Phage Acm6 hat zusätzlich noch 2 Polypeptide von 58 und 57 kD, dieser Phage infiziert auch den Stamm MB129. Der Phage Acm7 hat zusätzlich zur Gruppengrundstruktur ein 25 kD großes Protein und infiziert nur den Stamm MB129.

Für den Acm1-Phagen wurde nachgewiesen, daß die Ausbildung des Halo verursacht wird durch Diffusion von ungebundenem Phagenenzym (Mamat, 1989), wie es für verschiedene kapseltragende Bakterien beschrieben ist (Übersicht bei Roberts, 1996). Da auch die *A. methanolicus*-Stämme MB58, MB58/4, MB70, MB129, MB135 Kapseln unterschiedlicher Strukturierung tragen (Grimmecke et al., 1991b; 1994 a,b,c,d) und die Halos der Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 nur phagensensible Zellen ihrer Indikatorkulturen enthalten, sollten für diese Phagen-Wirts-Systeme analoge Verhältnisse vorliegen. Mamat (1989) konnte für den Phagen Acm1 nachweisen, daß das phageninduzierte Enzym nicht nur in freier Form vorliegt, sondern auch Phagen-assoziiert ist. Untersuchungen von Grimmecke et al., (1991b, 1994b,d) zeigten nach Analyse der Spaltprodukte von Kapselpolysacchariden (CPS) und Lipopolysacchariden (LPS) der Stämme *A. methanolicus* MB58/4, MB70 und MB129 nach Phageneinwirkung die Art der Phagen-assoziierten Depolymerasen der Phagen Acm1 (Grimmecke et al., 1991), Acm6 (Grimmecke et al., 1994a) und Acm7 (Grimmecke et al., 1994b) und Acm5 (Grimmecke, pers. Mitteilung). Der Phage Acm1 verfügt demnach über eine Endo- β -1,3-Galactofuranosid-Hydrolase; die Phagen Acm5 und Acm6 über eine Endo- α -1,6-D-Glucopyranosid-Hydrolase und der Phage Acm7 über eine Endo- α -L-Rhamnopyranosid-Hydrolase. Damit konnte zum einen nachgewiesen werden, daß der von Mamat (1989) für den Phagen Acm1 beschriebene 2-stufige Adsorptionsprozeß auch für die anderen Acm-Phagen gilt und zum anderen die Kapselpenetration jedes Acm-Phagen eine phagenspezifische Enzym-Substrat-Wechselwirkung darstellt, jeder Phage also sein spezifisches Enzym bindet und sich somit zumindest in diesem Punkt von den anderen Acm-Phagen unterscheidet. Eine Ausnahme bildet der Phage Acm2. Er bildet um die Plaques auf seinem Wirt MB58/10 keinen Halo aus. Ob dieser Phage trotzdem über phagenassoziierte Depolymerasen verfügt, ist nicht bekannt. Die Ergebnisse der Phagenhüllproteinanalyse zeigen, daß die Wirtsbereiche der Acm-Phagen nicht innerhalb der Wirtszelle durch R/M-Systeme der DNA, sondern über eine spezifische Enzym-Substrat-Reaktion auf Ebene der Adsorption determiniert werden. Die Unterschiede zwischen den Acm-Phagen beruhen letztlich auf dem Vorkommen charakteristischer Proteine, die als partikelgebundene Depolymerasen Bestandteil der Anheftungsregion dieser Phagen sind.

Es stellt sich nun die Frage nach den Orten für die Information zur Synthese der spezifischen Depolymerasestrukturen.

Die genetischen Grundlagen für modifizierte Wirtsbereiche sind gut untersucht bei Mechanismen, die auf Interaktionen der Schwanzfibrillen des Virions mit den Rezeptoren des Wirtes beruhen (geradzahlige T-Phagen, Montag et al., 1990). Von Tetart et al. (1996) wurde das Genprodukt des Gens 37 als Hauptdeterminante des Wirtsbereiches des T4-Phagen beschrieben und als Wirkort die Spitze der langen Schwanzfibrillen bestimmt. Der rekombinative Austausch mosaikartiger Strukturen zwischen den Genen von Phagen unterschiedlicher Verwandtschaftsgrade führt zu Veränderungen der Wirtsbereiche dieser Phagen (Tetart et al., 1998). Diese Bereiche sind zwischen 200 bp und 3 kb groß (Repoila et al., 1994).

Wie bereits ausgeführt, sind die Phagen Genome der Acm-Phagen jedoch gleich groß und weitestgehend homolog, Deletionen oder Insertionen wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. Rekombinative Prozesse in Genen, die die partikelgebundenen Depolymerasen der Acm-Phagen codieren, können somit nicht die Ursache für die Herausbildung der 5 Phagenstämme sein.

Am Beispiel des Phagen Mu läßt sich eine weitere Möglichkeit zur Veränderung von Wirtsbereichen diskutieren. Dieser Phage erreicht Wirtsbereichsveränderungen durch Inversion eines 3 kb großen Fragmentes, das die Gene für verschiedene Schwanzfibrillenproteine trägt und je nach Orientierung zwei verschiedene Wirtsbereiche ermöglicht (van de Putte et al., 1984, 1992; Kahmann et al., 1985). In beiden Orientierungen werden Lipopolysaccharide als Rezeptoren in der Zellwand des Wirtes erkannt. Diese LPS-Strukturen unterscheiden sich durch verschiedene glycosidische Bindung der terminalen Glucose. Berücksichtigt man die Ergebnisse von Grimmecke et al. (1991b; 1994a, b, c, d) zur Spaltung von LPS durch die Acm-Phagen-assoziierten Enzyme, fallen ähnliche Zusammensetzungen der Spaltprodukte auf. Da die Acm-Phagen jedoch 4 verschiedene Wirte infizieren, ist unter der Voraussetzung eines invertierbaren Gens diese Modifikation eher unwahrscheinlich.

Die schlüssigste Erklärung für das untersuchte Phagen-Wirtssystem sind Interaktionen zwischen einem Satelliten-Phagen und Helfer-Phagen, wie es für die *E. coli*-Phagen P4 und P2 von Christie and Calendar (1990); Lindqvist et al. (1993) und Ghisotti et al. (1995) referiert wird. Für die lytische Vermehrung des Satelliten P4 sind Proteine des Helferphagen P2 erforderlich, die zum einen die Verpackung der Phagen-DNA und den Zusammenbau des

Virions bewirken, zum anderen die Lyse des Wirtes bewirken und damit dem Satelliten die Wirtsspezifität seines letzten Helferphagen verleihen. Sequenzhomologien zwischen beiden Genomen sind gering (ca. 1%) und beschränken sich auf DNA-Reifungs- und Verpackungsspezifität, ein rekombinativer Informationsaustausch ist nicht erforderlich (Christie and Calendar, 1990). Die P4-Replikation kann unterschiedlich ablaufen: (1) P4 und P2 coinfizieren einen nichtlysogenen Wirt; (2) P4 infiziert einen P2-reprimierten lysogenen Stamm oder (3) ein P4-lysogener Stamm wird mit P2 infiziert (Lindqvist et al., 1993).

Welches dieser Modelle ist nun für das System *A. methanolicus* /Acm-Phage relevant? Eine Coinfektion von Satellit und Helfer setzt Mischlysate mit genotypisch verschiedenen Phagen voraus, was für die Acm-Phagen ausgeschlossen wurde. Somit bleibt nur die Möglichkeit der Infektion lysogener Wirte. Aufgrund der Identität der Acm-Genome kommt für die Acm-Phagen nur die Rolle eines Satellitenphagen in Betracht. Nach den Helferphagen wurde in den Genomen der Wirtszellen gefahndet.

4.2 Lysogenie in Stämmen der Art *A. methanolicus*

Induktionsversuche mit Mitomycin C haben den Nachweis erbracht, daß alle untersuchten *A. methanolicus*-Stämme Morphotyp2-Phagen (morphologisch Acm-heterologe Phagen) freisetzen. Die gegen Acm-Phagen resistenten Stämme *A. methanolicus* MB55, MB56; MB57, MB58, MB59 und MB60 setzen zusätzlich große Acm-ähnliche Morphotyp1-Phagen (morphologisch Acm-homologe Phagen) frei. Beide Morphotypen bildeten auf keinem der *A. methanolicus*-Stämme Plaques, so daß nach Mitomycin C-Induktion keiner der Stämme einen vermehrungsfähigen Phagen freisetzt. Das gilt auch für den mit Acm1 lysogenisierten Stamm MB58/10. Mamat (1989) konnte für diesen Stamm den pseudolysogenen Charakter dokumentieren und zeigen, daß der Phage Acm1 als extrachromosomales Element etabliert wird. Dieses wird durch Mitomycin C nicht induziert, eine Tatsache, die sich aus dem Mechanismus der MC-Induktion erklärt und zeigt, daß nur ins Chromosom integrierte Prophagen freigesetzt werden. Somit müssen Morphotyp1- und Morphotyp2-Prophagen in die Genome der *A. methanolicus*-Stämme integriert sein.

Alle untersuchten Genome der *A. methanolicus*-Stämme tragen außerdem zum Genom des Phagen Acm1 homologe Bereiche. Allerdings sind diese homologen Bereiche verschieden in Zahl und Größe. Stämme, die beide Prophagen-Morphotypen freisetzen, haben in einem chromosomalen 9,2 kb Fragment Homologien zu Acm1-DNA und sind phagenresistent.

Stämme, die nur den Morphotyp2 tragen, haben in 3 Fragmenten von insgesamt 40,8 kb Homologien zur Acm1-DNA. Diese Stämme sind mit Ausnahme des *A. methanolicus* MB135, für den ein Plasmid nachgewiesen wurde, Wirt eines Acm-Phagen. Eine weitere Sonderstellung nimmt der Stamm MB58 ein. Er vermehrt keinen der Acm-Phagen, setzt nach Induktion aber beide Morphotypen frei, und ist zudem mit 3 Fragmenten von insgesamt 40,8 kb homolog zur Acm1-DNA.

Die Induktionsergebnisse sind ein Beleg für den lysogenen Status der untersuchten Stämme und zeigen, daß *A. methanolicus*-Stämme verschiedene Prophagen tragen. Solche Prophagen können unterschiedliche Auswirkungen auf ihre Wirte haben, wie Änderung von Oberflächenantigenen (Baksdale and Arden, 1974) oder Membranproteinen (Schnaitman et al., 1975) bzw. die Produktion von Toxinen (Buck and Groman, 1981) oder Antibiotika (Martinez-Molina and Olivares, 1979) codieren. Für eine Reihe temperenter Phagen ist auch bekannt, daß sie im lysogenen Zustand Modifikationen der Lipopolysaccharide der Zellwand ihrer Wirte bewirken [*Shigella flexneri*, Gemski et al., (1975); *Pseudomonas aeruginosa*, (Kuzio and Kropinsky, 1983); *Salmonella enteritica*, Nnalune et al., (1990)] und sowohl deren Synthese als auch Spaltung beeinflussen.

Neben lysogener Konversion der Kapsel durch Pseudolysogenie des Phagen Acm1 in MB58/4 (Mamat, 1989) sind Auswirkungen von Prophagen auf die Lipopolysaccharide der Zellwand in *A. methanolicus* MB58/4, MB70 und MB129 nicht auszuschließen. Da diese LPS-Strukturen Substrat für die phagengebundenen Depolymerasen und damit Rezeptorstrukturen für die Acm-Phagen sind, würde der Einfluß eines solchen Prophagen die Adsorption von Acm-Phagen überhaupt erst ermöglichen. Der Einfluß der Prophagen wäre auch eine Erklärung für die Isolation verschiedener *A. methanolicus*-Stämme aus Fermentationsmaterial. Die Prophagen in der Funktion von Helferphagen sollten auch die Information für die Spaltung dieser LPS-Strukturen tragen und mittels Acm-Phagen als Satelliten-Phage realisieren. Nur so sind Unterschiede in der Wirtsspezifität und in der Struktur des Anheftungsapparates der Acm-Phagen einerseits und der unterschiedlichen LPS-Strukturen der *A. methanolicus*-Stämme andererseits hinreichend zu erklären.

Die induzierten Morphotyp1- und Morphotyp2-Partikel enthielten leider keine DNA, so daß keine Aussagen zur Homo- bzw. Heterologie der genetischen Information dieser Prophagen im Vergleich zu den Acm-Phagen zu erhalten waren. Die morphologischen Daten lassen jedoch die Morphotyp2-Phagen als Acm-heterolog erscheinen. Ob auch die Acm-homologen Bereiche in den *A. methanolicus*-Genomen Prophagen sind, die in Acm-resistenten *A. methanolicus*-

Stämmen als Morphotyp1 zu induzieren sind, aus Acm-Wirtsstämmen durch Mitomycin C jedoch nicht freigesetzt werden, muß noch eingehend untersucht werden.

Das Fehlen von DNA in den aus *A. methanolicus*-Stämmen induzierten Prophagen zeigt aber, daß alle induzierten Partikel als defekte Prophagen vorliegen, die zwar noch die Synthese von Phagenhüllproteinen realisieren, aber keine DNA mehr verpacken. Solche defekten Prophagen werden als kryptisch bezeichnet (Klaus et al., 1992); durch „Markerrettung“ nach Infektion von defekt lysogenen Stämmen mit homologen Phagenmutanten kann es zur Produktion intakter Phagen kommen.

Auch dieser Mechanismus ist für die Entstehung der Acm-Phagen nicht völlig auszuschließen, vorausgesetzt, die Acm1-homologen chromosomalen Bereiche sind mit dem Morphotyp1-Prophagen identisch. Da das aber zumindest für die Stämme MB58/4, MB70 und MB129 nicht der Fall ist (sie setzen keinen Morphotyp2-Phagen frei), sollte das Satelliten/Helferphagen-Modell für die Herausbildung der Acm-Phagen relevant sein.

Von Interesse ist noch ein weiteres Ergebnis der Lysogenie-Untersuchungen. Die *A. methanolicus*-Stämme MB135 und MB58 besitzen zusätzlich zum Morphotyp2-Phagen und zu 40,8 kb homologen Bereichen noch extrachromosomale (Plasmid) oder intrachromosomale (MC-induzierbarer Morphotyp1-Prophage) genetische Information. Mamat (1989) konnte zeigen, daß sich der Phage Acm1 unter bestimmten Voraussetzungen als Plasmid etabliert und eine Pseudolysogenie erzeugt. Daß diese zusätzliche Information eine Multiplikation von Acm-Phagen verhindern kann, wurde von Mamat et al., (1995) durch den Nachweis der Repression der Lipopolysaccharid-Biosynthese durch Acm1-codierte Antisense-RNA gezeigt. Aufgrund der Identität der Acm-Phagen sollte dieser phagencodierte Repressionsmechanismus in allen Acm-lysogenisierten *A. methanolicus*-Stämmen wirksam sein. Diese Repression ist ein Ansatzpunkt für die Konstruktion geeigneter phagenresistenter Produktionsstämmen für stabile biotechnologische Verfahren mit *A. methanolicus*. Zusätzlich ist für ausgewählte Stämme die Analyse der Prophagen und ihre Rolle in der Herausbildung von veränderten Wirtsbereichen von *A. methanolicus*-Phagen voranzutreiben.

4.3 Gentransfer mit Acm-Phagen

4.3.1 Transfektion

Erstmals konnte für *A. methanolicus* Transfektion mit DNA der Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 nachgewiesen werden. Allerdings erfolgte die Transfektion nur in *A. methanolicus*

MB58/4, dem Wirt für den Phagen Acml. Für die beiden anderen Wirtsstämme konnte weder mit DNA ihrer eigenen Phagen noch mit DNA aus Acml eine Transfektion gezeigt werden. Zwar kann eine nicht optimale Kompetenz der Rezipienten trotz guter Sphäroplastenbildung nicht völlig ausgeschlossen werden, naheliegender ist jedoch der Abbau der Phagen-DNA durch zelleigene Nucleasen.

Nucleaseaktivität setzt aber ein funktionsfähiges Modifikations-/Restriktionssystem für zelleigene DNA voraus, welches auch die in der jeweiligen Wirtszelle replizierten Phagen Genome modifiziert und so ebenfalls vor diesen Restriktionen schützt. Somit können zwar für den Phagen Acml und die Stämme MB70 und MB129 Nucleaseeinwirkungen nach Transfektion als Ursache für ausbleibende Transfektionsereignisse diskutiert werden, erklären aber nicht das Ausbleiben der Transfektionsereignisse für die Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 auf ihren Wirten *A. methanolicus* MB70 und MB129.

Der Schlüssel für die Erklärung fehlender Transfektionsereignisse könnte in der Art der Gewinnung der Phagen-DNA zu finden sein. Phagen-DNA wurde durch Phenolextraktion einer Deproteinierung unterzogen. Viele gut untersuchte Phagen enthalten ein oder mehrere interne Proteine (IP) (Übersicht bei Ackermann and DuBow, 1989), die bei dieser Prozedur entfernt werden. Schon Kim and Davidson (1974) vermuteten für den Phagen T4, daß die hohe Variabilität dieser Proteine im Zusammenhang stehen könnte mit der Fähigkeit, verschiedene Wirte zu infizieren. Mehrere Funktionen werden diesen internen Proteinen zugeordnet. Sie können an der Injektion der DNA in die Zelle beteiligt sein, eine Funktion beim Verpacken der Phagen-DNA erfüllen, oder für den Ringschluß der linearen Phagen-DNA nach Injektion erforderlich sein (Ackermann and DuBow, 1989).

Pseudo-geradzahlige T-Phagen injizieren außerdem zusammen mit dem Phagen Genom phagencodierte interne Proteine, die das Genom vor dem Abbau durch wirtseigene Enzyme schützen (Abremski and Black, 1979). Diese internen Proteine schützen auch DNA des Phagen P1 vor bakteriellen Nucleasen (Krüger and Bickle, 1983). Die Anti-Restriktionsfunktion wird durch den Phagen selbst codiert, die beiden Genprodukte DarA und DarB werden mit der Phagen-DNA nach Infektion injiziert (Klaus et al., 1992) und wirken gegen Typ I-Restriktionsendonucleasen der Wirtszelle. Ist diese Schutzfunktion durch (präparativen) Verlust des internen Proteins nicht mehr gegeben, wird transfektierte DNA durch die wirtseigenen Restriktionsendonucleasen abgebaut, eine Wildtypzelle vorausgesetzt. Solche Typ I-Restriktionsendonucleasen bestehen aus drei Arten von Untereinheiten, durch je 1 Gen codiert, die Restriktionseinheit R, die Modifikationseinheit M und einer Einheit S für die Erkennung der

Zielsequenz. Mutationen in allen drei Genen sind bekannt, sie erzeugen 2 verschiedene Phänotypen ($r^- m^+$ und $r^- m^-$). Beide Phänotypen sind nicht mehr in der Lage, DNA zu spalten, der $r^- m^+$ Typ modifiziert diese DNA jedoch noch, während der $r^- m^-$ Typ auch zur Modifikation nicht mehr in der Lage ist.

Auf das System *Acetobacter methanolicus* und seine Phagen übertragen, sollte der Stamm MB58/4 eine $r^- m^+$ -Mutante repräsentieren, die Phagen-DNA ohne den Schutz interner Proteine nicht spaltet. Die Stämme MB70 und MB129 sollten dagegen $r^+ m^+$ -Wildtypen sein, Phagen-DNA wird hier nur unter dem Einfluß interner Proteine vor Restriktionsendonucleasen geschützt.

A. methanolicus-Stämme sollten somit auch über ein Typ I-Modifikations-/Restriktionssystem verfügen.

Überraschend waren zunächst die im Ergebnis der transfektiven Vermehrung der Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 in MB58/4 entstandenen Veränderungen der TAcM-Phagen. Diese Phagen können sich, wie der Phage Acm1, nur im Rezipienten *A. methanolicus* MB58/4 vermehren und weisen sowohl den Phänotyp als auch den Genotyp des Phagen Acm1 auf. Das zeigt zunächst die Richtigkeit der Annahme, daß der Phage durch seinen jeweiligen Wirt geprägt wird. Die Ergebnisse der Transfektion zeigen aber vor allem, daß es sich bei den 5 Acm-Phagen nicht um verschiedene Phagenstämme einer Phagenart handelt, sondern daß nur ein Acm-Phage existiert, der in seiner Wirtszelle auf Proteinebene modifiziert wird. Somit ist die Unterscheidung in die Phagen Acm1 bis Acm7 nur im Sinne einer spezifischen Modifikation zu verwenden.

Dieses Ergebnis macht zugleich das Risiko deutlich, daß für die Infektion weiterer *A. methanolicus*-Stämme durch den Acm-Phagen besteht. Insbesondere bei hohen Zelldichten in Hochleistungsfermentoren besteht die Gefahr weiterer Modifikationen des Phagen nach Transfektion.

Transfektion ist für das System *A. methanolicus* und seinen Phagen Acm aber auch eine Möglichkeit zum Transfer von Information aus den Stämmen *A. methanolicus* MB70 und MB129 in den Stamm *A. methanolicus* MB58/4. Durch Gewinnung von Mutanten der Stämme MB70 und MB129 mit Defekten im Typ I-Restriktionssystem sollte sich die Richtung des Transfers auch umkehren lassen. Mit dem Acm-Phagen liegt erstmals ein Art-eigener Vektor für den intraspezifischen Gentransfer in *Acetobacter methanolicus* vor.

4.3.2 Transduktion

Die Entstehung transduzierender Partikel ist nur in Zusammenhang mit der Art der Phagenvermehrung und mit der Verpackung der DNA zu betrachten. Spezielle und generelle Transduktion werden unterschieden (Übersichten bei Ozeki and Ieda, 1968, Low and Porter, 1978, Kokjohn, 1989). Generell transduzierende Phagen sind in der Lage, Nicht-Phagen-DNA zu verpacken und somit jede beliebige DNA, die mindestens die Größe des Phagengenoms aufweist, in reife Phagenpartikel einzubringen. In Lysaten virulenter Phagen finden sich ca. 1% Phagenpartikel, die ausschließlich DNA ihres Wirtes enthalten, alle lytischen Phagen sollen zur generellen Transduktion befähigt sein (Stotzky et al., 1990). Tansduktanten aus Ansätzen mit generell transduzierenden Phagen müssen daher phagensensibel für die intakten Phagen des Transduktionslysates sein.

Für Acm-Phagen wurde aufgrund der Struktur der Phagen-DNA ein „headful“-Mechanismus der Verpackung linearer DNA von ca. 60 kb Größe nachgewiesen. Da sich dieser Phage außerdem auf dem Donorstamm *A. methanolicus* MB58/4 vorwiegend virulent vermehrt, ist auch der Acm-Phage als generell transduzierender Phage einzuordnen mit einer maximalen EOT von $6,4 \times 10^6$. Die DNA des Phagen Acm1 ist zirkulär permutiert und terminal redundant, was für einen Replikationsmechanismus nach dem „headful“-Mechanismus des T4 Phagen spricht.

Die Verpackungskapazität der Acm-Phagenköpfe beträgt ca 60 kb. Geht man von einer Genomgröße der Wirtszelle von 4 700 kb aus, wie für *E. coli* von Krawiec and Riley (1990) publiziert, kann ca. 1/100 des Wirtsgenoms verpackt werden. Da bei genereller Transduktion beliebige Fragmente des Genoms des Wirtes verpackt werden, ist eine Vielzahl von Genen zu transduzieren, wodurch sich Kopplungen von Genen in diesen Größenbereichen analysieren lassen. Für den Phagen Acm1 wurde der Nachweis der Transduktion für mehr als einen Marker erbracht, Auxotrophien für Histidin, Leucin und Tyrosin wurden komplementiert. Somit eignet sich das Transduktionssystem *A. methanolicus*-Phage Acm1 zur Aufklärung von Kopplungsgruppen von Genen im Wirtsstamm.

Gleichzeitiges Verpacken von Phagen-DNA und chromosomaler DNA ist für generell transduzierende Phagen als Spezialfall anzusehen. Solche Partikel entstehen nur dann, wenn im Chromosom des Wirtsstammes ein Prophage integriert ist, der über homologe „pac-sites“ oder durch „headful“-Mechanismus mit verpackt wird. Handelt es sich um einen homologen Phagen, kann neben dem Markertransfer Phagenresistenz gegen den intakten Phagen des Transduktionslysates auftreten.

Auch für den Phagen Acml ist aufgrund des lysogenen Zustandes seines Wirtes MB58/4 nicht auszuschließen, daß Fragmente des Morphotyp2-Prophagen oder Acm-homologe Bereiche im Wirtsgenom mit verpackt werden. Die analysierten Transduktantenklone waren jedoch alle Acml-sensitiv, so daß der Prophage (falls mit verpackt) entweder keinen Einfluß auf die Konversion der Zelloberfläche und damit auf die Phagensensitivität der transduzierten Klone hat oder gar nicht übertragen wurde und somit auch nicht in unmittelbarer Nähe zu den übertragenen Genen liegt.

Die transduzierten Marker werden stabil weitergegeben, es liegt also keine abortive Transduktion vor, wie sie von Helling (1969) für den Phagen P1 berichtet wurde. Helling konnte zeigen, daß nur 10% der Zellen, die ein bestimmtes Gen von einem transduzierenden Phagen erhalten hatten, stabile Transduktanten ergaben. Zunächst waren vorwiegend abortive Transduktanten gebildet worden, die zwar phänotypisch den Marker ausprägten, die Information aber nicht weitergaben. Allerdings konnte nach UV-Bestrahlung oder Senfgasbehandlung die Anzahl an stabilen Transduktanten erhöht werden. Zwei Wirkprinzipien werden diskutiert. Bender (1981) geht von einer Reduzierung des Infektionsrisikos durch die intakten Phagen nach UV-Bestrahlung aus. Er konnte für den lytischen Phagen ϕ Cr30 von *Caulobacter crescentus* zeigen, daß die Transduktionsfrequenz deshalb so gering ist, weil viele Transduktanten mit nicht transduzierenden Partikeln infiziert waren und lysierten. Er verwendete deshalb die Methode der UV-Bestrahlung des Transduktionslysates zur Inaktivierung der Phagenpartikel. Da die DNA des Phagen im Verhältnis zu einem einzelnen Gen groß ist, wird zwar der Phagentiter um mehrere Stufen reduziert, die Transduktionsfrequenz jedoch kaum beeinflußt.

Die Mehrzahl der Autoren, die den Einfluß des UV-Lichtes auf die Transduktion untersucht haben, gehen jedoch davon aus, daß zusätzlich zu dem von Bender (1981) beschriebenen Effekt die Stimulierung der Transduktion eine Folge rekombinativer Prozesse darstellt (Helling, 1969, 1973; Porter, 1979; Arber, 1960; Ebel-Tsipis, 1972, Buchanan-Wollaston, 1979).

Auch für das System *A. methanolicus* MB 58/4 / Phage Acml konnte nachgewiesen werden, daß die Transduktionseffektivität nach UV-Bestrahlung bis zu einer Dosis von 1500 erg/mm² steigt. Das trifft aber nur bei Behandlung des Acml-Phagen zu, die Bestrahlung des Rezipienten oder des Transduktionsgemisches hatten keinen Einfluß auf eine Erhöhung der Transduktionseffizienz. Wie gezeigt, wird der Phage Acml durch UV-Licht stark inaktiviert, so daß der UV-Einfluß auf eine Reduzierung von Sekundärinfektionen der Transduktantenklone zurückgeführt werden kann. Eine Auslösung rekombinativer Prozesse, die zur Ausbildung

stabiler Transduktanten geführt haben könnte, ist aufgrund der nicht feststellbaren Stimulierung der Transduktionseffizienz nach UV-Bestrahlung des Rezipienten sowie des Transduktionsgemisches für das untersuchte System auszuschließen. Zudem erwiesen sich die Mehrzahl aller Transduktantenklone als sensitiv gegen den Phagen Acml, ein Hinweis darauf, daß die transduzierten Phagen ausschließlich Gene des Wirtschromosoms übertragen haben.

Der Phage Acml ist der erste transduzierende Phage sowohl für *Acetobacter methanolicus* als auch für methylorophe Bakterien. Mit der Etablierung der Transduktion wird eine Lücke im methodischen Handwerkszeug für die Übertragung genetischer Information in diesen Mikroorganismen geschlossen. Der auf einen *A. methanolicus*-Stamm begrenzte Wirtsbereich des transduzierenden Phagen begrenzt aber gleichzeitig den Einsatz dieses Transduktionssystems und ermöglicht nur einen intraspezifischen Transfer zwischen Wildtyp und Mutanten des Stammes MB58/4. Die Transduktion mit diesem System eignet sich aber gut zur Feinkartierung des Bakteriengenoms durch Analyse von Kopplungsgruppen und bietet somit die Möglichkeit zur Analyse der genetischen Strukturierung des Wirtsstammes.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen zwischen Stämmen der Art *Acetobacter methanolicus* und Bakteriophagen umfassend charakterisiert. Es wurden sowohl Risiken durch Phageninfektion und Induktion für die Kultivierung dieser fakultativ methylophen Essigsäurebakterien als auch Möglichkeiten der phagenvermittelten Gentransferprozesse zur Charakterisierung und Optimierung von *A. methanolicus* herausgearbeitet.

Erstmals wurden Phagen für fakultativ methylophen Bakterien sowie für Essigsäurebakterien isoliert und umfassend charakterisiert. Die 5 Acm-Phagen gehören nach der Morphologie zur Virus-Familie *Myovirida* mit einer großen Ähnlichkeit zur Virusgattung „T4-like“. Sie lassen sich über ihre Wirtsbereiche eindeutig unterscheiden. Alle 5 Phagen haben gleich große und identische Genome von 63 kb. Sie sind linear, zirkulär permutiert und terminal redundant. Unterschiede in den Restriktionsmustern erklären sich aus Modifikations-Restriktionsmechanismen ihrer Wirte, nicht aus unterschiedlichen Informationsgehalten.

Die Phagenproteine weisen gemeinsame Grundstrukturen auf, zeigen aber auch spezifische Unterschiede in den Proteinmustern, die jeden der 5 Phagen eindeutig charakterisieren. Aufgrund von Unterschieden in der Inaktivierungskapazität der 5 Phagen mit Acm-Antisera und Unterschieden in den Spaltprodukten der Kapseln ihrer Wirte nach Phageneinwirkung (unterschiedliche phagenassoziierte Depolymerasen) wurden diese Unterschiede der Anheftungsregion der Phagen mit unterschiedlich strukturierten Schwanzfibrillen zugeordnet.

Identität der Acm-Phagen Genome, aber Unterschiede in den Adsorptionsstrukturen der Phagen führten zu der Erkenntnis, daß die Phagen einer Proteinmodifikation unterliegen und daß nur ein Acm-Phage existiert. Das läßt zunächst das Infektionsrisiko gering erscheinen, die Proteinmodifikationen führen jedoch zu einer unkalkulierbaren Variabilität an Phagenmodifikationen. Somit existiert für *A. methanolicus*-Stämme ein hohes Infektionsrisiko durch Bakteriophagen.

Zusätzlich zu einem Infektionsrisiko durch verschieden modifizierte Acm-Phagen wurde auch das Risiko durch Induktion von Prophagen geklärt. Alle untersuchten *A. methanolicus*-Stämme sind lysogen. Es wurden Mitomycin C-induzierbare defekte Prophagen und zu Acm-DNA homologe chromosomale Bereiche festgestellt. Acm-resistente Stämme tragen 2 kryptische Prophagen (Morphotyp1: morphologisch Acm-homolog; Morphotyp2: morphologisch Acm-heterolog) und ein Acm-homologes chromosomales Fragment. Für Acm-sensitive Stämme

wurde ein kryptischer Prophage (Morphotyp2: morphologisch Acm-heterolog) und 3 zum Acm-Genom homologe Bereiche nachgewiesen. Der Acm-Phage wird als Satellitenphage durch einen heterologen Helferphagen phänotypisch modifiziert. Allerdings kann auch Markerrettung durch einen kryptischen Acm-homologen Phagen nicht völlig ausgeschlossen werden.

Somit bestimmt nicht ausschließlich der Acm-Phage das Infektionsrisiko für potentielle Produktionsstämme, erst in Verbindung mit Prophagen kommt es zur Phagenmultiplikation und Wirtsbereichsveränderungen. Eine Induktion dieser Prophagen ist zwar ebenfalls möglich, die Auswirkungen auf die Kultivierung von *A. methanolicus* sind aber als gering einzuschätzen.

Der Acm-Phage ist neben der Zerstörung seiner Wirte auch zu deren genetischer Veränderung fähig. Gentransfer durch Phagen (Transduktion) und Phagen-DNA (Transfektion) wurde erstmals in methylotrophen Bakterien nachgewiesen.

Transfektion unter Verwendung der Acm-Phagen-DNA erfolgt zwischen den Stämmen *A. methanolicus* MB70, MB129 und MB58/4. Die Phagen Acm1, Acm5, Acm6 und Acm7 lassen sich nach Transfektion in dem Stamm MB58/4 vermehren. Die Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 wandeln sich dabei durch wirtskontrollierte phänotypische Modifikation spezieller Hüllproteine in den Phagen Acm1.

Das Ausbleiben von Transfektionsereignissen mit DNA der Phagen Acm5, Acm6 und Acm7 in ihren Wirtsorganismen legt eine weitere Modifikation durch interne Proteine als Schutz vor weiteren Restriktionssystemen in den Wirtsstämmen MB70 und MB129 nahe. Der Stamm *A. methanolicus* MB58/4 wurde als eine m^+r^- -Mutante eingeordnet, die *A. methanolicus*-Stämme MB70 und MB129 sollten m^+r^+ -Wildtypen sein; m^+r^- -Mutanten der Stämme MB70 und MB129 sollten künftig die Transferrichtung auch umkehrbar machen.

Es wurde gezeigt, daß DNA des Acm-Phagen geeignet ist, genetische Information aus *A. methanolicus* MB70 und MB129 in den Stamm MB58/4 zu transferieren (Intraspecies-Gentransfer). Somit steht für *A. methanolicus* ein arteigenes Vektorsystem zur Verfügung.

Der Acm-Phage (Acm1) ist außerdem zur generellen Transduktion fähig. Die Transduktion wurde jedoch bisher nur zwischen MB58/4 (Wildtyp) und Aminosäureauxotrophievarianten dieses Stammes nachgewiesen. Die Transduktanten bleiben phagensensibel, mehrere Marker wurden übertragen und stabil repliziert. Der Acm-Phage eignet sich somit zur Feinkartierung seines Wirtes durch Gentransfer zwischen Wildtyp und Mutanten eines Acm-sensitiven *A. methanolicus*-Stammes. Aufgrund des sehr engen Wirtsbereiches der jeweiligen Phagen-

Modifikation eignet sich der komplette Phage jedoch nicht als Carrier für Gentransfer innerhalb der Art *A. methanolicus* oder in verwandte Arten.

6. Literatur

- Abremski, K. and Black, L.W.: The function of bacteriophage T4 internal protein I in a restrictive strain of *Escherichia coli*. *Virology* 97 (1979) 439-447.
- Ackermann, H.-W.: Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol. Sci.* 4 (1987) 214-218.
- Ackermann, H.-W.: Frequency of morphological phage descriptions. *Arch. Virol.* 124 (1992) 201-209.
- Ackermann, H.-W.: Frequency of morphological phage description in 1995. *Arch. Virol.* 141 (1996) 209-218.
- Ackermann, H.-W.: Tailed bacteriophages: The order *Caudovirales*. *Adv. Virus Res.* 51 (1998) 135-201.
- Ackermann, H.-W.; DuBow, M.S.: *Viruses of Prokaryotes*. Vol. I and II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1987a, b.
- Ackermann, H.-W.; Elzanowski, A.; Fobo, G.; Steward, G.: Relationships of tailed phages: A survey of protein sequence identity. *Arch. Virol.* 140 (1995) 1871-1884.
- Adams, M.H.: *Bacteriophages*. Interscience Publishers, Inc., New York, 1959.
- Akhverdiyan, V.S.; Khrenova, E.A.; Reulez, M.A.; Gerassimova, T.W.; Krylov, V.N.: Charakteristika von Phagen-Transposonen von *Pseudomonas aeruginosa*, die 2 Gruppen bilden und sich in ihrer DNA-DNA Homologie unterscheiden (in Russisch). *Genetika* 21 (1985) 735-741.
- Alisky, J.; Iczkowski, K.; Rapoport, A.; Troitsky, N.: Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.* 36 (1998) 5-15.
- Allen, L.N. and Hanson, R.S.: Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: Identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *J. Bacteriol.* 161 (1985) 955-962.
- Almumin, S.; Kadri, M.; Mamat, U.; Engel, J.: Isolation and primary characterization of a new bacteriophage of obligate methylotrophic bacteria. *J. Basic Microbiol.* 30 (1990) 627-632.
- Alvarez-Cohen, L.: Application of methanotrophic oxidations for the bioremediation of chlorinated organics. In: *Microbial growth on C1 compounds*. (Eds.: Murrell, J.C.; Kelly, D.P.) Intercept Ltd., 1993, pp. 337-350.
- Anthony, C.: *The biochemistry of methylotrophs*. Academic Press, London, 1982.
- Arber, W.: Transduction of chromosomal genes and episomes in *Escherichia coli*. *Virology* 11 (1960) 273-288.

- Babel, W.: Methanol-Assimilation durch ein acidophiles Bacterium der Gattung *Acetobacter*. *Acta Biotechnol.* 4 (1984) 369-376.
- Babel, W.: Methanol als Substrat für biotechnologische Prozesse. *Z. Chem.* 27 (1987) 49-56.
- Babel, W.: Peculiarities of methylotrophs concerning overflow metabolism, especially the synthesis of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* 103 (1992) 141-148.
- Babel, W. und Hofmann, K.H.: Regulation des Pyruvat- und Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes eines fakultativ methylotrophen Bakteriums. *Z. allg. Mikrobiol.* 17 (1977) 403-406.
- Babel, W.; Miethe, D.; Iske, U.; Sattler, K.; Richter, H.-P.; Schmidt, J.; Düresch, R.: Verfahren zur Herstellung von Gluconsäure mittels Bakterien. *WP C 12 P 246 3344* (22.07.1987).
- Babel, W. and Müller, R.H.: A procedure for gluconic acid synthesis with bacteria made continuous by means of an auxiliary substrate. *Acta Biotechnol.* 7 (1987) 277-280.
- Babel, W.; Soye, K.; Pöhland, D.: Single cell proteins. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 24 (1993) 165-183.
- Barksdale, L. and Arden, S.B.: Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. *Annu. Rev. Microbiol.* 28 (1974) 265-300.
- Barta, T.M. and Hanson, R.S.: Genetics of methane and methanol oxidation in gram-negative methylotrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64 (1993-1994) 109-120.
- Bell, G.M. and Roscoe, D.H.: Simple and rapid structure determination of virions in bacteriophage plaques. *Micron* 13 (1982) 41-43.
- Bender, R.A.: Improved generalized transducing bacteriophage for *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 148 (1981) 734-735.
- Bendig, M.M. and Drexler, H.: Transduction of bacteriophage Mu by bacteriophage T1. *J. Virol.* 22 (1977) 640-645.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (1987) 93-99.
- Boulygina, E.S.; Chumakov, K.M.; Netrusov, A.I.: Systematics of gram-negative methylotrophic bacteria based on 5S rRNA sequences. In: *Microbial growth on C1 compounds*. (Eds.: Murrell, J.C.; Kelly, D.P.) Intercept Ltd., 1993, pp. 275-284.
- Boulygina, E.S.; Galchenko, V.F.; Govorukhina, N.I.; Netrusov, A.I.; Nikitin, D.I.; Trotsenko, Y.A.; Chumakov, K.M.: Taxonomic studies on methylotrophic bacteria by 5S ribosomal RNA techniques. *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 441-446.
- Boulygina, E.S.; Gulicova, O.M.; Dikanskaya, E.M.; Netrusov, A.I.; Tourova, T.P.; Chumakov, K.M.: Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992) 2283-2286.

- Boze, H.; Moulin, G.; Galzy, P.: Production of microbial biomass. *Biotechnology*. Vol. 1 (1993) 169-183.
- Bradley, D.E.: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31 (1967) 230-314.
- Brenner, V.; Holubova, I.; Benada, O.; Hubacek, J.: Characterization of new plasmids from methylotrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60 (1991) 43-48.
- Brenner, V.; Holubova, I.; Hubacek, J.: An efficient method for isolation of plasmid DNA from methylotrophic bacteria. *Folia Microbiol. (Praha)* 35 (1990) 454-455.
- Buchanan-Wollaston, V.: Generalized transduction in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 112 (1979) 135-142.
- Buck, G.A. and Groman, N.B.: Identification of desoxyribonucleic acid restriction fragments of β -converting corynebacteriophages that carry the gene of diphtheria toxin. *J. Bacteriol.* 148 (1981) 153-162.
- Cairns, J.; Stent, G.S.; Watson, J.D.: *Phagen und die Entwicklung der Molekularbiologie*. Akademie-Verlag Berlin. 1972.
- Caravajal, L.F.: Phage problems in the streptomycin fermentation. *Mycologia* 45 (1953) 209-234.
- Chan, H.T.C. and Anthony, C.: The interaction of methanol dehydrogenase and cytochrome c_L in the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. *Biochem. J.* 280 (1991a) 139-146.
- Chan, H.T.C. and Anthony, C.: The o-type oxidase of the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. *J. Gen. Microbiol.* 137 (1991b) 693-704.
- Chistoserdov, A.I.; Eremashvili, M.R.; Mashko, S.V.; Lapidus, A.L.; Skvortsova, M.A.: Expression of the human interferon alpha F gene in the obligate methylotroph *Methylobacillus flagellatum* KT and *Pseudomonas putida* (in Russisch). *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 8 (1987) 36-41.
- Christie, G.E. and Calendar, R.: Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers. *Annu. Rev. Genet.* 24 (1990) 465-490.
- Colby, J.; Dalton, H.; Whittenbury, R.: Biological and biochemical aspects of microbial growth on C1 compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 33 (1979) 481-517.
- Colby, J. and Zatman, L.J.: Hexose phosphate synthase and tricarboxylic acid-cycle enzymes in bacterium 4B6, an obligate methylotroph. *Biochem. J.* 128 (1972) 1373-1376.
- Corpe, W.A. and Rheem, S.: Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62 (1989) 243-250.

- Daly, C.; Fitzgerald, G.F.; Davis, R.: Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (1996) 99-110.
- Davidson, B.E.; Powell, I.B.; Hillier, A.J.: Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 75 (1990) 79-90.
- Dijkhuizen, L.: Methylotrophs. In: *Biotechnological Fundamentals Vol.1*, (Eds.: Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P.) VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993, pp. 266-284.
- Dijkhuizen, L.; Arfman, N.; Attwood, M.M.; Brook, A.G.; Harder, W.; Watling, E.M.: Isolation and initial characterization of thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 52 (1988) 209-214.
- Dikanskaya, E. M.: Biotechnologisches Potential methylotropher Bakterien und Wege zu dessen Nutzung (in Russisch). In: *Biochemie und Physiologie Methylotropher*, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Puschschino, 1987, pp. 142-158.
- Dinsmore, P.K. and Klaenhammer, T.R.: Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Mol. Biotechnol.* 4 (1995) 297-314.
- Dordick, J.S.; Khmelnitzky, Y.L.; Sergeeva, M.V.: The evolution of biotransformation technologies. *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (1998) 311-318.
- Duchrow, M.; Kohring, G.-W.; Giffhorn, F.: Virulence as a consequence of genome instability of a novel temperate bacteriophage, ϕ RsG1, of *Rhodobacter sphaeroides* Y. *Arch. Microbiol.* 142 (1985) 141-147.
- Duine, J.A. and Dijken, J.P.: Enzymes of industrial potential from methylotrophs. *Biotechnology* 18 (1991) 233-252.
- Ebel-Tsipis, J.; Fox, M.S.; Botstein, D.: Generalized transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella typhimurium*. II. Mechanism of integration of transducing DNA. *J. Mol. Biol.* 14 (1972) 449-469.
- Eggersdorfer, M.; Meyer, J.; Eckes, P.: Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiol. Rev.* 103 (1992) 355-364.
- Eierdanz, H. (Hrsg.): *Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie*. VCH, Weinheim, 1996.
- Eisenstark, A.: Bacteriophage techniques. In: *Methods in Virology*, Vol. 1 (Eds.: Maramorosch, K. and Koprowski, H.) Academic Press, New York, 1967.
- Ekeroth, L. and Villadsen, J.: Single cell protein production from C1 compounds. *Biotechnology* 18 (1991) 205-231.
- Elliott, E.J. and Anthony, C.: The interaction between methanol dehydrogenase and cytochrome c in the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. *J. Gen. Microbiol.* 134 (1988) 369-377.

- Engel, J.; Chistoserdov, A.J.; Tsygankov, J.D.: Konstruktion von Vektoren für methylorophe Bakterien auf der Basis des Plasmides RSF 1010. *Acta Biotechnol.* 6 (1986) 23-25.
- Erickson, L.E. and Tuitemwong, P.: Growth yields, productivities, and maintenance energies of methylotrrophs. *Biotechnology* 18 (1991) 149-172.
- Faust, U. and Präve, P.: Biomass from Methane and Methanol. In: *Biotechnology Vol. 3.* (Eds.: H.J. Rehm; G. Reed), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel; 1983, pp. 84-108.
- Fischer, H.; Kiesel, B.; Wünsche, L.: Phages of neutrophilic methanol utilizing bacteria. *Leipziger Biotechnol.-Symp. Phagen in der technischen Mikrobiologie, Abstracts* (1984) 22.
- Föllner, C.G.; Schröder, R.; Babel, W.: Construction of broad-host-range plasmids for the expression of heterologous genes in *Acetobacter methanolicus* MB58. *Acta Biotechnol.* 14 (1994) 141-151.
- Fraklin, N.C.: Serological study of tail structure and function in coliphages T2 and T4. *Virology* 14 (1961) 417-429.
- Frebortovo, J.; Matsishita, K.; Adachi, O.: Effect of growth substrates on formation of alcohol dehydrogenase in *Acetobacter methanolicus* and *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.* 83 (1997a) 21-25.
- Frebortovo, J.; Matsushita, K.; Yakushi, T.; Toyama, H.; Adachi, O.: Quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: Kinetic study on the enzyme purified from *Acetobacter methanolicus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (1997b) 459-465.
- Frebortovo, J.; Matsushita, K.; Yakushi, T.; Toyama, H.; Arata, H.; Adachi, O.: Intramolecular electron transport in quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter methanolicus*: a redox-titration study. *Biochem. Biophys. Acta* 1363 (1998) 24-34.
- Fukaya, M.; Tagami, H.; Tayama, K.; Okumura, H.; Kawamura, Y.; Beppu, T.: Spheroplast fusion of *Acetobacter aceti* and its application to the breeding of strains for vinegar production. *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 2435-2440.
- Gälli, R. and Leisinger, T.: Plasmid analysis and cloning of the dichloromethane-utilization genes of *Methylobacterium* sp. DM4. *J. Gen Microbiol.* 134 (1988) 943-952.
- Gasson, M.J.: Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (1996) 147-159.
- Gemski, P.; Koeltzow, D.E.; Formal, S.B.: Phage conversion of *Shigella flexneri* group antigens. *Infect. Immun.* 11 (1975) 685-691.
- Ghisotti, D.; Briani, F.; Forti, F.; Piazza, F.; Polo, S.; Sabbattini, P.; Sturniolo, T.; Terzano, S.; Zangrossi, S.; Zappone, M.: Multiple regulatory mechanisms controlling phage-plasmid P4 propagation. *FEMS Microbiol. Rev.* 17 (1995) 127-134.

- Gliesche, C.G.: Transformation of methylotrophic bacteria by electroporation. *Can. J. Microbiol.* 43 (1997) 197-201.
- Goldberg, I.: Biology of the methylotrophs. In: *Biology of industrial microorganisms*. (Eds.: Demain, A.L.; Solomon, N.A.) Butterworths Publishers 1985, pp. 223-259.
- Green, P.N.: Overview of the current state of methylotroph taxonomy. In: *Methylotrophic growth on C1-compounds* (Eds.: Murrell, J.C. and Kelly, D.P.) Intercept Ltd., 1993, pp. 253-265.
- Green, P.N.: Taxonomy of methylotrophic bacteria. In: *Methane and methanol utilizers*. (Eds.: Murrell, J.C. and Dalton, H.) Plenum Press, New York, 5 (1992), pp. 23-84.
- Grimmecke, D.H.; Mamat, U.; Voges, M.; Lauk, W.: Structure of the extracellular polysaccharide of *Acetobacter methanolicus* MB 58/4 (IMET 10945). *Carbohydr. Res.* 218 (1991a) 247-251.
- Grimmecke, H.D.; Knirel, Y.A.; Kiesel, B.; Voges, M.; Rietschel, E.T.: Structure of the *Acetobacter methanolicus* MB 129 capsular polysaccharide, and of oligosaccharides resulting from degradation by bacteriophage Acm7. *Carbohydrate Res.* 259 (1994d) 45-58.
- Grimmecke, H.D.; Knirel, Y.A.; Shashkov, A.S.; Kiesel, B.; Lauk, W.; Voges, M.: Structure of the capsular polysaccharide and the O-side-chain of the lipopolysaccharide from *Acetobacter methanolicus* MB 70, and of oligosaccharides resulting from their degradation by the bacteriophage Acm6. *Carbohydrate Res.* 253 (1994b) 277-282.
- Grimmecke, H.D.; Mamat, U.; Kühn, I.; Shashkov, A.S.; Knirel, Y.A.: Structure of the capsular polysaccharide and the O-side-chain of the lipopolysaccharide from *Acetobacter methanolicus* MB 58 (IMET B346). *Carbohydrate Res.* 252 (1994a) 309-316.
- Grimmecke, H.D.; Mamat, U.; Lauk, W.; Shashkov, A.S.; Knirel, Y.A.; Vinogradov, E.V.; Kochetkov, N.K.: Structure of the capsular polysaccharide and O-side-chain of the lipopolysaccharide from *Acetobacter methanolicus* MB 58/4 (IMET 10945), and of oligosaccharides resulting from their degradation by the bacteriophage Acml. *Carbohydr. Res.* 220 (1991b) 165-172.
- Grimmecke, H.D.; Voges, M.; Knirel, Y.A.; Shashkov, A.S.; Lauk, W.; Kiesel, B.: Structure of the capsular polysaccharide and the O-side-chain of the lipopolysaccharide from *Acetobacter methanolicus* MB 135 (IMET 11402). *Carbohydrate Res.* 253 (1994c) 283-286.
- Gründig, M.W. and Babel, W.: The linear oxidation of formaldehyde to CO₂ as the proper energy generating sequence for the assimilation of methanol in *Acetobacter methanolicus* MB58. *Arch. Microbiol.* 149 (1987) 149-155.
- Gründig, M.W. and Babel, W.: Biochemical characterization of mutants of the facultatively ribulose monophosphate type methylotroph *Acetobacter methanolicus* MB 58 defective in C₁ metabolism. *Zbl. Mikrobiol.* 144 (1989) 539-545.

- Gründig, M.W. and Doronina, N.V.: Dissimilation of methanol in *Acetobacter* sp. MB58. Z. Allg. Mikrobiol. 24 (1984) 77-84.
- Hadas, H.; Einav, M.; Fishov, I.; Zaitsky, A.: Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. Microbiology 143 (1997) 179-185.
- Hänggi, U.J.: Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. FEMS Microbiol. Rev. 16 (1995) 213-220.
- Hanson, R.S.; Bratina, B.J.; Brusseau, G.A.: Methylotrophy and ecology of methylotrophic bacteria. In: Microbial growth on C1 Compounds (Eds.: Murrell, J.C.; Kelly, D.P.) Intercept Ltd., 1993, pp. 285-302.
- Hanson, R.S.; Tsien, H.C.; Tsuji, K.; Brusseau, G.A.; Wackett, L.P.: Biodegradation of low-molecular-weight halogenated hydrocarbons by methylotrophic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 7 (1990) 273-278.
- Hanson, R.S. and Wattenberg, E.V.: Ecology of methylotrophic bacteria. In: Biology of methylotrophic bacteria (Eds.: Goldberg, I.; Rokem, J.S.) Butterworth Publishers, 1991, pp. 325-348.
- Harayama, S.: Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997) 268-273.
- Harrison, D.E. and Hamer, G.: C₁ compounds as substrates for the production of single-cell protein. Biochem. Journal 124 (1971) 78-84.
- Helling, R.B.: Recognition of altered deoxyribonucleic acid in recombination. J. Bacteriol. 100 (1969) 224-230.
- Helling, R.: Ultraviolet light-induced recombination. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55 (1973) 752-757.
- Hennam, J.F.; Cunningham, A.E.; Sharpe, G.S.; Atherton, K.T.: Expression of eukaryotic coding sequences in *Methylophilus methylotrophus*. Nature 297 (1982) 80-82.
- Heyer, J.; Malashenko, Y.; Berger, U.; Bedkova, E.: Verbreitung methanotropher Bakterien. Z. Allg. Mikrobiol. 24 (1984) 725-744.
- Hill, C.: Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 (1993) 87-108.
- Holland, J. and Domingo, E.: Origin and evolution of viruses. Virus Genes 16 (1998) 13-21.
- Holloway, B.W.: Genetics of methylotrophs. In: Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and genetics. (Ed.: C.T. Hou). Boca Raton: CRC Press, 1984, pp. 87-106.
- Holloway, B.W.; Kearney, P.P.; Lyon, B.R.: The molecular genetics of C₁ utilizing microorganisms. An overview. Antonie van Leeuwenhoek 53 (1987) 47-53.

- Hongo, M.; Oki, T.; Ogata, S.: Phage contamination and control. In: The microbial production of amino acids. (Eds.: Yamada, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T.; Aida, K.) Kodansha Ltd., Japan, 1972, pp. 67-90.
- Hudson, L. and Hay, F.C.: Practical Immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications (1978).
- Hyypiä, T.; Hovi, T.; Knowles, N.J.; Stanway, G.: Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J. Gen. Virol. 78 (1997) 1-11.
- Ichikawa, T.; Tahara, T.; Hoshino, J.: Isolation and characterization of bacteriophages active against methanol assimilating bacteria. Abstracts II (1977) pp. 162-163. International Symposium on Microbial Growth on C₁-Compounds, Puschtschino, U.S.S.R.
- Jahng, D.; Kim, C.S.; Hanson, R.S.; Wood, T.K.: Optimization of trichloroethylene degradation using soluble methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b expressed in recombinant bacteria. Biotechnol. Bioeng. 51 (1996) 349-359.
- Jarvis, A.W.: Bacteriophages of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 72 (1989) 3406-3428.
- Kahmann, R.; Rudt, F.; Koch, C.; Mertens, G.: G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. Cell 41 (1985) 771-780.
- Kellenberger, E.: History of phage research as viewed by a European. FEMS Microbiol. Rev. 17 (1995) 7-24.
- Kellenberger, E.; Bolle, A.; Boy de la Tour, E.; Epstein, R.H.; Franklin, N.C.; Jerne, N.K.; Reale-Scrafati, A.; Sechaud, J.: Functions and properties to the tail fiber of bacteriophage T4. Virology 26 (1965) 419-440.
- Kiesel, B.; Mamat, U.; Wünsche, L.: Phagen methylotropher Bakterien. Wiss. Z. Karl-Marx- Univ. Leipzig, Math.-nat. wiss. Reihe 38 (1989a) 3, 287-295.
- Kiesel, B.; Wünsche, L.; Akhverdiyan, V.S.; Khrenova, E.A.; Gerassimov, V.A.; Krylov, V.N.: Vergleichende Charakterisierung einer Gruppe nahe verwandter Phagen des methylotrophen Bakteriums *Acetobacter methanolicus* (in Russisch). Genetika 25 (1989b) 1021-1027.
- Kim, J.S. and Davidson, N.: Electron microscope heteroduplex study of sequence relations of T2, T4, and T6 bacteriophage DNAs. Virology 57 (1974) 93-111.
- Kim, Y.M. and Lidstrom, M.E.: Plasmid analysis in pink fakultative methylotrophic bacteria using a modified acetone-alkaline hydrolysis method. FEMS Microbiol. Lett. 51 (1989) 125-130.
- Kim, C. and Wood, T.K.: Electroporation of pink-pigmented methylotrophic bacteria. Appl. Biochem. Biotechnol. 73 (1998) 81-88.
- Klaus, S.; Krüger, D.; Meyer, J.: Bakterienviren. Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart, 1992.

- Klepikova, F.S.; Beliaeva, N.N.; Zhdanov, V.G.; Tikhonenko, A.S.: Virulente und temperente Phagen von *Bacillus licheniformis*, dem Produzenten des Antibiotikums Bacitracin (in Russisch). *Mikrobiologiya* 47 (1978) 312-318.
- Kokjohn, T.A.: Transduction: Mechanism and potential for gene transfer in the environment. In: *Gene transfer in the environment* (Eds.: S. B. Levy and R.V. Miller) McGraw-Hill, Inc., 1989, pp. 73-97.
- Korn-Wendisch, F.; Schneider, J.: Phage typing-a useful tool in actinomycete systematics. *Gene* 115 (1992) 243-247.
- Krämer, P. and Heine, H.: Safety concepts, technological challenges and environmental benefits of bioprocesses. *Drugs Made in Germany* 37 (1994) 105-114.
- Krawiec, S. and Riley, M.: Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.* 54 (1990) 502-539.
- Krüger, D.H. and Bickle, T.A.: Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev.* 47 (1983) 345-360.
- Kutter, E.; Gacheleladze, K.; Poglazov, A.; Marusich, E.; Shneider, M.; Aronsson, P.; Napuli, A.; Porter, D.; Mesyanzhinov, V.: Evolution of T4-related phages. *Virus Genes* 11 (1996) 285-297.
- Kuzio, J. and Kropinski, A.M.: O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3. *J. Bacteriol.* 155 (1983) 203-212.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- Leak, D.J.: Biotechnological and applied aspects of methane and methanol utilizers. In: *Biotechnology Handbooks, Vol. 5, Methane and methanol utilizers* (Eds.: Murrell, J.C.; Dalton, H.) Plenum Press New York, 1992, pp. 245-279.
- Lewin, B.: *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 1998
- Lidstrom, M.E.: Genetics of carbon metabolism in methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 7 (1990) 431-436.
- Lidstrom-O'Connor, M.E.: Genetics of methylotrophy and methanotrophy. In: *Microbial chemoautotrophy* (Eds.: Strohl, W.R.; Tuovinen, O.H.), The Ohio State Univ. Press, Columbus, 1984, pp. 219-228.
- Lidstrom, M.E.; Anthony, C.; Biville, F.; Gasser, F.; Goodwin, P.; Hanson, R.S.; Harms, N.: New uniform nomenclature for genes involved in the oxidation of methanol in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 117 (1994) 103-106.

- Lidstrom, M.E. and Stirling, D.I.: Methylo-trophs: Genetics and commercial applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 44 (1990) 27-58.
- Lidstrom, M.E. and Wopat, A.E.: Plasmids in methanotrophic bacteria: isolation, characterization and DNA hybridization analysis. *Arch. Microbiol.* 140 (1984) 27-33.
- Lin, T.C.; Rush, J.; Spicer, E.K.; Konigsberg, W.H.: Cloning and expression of T4 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7000-7004.
- Lindqvist, B.H.; Deho, G.; Calendar, R.: Mechanisms of genome propagation and helper exploitation by satellite phage P4. *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 683-702.
- Loffhagen, N. und Babel, W.: Regulation der PEP-Carboxylase des fakultativ methylo-trophen *Acetobacter* sp. MB 58. *Z. allg. Mikrobiol.* 22 (1982) 453-463.
- Loffhagen, N. and Babel, W.: Localization of primary alcohol-oxidizing enzymes in the facultative methylo-trophic *Acetobacter* sp. MB 70. *Z. Allg. Mikrobiol.* 24 (1984) 143-149.
- Loffhagen, N. and Babel, W.: Energy conservation in whole cells of the acidophilic methylo-trophic bacterium *Acetobacter methanolicus* sp. MB 70. *J. Basic Microbiol.* 28 (1988) 71-81.
- Loveley, D.R. and Coates, J.D.: Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997) 285-289.
- Low, B.K. and Porter D.D.: Modes of gene transfer and recombination in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 12 (1978) 249-287.
- Madison, L.L. and Huisman, G.W.: Metabolic engineering of poly(3-hydroxy-alkanoates): From DNA to plastics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1999) 21-53.
- de Maeyer, E.; Skup, D.; Prasad, K.S.N.; de Maeyer-Guignard, J.; Williams, B.; Meacock, P.; Sharpe, G.; Pioli, D.; Hennam, J.; Schuch, W.; Atherton, K.: Expression of a chemically synthesized human alpha-1 interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4256-4259.
- Maillard, J.Y.: Bacteriophages: a model system for human viruses. *Lett. Appl. Microbiol.* 23 (1996) 273-274.
- Mamat, U.: Charakterisation der spezifischen Wechselbeziehungen zwischen dem fakultativ methanolassimilierenden *Acetobacter methanolicus* MB 58/4 und dem Phagen MO1. Dissertation, Akademie der Wissenschaften der DDR, Leipzig, 1989.
- Mamat, U.; Rietschel, E.T.; Schmidt, G.: Repression of lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* by an antisense RNA of *Acetobacter methanolicus* phage Acml. *Mol. Microbiol.* 15 (1995) 1115-1125.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., 1982.

- Maplestone, R.A.; Stone, M.J.; Williams, D.H.: The evolutionary role of secondary metabolites - a review. *Gene* 115 (1992) 151-157.
- Marmur, J.: Procedures for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 208-218.
- Martinez-Molina, E. and Olivares, J.: Antibiotic production by *Pseudomonas reptilovora* as a phagMe conversion. *Can. J. Microbiol.* 25 (1979) 1108-1110.
- Matsushita, K.; Takahashi, K.; Adachi, O.: A novel quinoprotein methanol dehydrogenase containing an additional 32-kilodalton peptide purified from *Acetobacter methanolicus*: *Biochemistry* 32 (1993) 5576-5582.
- Matsushita, K.; Takahashi, K.; Takahashi, M.; Ameyama, M.; Adachi, O.: Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of their methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. *J. Biochem. (Tokyo)* 111 (1992) 739-747.
- Mayo, M.A. and Pringle, C.R.: Virus taxonomy - 1997. *J. Gen. Virol.* 79 (1998) 649-657.
- McPheat, W.L.; Mann, N.H.; Dalton, H.: Transfer of broad host range plasmids to the type I obligate methanotroph *Methylomonas albus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 41 (1987) 185-188.
- Miksch, G.; Fiedler, E.; Dobrowolski, P.; Flaschel, E.: Controlled secretion into the culture medium of a hybrid β -glucanase by *Acetobacter methanolicus* mediated by the *kil* gene of *Escherichia coli* located on a Tn5-derived transposon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997) 530-536.
- Monod, C.; Repoila, F.; Kutateladze, M.; Tetart, F.; Krisch, H.M.: The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4. *J. Mol. Biol.* 28 (1997) 237-249.
- Montag, D.; Hashemolhosseini, S.; Henning, U.: Receptor-recognizing proteins of T-even bacteriophages. The receptor-recognizing area of proteins 37 of phages T4 TuIa and TuIb. *J. Mol. Biol.* 216 (1990) 327-334.
- Montiero, M.J.; Tupas, M.A.; Moffett, B.F.; Bainbridge, B.W.: Isolation and characterization of a high molecular weight plasmid from the obligate methanol-utilizing bacterium *Methylomonas (Methanomonas) methyllovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 15 (1982) 235-237.
- Moore, A.T.; Nayudu, M.; Holloway, B.W.: Genetic mapping in *Methylophilus methylotrophus* AS1. *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 785-799.
- Morinaga, Y. and Hirose, Y.: Production of metabolites by methylotrophs. In: *Methylotrophs, microbiology, biochemistry and genetics* (Ed.: Hou, C.I.) CRC Press, Boca Raton, 1984, pp. 87-105.
- Morris, C.E.; Klement, J.F.; McAllister, W.T.: Cloning and expression of the bacteriophage T3 RNA polymerase gene. *Gene* 41 (1986) 193-200.

- Mosig, G.; Colowick, N.; Gruidl, M.E.; Chang, A.: Multiple initiation mechanisms adapt phage T4 DNA replication to physiological changes during T4's development. *FEMS Microbiol. Rev.* 17 (1995) 83-98.
- Müller, R.H. and Babel, W.: Oxidative capacity determines the growth rate with *Acetobacter methanolicus*. *Acta Biotechnol.* 13 (1993) 3-11.
- Nelson, M.; Raschke, E.; McClelland, M.: Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3139-3154.
- Neville, D.M.: Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 6328-6334.
- Nnalue, N.A.; Newton, S.; Stocker, B.A.D.: Lysogenization of *Salmonella choleraesuis* by phage 14 increases average length of O-antigen chains, serum resistance and intraperitoneal mouse virulence. *Microb. Pathogen.* 8 (1990) 393-402.
- O'Connor, M.E.; Wopat, A.; Hanson, R.S.: Genetic transformation in *Methylobacterium organophilum*. *J. Gen. Microbiol.* 98 (1977) 265-272.
- O'Sullivan, D.; Coffey, A.; Fitzgerald, G.F.; Hill, C.; Ross, R.P.: Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter via sequential transfer of naturally occurring conjugative plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4618-4622.
- Ortel, S.: Phage-typing of *Listeria*. *Int. J. Food Microbiol.* 8 (1989) 241-243.
- Ozeki, H. and Ikeda, H.: Transduction mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 2 (1968) 245-278.
- Petroni, E.A.; Bocca, S.N.; Ielpi, L.: Sequence-specific DNA modification in *Acetobacter xylinum*. *Cell. Mol. Biol.* 42 (1996) 759-767.
- Plattner, H. und Zingsheim, H.P.: *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1987, p. 303.
- Pöhland, H.-D.; Schierz, V.; Schumann, R.: Optimization of gluconic acid synthesis by removing limitations and inhibitions. *Acta Biotechnol.* 13 (1993) 257-268.
- Poirier, Y.; Nawrath, C.; Somerville, C.: Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology (NY)* 13 (1995) 142-150.
- Porter, R.D.; Shoemaker, N.B.; Rampe, G.; Guild, W.R.: Bacteriophage-associated gene transfer in *Pneumococcus*: transduction or pseudotransduction? *J. Bacteriol.* 137 (1979) 556-567.
- Puniya A.K.; Singh, S.; Kumar, C.G.; Singh, K.: Single cell protein: A promising dietary substitute. *Indian J. Exp. Biol.* 33 (1995) 545-551.

- van de Putte, P. and Goosen, N.: DNA inversions in phages and bacteria. *Trends Genet.* 8 (1992) 457-462.
- van de Putte, P.; Plasterk, R.; Kuijpers, A.: A μ gin complementing function and an invertible DNA region in *Escherichia coli* K-12 are situated on the genetic element ϕ 14. *J. Bacteriol.* 158 (1984) 517-522.
- Ratcliff, S.W.; Luh, J.; Ganesan, A.T.; Behrens, B.; Thompson, R.; Montenegro, M.A.; Morelli, G.; Trautner, T.A.: The genome of *Bacillus subtilis* phage SPP1: the arrangement of restriction endonuclease generated fragments. *Mol. Gen. Genet.* 10 (1979) 165-172.
- van Regenmortel, M.H.; Bishop, D.H.; Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Calisher, C.H.: Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch. Virol.* 142 (1997) 1505-1518.
- Repoila, F.; Tetart, F.; Bouet, J.Y.; Krisch, H.M.: Genomic polymorphism in the T-even bacteriophages. *EMBO J.* 13 (1994) 4181-4192.
- Ripp, S. and Miller, R.V.: Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144 (1998) 2225-2232.
- Robakis, N.K.; Palleroni, N.J.; Boublik, M.; Despreaux, C.W.: Construction of a restriction map of the *Gluconobacter* bacteriophage A-1 genome. *J. Gen. Microbiol.* 131 (1985b) 2475-2477.
- Robakis, N.K.; Palleroni, N.J.; Despreaux, C.W.; Boublik, M.; Baker, C.A.; Churn, P.J.; Claus, G.W.: Isolation and characterization of two phages for *Gluconobacter oxydans*. *J. Gen. Microbiol.* 131 (1985a) 2467-2473.
- Roberts, I.S.: The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 285-315.
- Rudolph, V.: Bacteriophages in fermentation. *Process Biochem.* 13 (1978) 16-26.
- Ruttloff, H.: Die gegenwärtigen Entwicklungen auf ausgewählten Gebieten der Nahrungsmitteltechnologie. *Nahrung* 34 (1990) 629-659.
- Sandmeier, H. and Meyer, J.: Bacteriophages. In: *Biotechnology*, Vol. 1 (1993) 545-575.
- Sato, H.; Suzuki, T.; Yamada, Y.: Purification of restriction endonuclease from *Acetobacter aceti* IFO 3281 (AatII) and its properties. *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990) 3319-3325.
- Sattler, K.; Babel, W.; Wünsche, L.: Essigsäurebakterien - eine Gruppe von Mikroorganismen mit bedeutender technologischer Tradition und Perspektive. Übersicht über einige neuere Aspekte. *Zentralbl. Mikrobiol.* 145 (1990) 555-562.
- Schnaitman, C.A.; Smith, D.; Forn de Salsas, M.: Temperate bacteriophages which causes the production of a new outer membrane protein by *Escherichia coli*. *J. Virol.* 15 (1975) 1121-1124.

- Schocher, A.J.; Kuhn, H.; Schindler, B.; Palleroni, N.J.; Despreaux, C.W.; Boublik, M.; Miller, P.A.: *Acetobacter* bacteriophage A-1. Arch. Microbiol. 121 (1979) 193-197.
- Schröder R.; Maassen, A.; Lippoldt, A.; Börner, T.; von Baehr, R.; Dobrowolski, P.: Expression of the core antigen of hepatitis B virus (HBV) in *Acetobacter methanolicus* using broad-host-range vectors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 (1991) 631-637.
- Sellmer, S.; Sievers, M.; Teuber, M.: Morphology, virulence and epidemiology of bacteriophage particles isolated from industrial vinegar fermentations. System. Appl. Microbiol. 15 (1992) 610-616.
- Sharma, N.C.; Bhatia, R.; Singh, S.; John, P.C.; Kumar, S.; Singh, H.: Bacteriophage typing in *Salmonella bareilly*. Epidemiol. Infect. 112 (1994) 45-49.
- Sievers, M.; Ludwig, W.; Teuber, M.: Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodophila* and *Acidiphilum* species as a branch of acidophilic bacteria in the α -subclass of Proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. System. Appl. Microbiol. 17 (1994 a) 189-196.
- Sievers, M.; Ludwig, W.; Teuber, M.: Revival of the Species *Acetobacter methanolicus* (ex Uhlig et al. 1986) nom. Rev. System. Appl. Microbiol. 17 (1994 b) 352-354.
- Smith, G.E. and Summers, M.D.: The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzoyloxymethyl-paper. Anal. Biochem. 109 (1980) 123-129.
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-517.
- Spain, J.C.: Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol. 49 (1995) 523-555.
- Spanier J.G. and Cleary, P.P.: A restriction map and analysis of the terminal redundancy in the group A streptococcal bacteriophage SP24. Virology 130 (1983) 502-513.
- Stamm, W.W.; Kittelmann, M.; Follmann, H.; Trüper, H.G.: The occurrence of bacteriophages in spirit vinegar fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 (1989) 41-46.
- Studel, A.; Miethe, D.; Babel, W.: Bakterium MB 58, ein methylotrophes Essigsäurebakterium. Z. Allg. Mikrobiol. 20 (1980) 663-672.
- Stotzky, G.; Devanas, M.A.; Zeph, L.: Methods for studying bacterial gene transfer in soil by conjugation and transduction. Adv. Appl. Microbiol. 35 (1990) 57-169.
- Streisinger, G.; Emrich, J.; Stahl, M.M.: Chromosome structure in phage T4. III. Terminal redundancy and length determination. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57 (1967) 292-295.
- Süss, F.: Aufbau eines Transduktionssystems für *Streptomyces hygroscopicus* und den Phagen SH10. Dissertation, Akademie der Wissenschaften der DDR, 1981.

- Suzuki, T.; Sugimoto, E.; Tahara, Y.; Yamada, Y.: Cloning and nucleotide sequence of ApaLI restriction-modification system from *Acetobacter pasteurianus* IFO 13753. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (1996) 1401-1405.
- Sydow, B.: Gewinnung von Mutanten des methanolassimilierenden *Acetobacter* Stammes - *Acetobacter methanolicus* MB 58/4- als Stammespool für den Aufbau eines Transduktionssystems. Diplomarbeit, Karl-Marx-Universität Leipzig, Sektion Biowissenschaften/ Institut für technische Chemie, Leipzig, 1985.
- Tani, Y.: Production of useful chemicals by methylotrophs. *Biotechnology* 18 (1991) 253-270.
- Tatra, P.K. and Goodwin, P.M.: R-plasmid mediated chromosome mobilization in the facultative methylotroph *Pseudomonas* AM1. *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 2629-2632.
- Tetart, F.; Desplats, C.; Krisch, H.M.: Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: Recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity. *J. Mol. Biol.* 282 (1998) 543-556.
- Tetart, F.; Repoila, F.; Monod, C.; Krisch, H.M.: Bacteriophage T4 host range is expanded by duplications of a small domain of the tail fiber adhesin. *J. Mol. Biol.* 258 (1996) 726-731.
- Teuber, M.; Andresen, A.; Sievers, M.: Bacteriophage problems in vinegar fermentations. *Biotechnology Letters* 9 (1987) 37-38.
- Tsygankov, Y.D., Kazakova, S.M.; Kletzova, L.W.; Chistoserdov, A.Y.; Zerebrinski, I.G.; Chibizova, E.S.; Kasanzeva, D.I.; Werner, A.E.; Gak, E.P.: Neue Wege in der Entwicklung der Genetik methylotropher Bakterien (in Russisch). In: *Biologie und Physiologie Methylotropher*. (Ed. Trotzenko, Y.A.) Puschschino 1987, pp. 95-118.
- Ueda, S.; Matsumoto, S.; Yamane, T.: Transformation of a methylotrophic bacterium, *Methylobacterium extorquens*, with a broad-host-range plasmid by electroporation. *Annu. NY Acad. Sci.* 646 (1991) 99-105.
- Uhlig, H.; Karbaum, K.; Steudel, A.: *Acetobacter methanolicus* MB 58 sp. nov., an acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36 (1986) 317-322.
- Urakami, T.; Tamaoka, J.; Suzuki, K.-I.; Komagata, K.: *Acidomonas* gen. Nov. Incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 50-55.
- Urakami, T.; Tamaoka, J.; Suzuki, K.-I.; Komagata, K.: *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (1990) 116-121.
- Verma, V.; Qazi, G.N.; Parshad, R.; Chopra, C.L.: A fast spheroplast formation procedure in some 2,5-diketo-D-gluconate- and 2-keto-L-gluconate-producing bacteria. *Biotechniques* 7 (1989) 449-452.

- de Vries, G.E.; Kües, U.; Stahl, U.: Physiology and genetics of methylotrophic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 75 (1990) 57-102.
- Vrijbloed, J.W.; Madon, J.; Dijkhuizen, L.: A plasmid from the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica* capable of site-specific integration. J. Bacteriol. 176 (1994) 7087-7090.
- Warner, P.; Higgins, I.; Drozd, J.: Examination of obligate and facultative methylotrophs for plasmid DNA. FEMS Microbiol. Lett. 1 (1977) 339-342.
- Werner, B.: Untersuchungen an Phagen methylotropher Bakterien. Dissertation, Institut für technische Chemie Leipzig, Akademie der Wissenschaften der DDR, 1977
- Wilke, D.: Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and fermentation industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 (1999) 135-145.
- Williams, E. and Bainbridge, B.W.: Genetic transformation in *Methylococcus capsulatus*. J. Appl. Bacteriol. 34 (1971) 685-689.
- Wünsche, L.: Importance of bacteriophages in fermentation processes. Acta Biotechnol. 9 (1989) 395-419.
- Wünsche, L.; Fischer, H.; Kiesel, B.: Lysogenie und lysogene Konversion bei methylotrophen Bakterien. I. Nachweis des lysogenen Zustandes des fakultativ methanolassimilierenden Stammes *Acetobacter methanolicus* MB 58/1 und Charakterisierung seines temperenten Phagen MO 1. Z. Allg. Mikrobiol. 23 (1983 a) 81-94.
- Wünsche, L. und Kiesel, B.: Bakteriophagen als Risikofaktor in bakteriellen Fermentationsprozessen. Abh. Akad. Wiss. DDR, Abt. Math., Naturwiss., Technik 2N (1982) 103-113.
- Wünsche, L.; Kiesel, B.; Fischer, H.: Lysogenie und lysogene Konversion bei methylotrophen Bakterien. II. Lysogene Konversion bei fakultativ methanolassimilierenden *Acetobacter*-Stämmen. Z. Allg. Mikrobiol. 23 (1983 b) 189-196.
- Yamada, Y.; Hoshino, K.; Ishikawa, T.: The phylogeny of acetic acid bacteria based on partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetbacter* to the generic level. Biosci. Biotech. Biochem. 61 (1997) 1244-1251.
- Yamamoto, K.R.; Alberts, B.M.; Benzinger, R.; Awhorne, L.L.; Treiber, G.: Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylen glycol and ist application to large-scale virus purification. Virology 40 (1970) 734-744.
- Yang, S.H.; Song, T.S.; Kim, Y.M.: Transformation of methylotrophic bacteria by electroporation of pRO1727 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. Molecules and Cells 6 (1996) 225-228.
- Young, L.Y. and Häggblom, M.M.: Biodegradation of toxic and environmental pollutants. Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991) 429-435.

Lebenslauf

Bärbel Kiesel, geb. Ludwig
Leipziger-Str. 29
04457 Mölkau

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 6.8.1952
Geburtsort: Greifenhain
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

1959 bis 1967 Polytechnische Oberschule
1967 bis 1971 Erweiterte Oberschule
1971 Abitur

Studium

09/1971 - 06/1975 Studiengang Diplom-Biologie an der E.-M.-Arndt-Universität Greifswald
1975 Diplomprüfungen in Mikrobiologie und Physiologie der Mikroorganismen
1975 Diplomarbeit: „n-Alkanabbau durch Bakterien aus den Rügenschon Boddengewässern“, Betreuer: Prof. M. Weide.

Berufliche Tätigkeiten

1975 bis 1985 Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für Technische Chemie, Leipzig
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
1985 bis 1991 Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für Biotechnologie, Leipzig
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
1992 bis 1999 Umweltforschungszentrum, Leipzig
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit „Bakteriophagen für *Acetobacter methanolicus*: Risikofaktoren für technische Prozesse und Carrier für genetische Information“ von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt wurde. Die den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt. Ich habe keinen Promotionsberater hinzugezogen.

Bärbel Kiesel

Bärbel Kiesel

Leipzig, im November 1999

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie der Akademie der Wissenschaften der DDR begonnen und nach Unterbrechung am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, fertiggestellt. Für die Möglichkeit der Erstellung und Fertigstellung der Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Babel für die Ermutigung zur Fertigstellung der Arbeit, seine helfende Kritik und sein stetes, forderndes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wünsche für die Überlassung der Thematik und für hilfreiche Diskussionen.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. Kleinsteuber für die ausführliche Diskussion des Manuskriptes.

Frau Mihank danke ich ganz herzlich für die exzellente technische Assistenz und ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dipl.-Biologen Jorks danke ich für die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

Frau Dr. Feist verdanke ich die Einarbeitung in die Proteinanalytik.

Den Kollegen Dr. Akhverdian und Dr. Khrenova am WNII Genetika, Moskau verdanke ich die Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitstechniken sowie Hilfe bei der Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Acm-Phagen und von Phagengenomen.

Meinen Kollegen in der Sektion Umweltmikrobiologie möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Geduld in der Endphase der Fertigstellung der Arbeit ganz herzlich danken.

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Umweltmikrobiologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2225
Telefax 0341/235-2247