

## 1 Einleitung

Bakteriophagen sind Viren von Bakterien, wobei zwischen Phagen und Wirtszelle eine oft bis auf die Stammebene reichende Spezifität besteht.

Die ersten intensiveren Untersuchungen über Auflösungserscheinungen von Bakterien durch Phagen gehen auf den kanadischen Forscher FELIX d' HERELLE 1917 (39) zurück. Bereits 1915 hatte TWORT (75) Zerfallsvorgänge bei Staphylokokken durch Phagenwirkung beschrieben, seiner Veröffentlichung wurde jedoch keine Beachtung geschenkt. Nachdem er vorher bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen über Phagen berichtet hatte, veröffentlichte d'HERELLE im Jahre 1921 sein Buch mit dem Titel „Le bactériophage: son rôle dans l'immunité“. Seit d'HERELLES Entdeckung wurden in der Folge von vielen Autoren Bakteriophagen in Darmausscheidungen erkrankter und gesunder Menschen oder Tiere, aber auch in der freien Natur wie z.B. in Abwässern, nachgewiesen. Die Annahme d'HERELLES, daß es nur eine einzige Bakteriophagenart gäbe, wurde erst später widerlegt.

Zumeist bestehen Bakteriophagen wie andere Viren aus einer Proteinhülle (Kapsid), welche aus Kapsomeren aufgebaut ist. Das Kapsid umhüllt das Phagengenom (*core*), das entweder aus RNS oder aus DNS bestehen kann. Beide Nukleinsäurearten können dabei als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen und sind verantwortlich für die Replikation des Phagengenoms sowie die Synthese der Strukturproteine. Daneben gibt es Bakteriophagen, die neben Proteinen auch Lipoproteine enthalten oder im Falle der Plasmaviridae statt des Kapsides lediglich eine Virushülle aus Lipoproteinen haben. Bakteriophagen sind obligate Zellparasiten, sie besitzen keine energieliefernden Enzymsysteme (20).

Eine Klassifikation bekannter Bakteriophagen wurde 1967 von BRADLEY (18) aufgestellt. Diese sah eine Aufteilung der Phagen in sechs morphologische Grundtypen (A-F) vor. Die Typen A-C sind gemäß dieser Einteilung geschwänzte Phagen mit doppelsträngiger DNS. Der Schwanz ist beim Typ A kontraktile, bei den Typen B und C dagegen nicht. Typ C weist im Unterschied zu Typ A nur einen kurzen Schwanz auf. Der Typ D umfasst schwanzlose Phagen mit isometrischem Kopf, der aus großen Kapsomeren besteht und Einzelstrang-DNS enthält. Der ebenfalls schwanzlose, isometrische Phage vom Typ E besitzt dagegen ein aus kleinen Kapsomeren aufgebautes Kapsid und eine Einzelstrang-RNS als Nukleinsäure. Der letzte Typ F besteht aus flexiblen Filamenten. Das Genom liegt hier als Einzelstrang-DNS vor.

Gegenwärtig am meisten anerkannt ist die überarbeitete Einteilung der Bakteriophagen nach ACKERMANN (2), die neu entdeckte Phagentypen genauso berücksichtigt wie die variable Kopfgröße bei geschwänzten Phagen. Diese neue Klassifizierung sieht eine Unterteilung in 13

verschiedene Familien und Genera vor, die teilweise mit der Einteilung von BRADLEY übereinstimmt. Die wichtigsten Eigenschaften sind in Abbildung 1 und Tabelle 1 zusammengestellt.

Geschwänzte Phagen werden gemäß dieser Klassifikation zur Ordnung der *Caudovirales* zusammengefaßt und in die Familien *Myoviridae* (Schwanz dick und lang, kontraktile, entspricht Typ A nach BRADLEY), *Siphoviridae* (langer, nicht kontraktile Schwanz, Typ B nach BRADLEY) und *Podoviridae* (kurzer, nicht kontraktile Schwanz, Typ C nach BRADLEY) unterteilt. Die Untertypen A1-3, B1-3 und C1-3 resultieren aus unterschiedlichen Kopflängen der geschwänzten Phagen, was jedoch ein weniger wichtiges Merkmal für die Taxonomie darstellt. Den Typen D und E nach BRADLEY entsprechen die isometrischen Phagen mit 5 Familien und 9 Gattungen, so z.B. die *Microviridae* und *Leviviridae*. Eine sehr bemerkenswerte Form weisen die filamentösen (3 Familien, 4 Gattungen, F1-4) und pleomorphen Phagen (2 Familien und Genera, G1-2) auf.

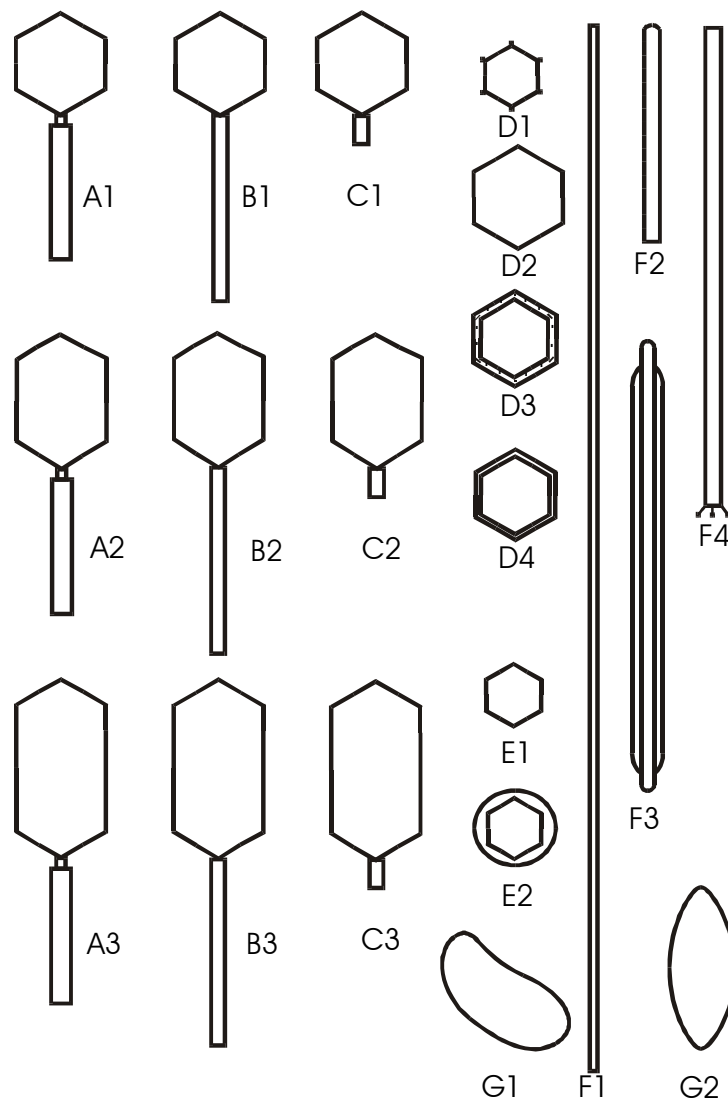


Abb. 1: Morphotypen der Bakteriophagen. Nach ACKERMANN (2, 5, 6)

Tabelle 1: Einteilung der Phagenfamilien und -genera. Nach ACKERMANN (2)

Morphotyp	Form	Genom	Familie	Genus	Einzelheiten
A1 bis A3	geschwänzt	DNS, ds, l	<i>Myoviridae</i>	--	Schwanz kontraktil
B1 bis B3		DNS, ds, l	<i>Siphoviridae</i>	--	Schwanz lang nicht kontraktil
C1 bis C3		DNS, ds, l	<i>Podoviridae</i>	--	Schwanz kurz
D1	isometrisch	DNS, ss, z	<i>Microviridae</i>	Microvirus Spiromicrovirus Bdellovirovirus Chlamydia microvirus	Auffällige Kapsomere
D3		DNS, ds, z, S	<i>Corticoviridae</i>	Corticovirus	Kapsid komplex, Lipide
D4		DNS, ds, l	<i>Tectiviridae</i>	Tectivirus	Kapsid doppelt, Pseudoschwanz Lipide
E1		RNS, ss, l	<i>Leviviridae</i>	Levivirus Allolevivirus	
E2		RNS, ds, l, seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cystovirus	Hülle, Lipide
F1	filamentös	DNS, ss, z	<i>Inoviridae</i>	Inovirus	Lange Filamente
F2		DNS, ss, z		Plectrovirus	Kurzer Stab
F3		DNS, ds, l	<i>Lipothrixviridae</i>	Lipothrixvirus	Hülle, Lipide
F4		DNS, ds, l	<i>Rudiviridae</i>	Rudivirus	TMV-ähnlich
G1	pleomorph	DNS, ds, z, S	<i>Plasmaviridae</i>	Plasmavirus	Hülle, Lipide kein Kapsid
G2		DNS, ds, z, S	<i>Fuselloviridae</i>	Fusellovirus	Zitronenform

z = zirkulär

l = linear

S = Superhelix

seg. = segmentiert

Bakteriophagen stellen die größte aller Gruppen unter den Viren dar und kommen sowohl in Eubakterien als auch in Archaeobakterien vor, entweder als Prophagen in lysogenen Wirtsstämmen oder frei in der Natur innerhalb einer weiten Spanne von Habitaten.

Die ersten elektronenoptischen Untersuchungen von Phagen erfolgten durch H. RUSKA im Jahr 1940. Seit 1959 sind mittlerweile ungefähr 5100 Bakteriophagen bekannt geworden, wovon die geschwänzten Phagen mit etwa 96% (ca. 4950 Phagen) die größte Gruppe darstellen. Innerhalb derselben gehören etwa 60,8% zu den *Siphoviridae*, 14,1% zu den *Podoviridae* und 25,1% zu den *Myoviridae*. Nur etwa 3,6% aller bekannten Bakteriophagen sind kubisch, filamentös oder pleomorph (2).

Der Prozeß der Phagenvermehrung läuft in mehreren Schritten ab. Die erste Phase, die Adsorption an die Wirtszelle, stellt eine spezifische Wechselwirkung zwischen viralen Proteinen und bakteriellen Rezeptoren dar. Geschwänzte Phagen adsorbieren mit dem distalen Schwanzende, schwanzlose Phagen heften sich mit Hilfe eines Hüllproteins an. Als Rezeptoren der Bakterienzelle können neben Proteinen und Polysacchariden auch Pili oder Flagellen dienen. Aus der spezifischen Wechselwirkung zwischen Phage und Rezeptor erklärt sich die hohe Wirtsspezifität. Bakterien ohne entsprechende Rezeptoren sind somit gegen Bakteriophagen resistent (18).

Nach erfolgter Adsorption penetriert nur die Nukleinsäure des Phagen in die Wirtszelle, während die Proteinhülle ausserhalb der Zelle verbleibt, die Nukleinsäure wird gewissermaßen in das Bakterium injiziert. Die nächste Phase umfasst den vom Virusgenom vorgegebenen Vermehrungszyklus in der Wirtszelle. Dabei sind zwischen virulenten und temperenten Phagen Unterschiede festzustellen. Bei virulenten Phagen erfolgt ein Arrest der wirtseigenen DNS/RNS- und Proteinsynthese. Statt dessen kommt es zur Replikation der viralen Nukleinsäuren und Translation der Phagenproteine, gefolgt von Zusammenbau und Freisetzung der neuen Bakteriophagen parallel zur Lyse der Zelle, die dabei zugrunde geht. Je nach Phagenart und Stamm sowie den physiologischen Wachstumsbedingungen dauert ein Reproduktionszyklus etwa 20-60 Minuten. Aus einer infizierten Bakterienzelle werden zwischen 20 und mehreren hundert Phagen freigesetzt, was als *burst size* (Wurfgröße) bezeichnet wird. Die Periode von der Infektion bis zum Auftreten des ersten reifen Phagen heißt Eklipse (20).

Bei temperenten Phagen wird das Phagen-genom in das Wirtsgenom integriert und mit diesem repliziert, ohne daß primär neue Phagenpartikel entstehen. Das integrierte Phagen-genom wird als Prophage bezeichnet, der abhängig von verschiedenen induzierenden Faktoren (z.B. UV-Licht) oder spontan in das virulente Stadium zurückkehren kann. Der zum Prophagenstadium führende Vorgang heisst Lysogenisation, der betroffene Bakterienstamm lysogen. Prophagen können bestimmte Leistungen oder Eigenschaften des betroffenen lysogenen Bakterienstammes

verändern. Wenn virale, in das Bakteriengenom integrierte Gene exprimiert werden, und keine virale, sondern eine bakterielle Funktion ausüben, spricht man von einer lysogenen Konversion. Ein bekanntes Beispiel ist die Toxinbildung bei Diphtheriebakterien, die auf der Wirkung eines Prophagen beruht. (7, 18, 20)

Im Bereich der Bakteriengenetik kommt der sogenannten Transduktion Bedeutung zu, bei der mit Hilfe eines Bakteriophagen genetisches Material von einer Bakterienzelle auf eine andere übertragen werden kann, was unter anderem für die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen von Bedeutung ist (20).

Seit der Erstbeschreibung der Bakteriophagen gab es Bemühungen, sie therapeutisch bei bestimmten Infektionen einzusetzen. Gerade in den Jahren nach Ihrer Entdeckung (1920 – 1940) wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, die jedoch nicht den gewünschten Erfolg brachten. Mit der Entwicklung hochwirksamer Antibiotika verlor dieser Anwendungsaspekt weiter an Bedeutung. Heute wird in verschiedenen Zentren noch vereinzelt an therapeutischen Anwendungen geforscht, beispielsweise zum Einsatz staphylokokkenspezifischer Bakteriophagen bei lokalen Infektionen (25). Besonders in den Ländern des ehemaligen Ostblockes wurden Phagen bereits erfolgreich bei der Behandlung eitriger Infektionen eingesetzt (4, 26). Global betrachtet sind die Ergebnisse jedoch, verglichen mit den ursprünglich in den therapeutischen Nutzen gesetzten Hoffnungen, eher enttäuschend.

Neben dem Einsatz in der Genetik werden Phagen heute vor allem zur Lysotypie bei epidemiologischen Studien verwendet, daneben auch zur Differenzierung verschiedener Spezies (20, 33, 35, 38). Dabei stellt für Typisierungsschemata vor allem die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ein wiederkehrendes Problem dar (64).

Außerdem wurden Phagen in verschiedenen Studien als Indikatoren fäkal-oraler/viraler Abwasserbelastung z.B. als Indikatoren für Enterovirus-Vorkommen in Wasserproben untersucht (12). Zusätzlich können Phagen als Modelle für das Verhalten von Enteroviren in Abwasserbehandlungsprozessen wie z.B. Desinfektion, Filtration, Koagulation usw. dienen (12). Besonders im Hinblick auf die Kontrolle etablierter Wasserbehandlungsverfahren oder die Formulierung von Qualitätsstandards für Wasser wäre ein zuverlässiger Indikator sehr von Nutzen (59). Idealerweise wäre die Isolation der Viren selbst anzustreben, was jedoch in der Praxis auf verschiedene Probleme wie z.B. zeitlicher Aufwand, Kosten, Variation und Präzision der Detektionsverfahren stößt. Phagen sind hinsichtlich Struktur, Komposition, Morphologie und Größe den Enteroviren ähnlich. Bakteriophagen mit Spezifität für *Bacteroides fragilis*, insbesondere für den Stamm HSP-40, wurden auf ihre mögliche Eigenschaft als Indikatoren von

viralen Verunreinigungen in Trinkwasser bzw. menschlicher fäkaler Wasserverunreinigungen untersucht (72). Diese Phagen haben denselben Ursprung wie humane Enteroviren, zeigen hohe Korrelation mit deren Anwesenheit und vermehren sich nicht signifikant unter natürlichen Umweltbedingungen. Bakterien der Gattung *Bacteroides* sind strikt anaerobe Keime und eine Hauptkomponente menschlicher Faeces. Es ist unwahrscheinlich, daß sie in der Natur frei vorkommen, folglich hätten infizierende Phagen das Potential als Virus-Indikatoren. In der Arbeit von TARTERA und JOFRE (72) konnten aus allen untersuchten Abwasserproben mit *Bacteroides fragilis* HSP-40 als Vermehrungsstamm Phagen isoliert werden, ebenso wie aus 10% der untersuchten menschlichen Faeces, was nach Meinung der Autoren die Anzahl der aus den Abwässern isolierten Phagen hinreichend erklärt. Dagegen war ein Phagennachweis für *Bacteroides fragilis* HSP-40 aus tierischen Faeces nicht erfolgreich. Bei den Untersuchungen konnte auch die bereits erwähnte hohe Speziespezifität wiederum beobachtet werden.

Auch die Verbesserung der Detektionsverfahren für Phagen aus Wasserproben aller Art sowie aus Faeces ist Gegenstand mehrerer Forschungsarbeiten. Dies beinhaltet unter anderem Vergleiche unterschiedlicher Filtrationsverfahren oder Variationen der verwendeten Nährlösungen und der Untersuchungsbedingungen (z.B. pH-Wert) (12, 24, 59, 60, 73).

Bakteriophagen mit Spezifität für anaerobe gramnegative Bakterienspezies waren bislang nur in geringem Umfang Gegenstand von Isolierungsversuchen. Die Suche konzentrierte sich vielmehr auf solche Wirtsbakterien, denen aus medizinischen, wirtschaftlichen oder anderen Gründen besonderes Interesse galt, wie z.B. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Staphylo-* und *Streptokokken* sowie den anaeroben Clostridien. Anaerobier haben jedoch gerade in den letzten Jahren als Erreger von Infektionen an Bedeutung gewonnen (14, 29, 50). Neben den bereits erwähnten *Clostridium-* und *Bacteroides-*Spezies muß auch Vertretern des Genus *Fusobacterium* Beachtung geschenkt werden. Fusobakterien sind wie Vertreter von *Bacteroides spp.* gramnegative, obligate Anaerobier. Nach ihrer ersten Beschreibung im späten 19. Jahrhundert unterlag die Taxonomie vielfältigen Änderungen (14). Aus medizinischer Sicht sind Fusobakterien wichtige Verursacher endogener pyogener Infektionen.

Der erste Phage, der anaerobe gramnegative Stäbchen als Wirtsbakterium besaß, war der für *Sphaerophorus varius* von HUET und THOUVENOT beschriebene Phage 277 (47). Da das Genus *Sphaerophorus* heute dem Genus *Fusobacterium* entspricht, war somit der erste für anaerobe gramnegative Stäbchen entdeckte Phage ein Vertreter mit Spezifität für eine Spezies des Genus *Fusobacterium* und zwar *F. varium*.

SABISTON und COHL (67) isolierten 1969 einen für *Bacteroides* spezifischen Phagen aus Abwässern, gefolgt von Untersuchungen wie z.B. von PREVOT et al. (65), NACESCU et al. (63), BRANDIS et al. (19), KELLER und TRAUB (52), BURT et al. (21), BOOTH et al. (15),

COOPER et al. (23), KORY und BOOTH (55), TARTERA und JOFRE (72) sowie HÖHNE et al. (42).

Für Fusobakterien wurden bisher nur 8 Phagen beschrieben. Ein Phage mit Spezifität für *F. necrophorum* wurde von TAMADA et al. (71) isoliert und ist morphologisch den Myoviren zuzuordnen, während der Phage 277 von *F. varium* (17, 47) zu den Podoviren gehört. ANDREWS et al. beschrieb 1997 ebenfalls einen für *F. varium* spezifischen Phagen (10), und BÖHME isolierte aus Abwasserproben 5 Bakteriophagen von *F. varium* (16), erstmals darunter auch Vertreter der *Siphoviridae* mit dieser Spezifität (44).

Das primäre Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand in der Isolierung und Charakterisierung weiterer Phagen mit Spezifität für einzelne Spezies des Genus *Fusobacterium*, um die insgesamt noch sehr begrenzte Palette der bislang von HUET und THOUVENOT (47), TAMADA et al. (71), ANDREWS et al. (10) sowie BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) beschriebenen Phagen zu erweitern.

Hierzu sollten Abwasserproben städtischer Kläranlagen unter Verwendung einer größeren Zahl von Stämmen verschiedener Spezies des Genus *Fusobacterium* als Vermehrungsstämme auf das Vorkommen von Phagen untersucht werden. Gleichzeitig war dabei der Frage nachzugehen, ob mit bestimmten Stämmen des Genus *Fusobacterium* häufiger Phagen als Hinweis auf virale fäkale Kontamination in Abwasserproben nachweisbar sind, als mit dem von TARTERA und JOFRE (72) als Universalindikator vorgeschlagenen Stamm HSP-40 von *Bacteroides fragilis*.

Die neuen Isolate waren an Hand ihrer biologischen, ultrastrukturellen und molekularbiologischen Merkmale eingehend zu charakterisieren und die Ergebnisse dieser Merkmalsbestimmungen mit denen der Untersuchungen von BÖHME (16) bzw. HÖHNE et al. (44) einer vergleichenden Wertung zu unterziehen. Ziel dieses Teils der Aufgabe war die Beantwortung der Frage, bei welchen Phagen es sich um eigene Entitäten handelt bzw. welche Isolate identische Phagen darstellen.

Ein besonderer Schwerpunkt der Untersuchungen betraf die Suche nach Fusobakterien-Phagen mit bisher bei diesen Bakterienviren noch nicht nachgewiesenen Morphotypen, namentlich solchen der zweithäufigsten Gruppe von Phagenultrastrukturen überhaupt, den *Myoviridae* mit dicken, kontraktilen Schwänzen (6).

Eine weitere Teilaufgabe bestand darin, durch Bestimmung der Lysisspektren einer möglichst großen Zahl individueller Stämme von *Fusobacterium varium* jene Phagen zu ermitteln, die innerhalb dieser Spezies möglichst viele der in die Untersuchungen einbezogenen Stämme zu lysieren vermögen, um durch Kombination von wenigen Phagen ein lytisch aktives Gemisch zu

erhalten, mit dem alle Vertreter dieser Spezies lysiert werden und dadurch einer Speziesbestimmung zugeführt werden können.

Die Untersuchung der Lysisspektren sollte darüber hinaus nicht nur zur Phagencharakterisierung beitragen, sondern gleichzeitig der Erkennung von Stämmen gelten, die von allen verfügbaren Phagenisolaten lysiert werden und die somit als universelle Indikatorstämme für den Nachweis von Phagen als virale Kontaminanten in Abwasserproben dienen könnten.

Schließlich war mit Hilfe der Bestimmung der spezifischen lytischen Aktivität der Frage nachzugehen, ob – vergleichbar zu anderen anaeroben Spezies – die Indolbildung (41) auch bei *Fusobacterium varium* eine speziesspezifische Eigenschaft darstellt oder ob sowohl indolpositive wie indolnegative Stämme von ein und demselben speziesspezifischen Phagen lysiert werden und beide somit tatsächlich – wie in der Literatur angegeben – zu einer einheitlichen Spezies gehören. Im letztgenannten Fall wären damit gleichzeitig Phagen gewonnen, die sich für Transduktionsexperimente innerhalb der Spezies *Fusobacterium varium* mit der Indolbildung als Unterscheidungsmerkmal zwischen Donatoren und Transduktanten eignen würden.

## 2 Materialien

### 2.1 Bakterienstämme

Insgesamt wurden 44 Stämme anaerober gramnegativer Stäbchen der Genera *Fusobacterium* und *Bacteroides* in die Untersuchungen einbezogen. Bei diesen Stämmen handelte es sich sowohl um Referenzstämme international anerkannter Stammsammlungen wie z.B. VPI, RMA und ATCC als auch um institutseigene Stämme, die aus klinischen Untersuchungsproben isoliert worden waren. Hinzu kamen einzelne Isolate anderer Laboratorien, die mit der Bitte um Identifizierung an das INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG eingesandt worden waren, sowie einige Stämme aus individuellen Stammsammlungen.

Für die Isolierung der Phagen wurden 29 Stämme eingesetzt. Davon gehörten 28 Stämme zum Genus *Fusobacterium*, wobei folgende Spezies vertreten waren: *F. varium* (11 Stämme), *F. mortiferum* (4 Stämme), *F. necrophorum* (10 Stämme), *F. gonidiaformans* (1 Stamm) und 2 nicht auf Speziesebene identifizierte Stämme. Zu Vergleichszwecken wurde ein Stamm von *Bacteroides fragilis* (HSP-40) in die Isolierungsversuche einbezogen. Für die Ermittlung der Lysisspektren wurden neben den für