

DNS-Längenstandards (PROMEGA):

1 kb DNA – Ladder (250 – 10000 bp)

Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker (125 – 21226 bp)

Weitere verwendete Materialien:

Ethidiumbromidlösung 1mg/ml (PROMEGA)

Polyethylenglycol 6000 (PROMEGA)

Agarose für DNS-Elektrophoresen (SERVA)

Blue/Orange loading dye (PROMEGA)

### **3 Methoden**

#### **3.1 Anaerobioseverfahren**

##### **3.1.1 Flüssigkulturen in BHI-Bouillon**

Die verwendeten Keime wurden aus dem jeweiligen Stammröhrchen entnommen und in eine frische BHI-Bouillon eingimpft. Zuvor war diese 10 Minuten lang im siedenden Wasser erhitzt, danach abgekühlt und mit 0,1 ml Kälberserum (KS) versetzt worden. Anschließend wurden die Röhrchen sofort mit einer 0,5 cm hohen Schicht steriler, verflüssigter Vaseline verschlossen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig erfolgte das Ausstreichen aerober Kontrollen auf Hammelblutagar und ebenfalls Inkubation für 18-24 Stunden bei 37° C.

##### **3.1.2 AnaeroGen-Topfsystem**

Verwendung fand ein standardisiertes Topfsystem der Firma OXOID (OXOID AnaeroGen). In einen 2,5 Liter fassenden Topf wurden die Platten bzw. Bouillons zusammen mit dem die Anaerobiose bewirkenden Papierbeutel und einem mit Resazurinlösung getränktem Baumwollindikatorstreifen (OXOID) zur Überprüfung des Redoxpotentials im Topf eingebracht. Das verwendete System bot den Vorteil, daß für die chemische Reaktion zur Entfernung des Sauerstoffs und die Freisetzung des Kohlendioxides keine Zugabe von Wasser erforderlich war.

## 3.2 Methoden zur Isolierung, Charakterisierung und Anreicherung der Phagen

### 3.2.1 Isolation von *Fusobacterium*-Phagen aus Abwasser

Die zwei verfügbaren Abwasserproben stammten aus dem Klärwerk Nord in Halle. Die Entnahme erfolgte nach ausschließlich mechanischer Reinigung des Abwassers.

Die frische Abwasserprobe wurde 30 min bei 13000 U/min und 4°C (Tischzentrifuge JOUAN MJ 22i) zentrifugiert und der Überstand durch ein bakteriendichtes Filter der Porengröße 0,45 µm (Filtropur S 0,45 – Spritzenfilter, SARSTEDT) filtriert. In einem 100 ml fassenden sterilen Erlenmeyerkolben wurden 10 ml 5fach konzentrierte BHI-Bouillon mit 40 ml des Abwasserfiltrates versetzt und 3 ml einer frischen Übernachtskultur (onc) des potentiellen Vermehrungsstammes hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Anaerobentopf bei 37°C für 18-24 h, worauf das Gemisch bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert und wiederum bakteriendicht filtriert wurde. Die Prüfung auf Anwesenheit von Phagen im Filtrat erfolgte sowohl im Spotttest als auch mit der Agar-Überschichtungsmethode (OL) nach ADAMS (7). Außerdem wurden vom Filtrat eine aerobe und eine anaerobe Wachstumskontrolle angelegt.

#### 3.2.1.1 Spotttest

Zur Durchführung des Spotttestes wurde in ein steriles Röhrchen 0,1 ml einer 1:10 verdünnten Übernachtskultur des Vermehrungsstammes in BHI-Bouillon gegeben. Anschließend wurde dieses Röhrchen mit 3,5 ml verflüssigtem, auf 52° C temperierten Weichagar versetzt und nach dem Mischen des Inhaltes 3 ml auf der BHI-Platte für den Spotttest ausgegossen. Die offene Platte wurde neben der Bunsenflamme stehen gelassen, bis der Weichagar verfestigt war. Danach wurde ein Tropfen des Filtrates auf die BHI-Platte aufgetropft. Diese blieb bis zum Antrocknen des Tropfens auf waagerechter Unterlage stehen. Anschließend erfolgte die Inkubation im Anaerobentopf bei 37° C für 24-48 h.

#### 3.2.1.2 Overlay

Zur Durchführung des „overlay“ (OL) wurden in ein steriles Röhrchen 0,4 ml des Filtrates und 0,1 ml der 1:10 verdünnten Übernachtskultur des Vermehrungsstammes pipettiert. Anschließend wurden 3,5 ml Weichagar dazugegeben, der Inhalt kurz gemischt und 3 ml davon auf einer BHI-

Platte ausgegossen. Nach dem Erstarren erfolgte die Inkubation dieser Platte zusammen mit der Petrischale für den Spotttest 24-48h im Anaerobentopf. Die Anwesenheit von Phagen war durch Plaquebildung im Bakterienrasen zu erkennen.

### 3.2.2 Bestimmung der Phagenkonzentration

Die Ermittlung der pfu erfolgte orientierend mit dem Spotttest bzw. definitiv mit der overlay-Methode unter Verwendung von Verdünnungen der Lysate bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-12}$ .

Für die Konzentrationsbestimmung im „overlay“ wurde demnach vom Phagenlysat eine geometrische Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-12}$  hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 0,4 ml Phagenlysat in einem sterilen Röhrchen mit 0,1 ml einer 1:10 verdünnten Übernachtskultur des Vermehrungsstammes und mit 3,5 ml verflüssigtem Weichagar gemischt und davon 3 ml auf einer BHI-Agarplatte ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten im Anaerobentopf bei  $37^{\circ}$  C für 24-48h inkubiert. Die Zahl der Plaques auf der Platte der höchsten Verdünnungsstufe wurde ausgezählt. Die Konzentration der Phagen im Lysat ergab sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Plaqueanzahl} \cdot 3,33}{\text{Verdünnungsstufe}} = \text{pfu / ml}$$

Zur Durchführung des Spotttestes wurde eine BHI-Platte, wie schon unter 3.2.1.1 beschrieben, mit einer Keimsuspension des Vermehrungsstammes in BHI-Weichagar überschichtet. Nach dem Verfestigen des Weichagars wurde von jeder Verdünnungsstufe des Phagenlysates ein Tropfen aufgebracht, an der offenen Flamme bis zum Trocknen des Tropfens belassen und anschließend im Anaerobentopf inkubiert. Plaquebildung im bewachsenen Weichagar zeigte die Anwesenheit von Phagen an. Die Routine-Test-Dilution entsprach der niedrigsten Phagenkonzentration, bei der der Spotttest gerade noch eine konfluente Lysis zeigte.

### 3.2.3 Klonierung der Phagen

Die Klonierung der Phagen erfolgte durch Einzelplaqueanreicherung (EPA) auf dem Indikatorstamm. Sie wurde wie folgt durchgeführt:

Ein 100 ml fassender Erlenmeyerkolben wurde mit 40 ml BHI-Bouillon gefüllt und 15 Minuten im siedenden Wasserbad behandelt. Nach dem Abkühlen wurden 15 Tropfen der Übernachtskultur des Vermehrungsstammes in den Kolben gegeben und gleichzeitig eine neue

BHI-Bouillon beimpft. Anschließend wurde von der „overlay“-Platte mit einem sterilen Lochbohrer ein einzeln stehender Plaque ausgestanzt und unter sterilen Bedingungen in den Kolben gegeben. Danach wurde über Nacht bei 37° C im Anaerobentopf inkubiert.

Am Folgetag wurde die BHI-Bouillon wiederum bei 13000 U/min für 30 min zentrifugiert und der Überstand durch ein bakteriendichtes Filter gegeben. Zur Konzentrationsbestimmung folgte nach jeder EPA eine Austitration des erhaltenen Lysates nach der „overlay“-Technik und parallel dazu im Spotttest. Die EPA wurde insgesamt 3 mal durchgeführt, wobei vom erhaltenen Lysat jeweils eine aerobe und anaerobe Kontrolle mitgeführt wurden.

### **3.2.4 Anreicherungstechniken**

Zur Phagenanreicherung wurde die Bouillonanreicherung (BA) eingesetzt. Für die BA erfolgte die Beimpfung des Vermehrungsstammes mit 1000 pfu des jeweiligen Phagenlysates. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie bei der EPA beschrieben. Wenn mit der Bouillonanreicherung keine für die weiterführenden Untersuchungen ausreichenden Titer erzielt werden konnten, kamen testweise sowohl die Einzelplaqueanreicherung als auch eine modifizierte Bouillonanreicherung mit Beimpfung von 100 bis 10000 pfu zum Einsatz.

### **3.2.5 Langfristige Aufbewahrung der Phagenlysate**

Ein Teil der Phagenlysate sollte nach Abschluß der Untersuchungen langfristig aufbewahrt werden. Dazu wurden 7 Eppendorf-Röhrchen pro Phage mit dem zur Lagerung vorgesehenen Lysat gefüllt. Jeweils 5 dieser Röhrchen wurden aus einer Mischung von 10 ml 87%igem Glycerin und 7,4 ml Phagenlysate befüllt (somit 50% Glycerol w/v). Zwei der Röhrchen blieben ohne jeglichen Zusatz. Die abgefüllten Eppendorf-Röhrchen wurden senkrecht stehend in Kartons verpackt und bei -73°C gelagert. Mit dieser Methode waren alle Phagen auch nach 1/2-1 Jahr noch aus den eingefrorenen Proben vermehrbar, wie sich in durchgeführten Anreicherungsversuchen und anschließenden Spot-Tests zeigte.

### **3.2.6 Bestimmung des Lysisspektrums**

Zur Bestimmung des Lysisspektrums wurde von jedem zu testenden Bakterienstamm eine Platte in der für den Spotttest beschriebenen Weise hergestellt. Nach dem Trocknen der Platten wurden die Phagenlysate in der RTD aufgetropft, wobei jeder Phage mit jedem Teststamm untersucht wurde. Die RTD ist diejenige Phagenlysateverdünnung, bei der im Spotttest eine gerade noch konfluente Lysis entsteht (RISCHE 1973). Sie wurde zuvor für jedes einzelne Phagenlysate bestimmt. Alle Phagen wurden mit einer speziellen Öse an verschiedenen Stellen auf dieselbe Platte mit dem zu testenden Stamm aufgebracht. Neben der RTD wurde auch eine 1000fache Konzentration der RTD in die Bestimmungen mit einbezogen.

### **3.2.7 Versuche zur Chloroformresistenz**

Zur Bestimmung der Chloroformresistenz über einen längeren Zeitraum wurden alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten Phagen herangezogen. Dazu wurden 40 ml Lysate eines Anreicherungsansatzes bekannten Titers geteilt. Es erfolgte eine Unterschichtung der einen Lysathälfte mit 0,5 ml Chloroform, während die andere Hälfte ohne Chloroform belassen wurde. Das Chloroform verblieb während der gesamten Untersuchungszeit in den Proben. Beide Proben wurden regelmäßigen Titerkontrollen anhand der overlay-Technik unterzogen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Der Chloroformtest ermöglicht die Unterscheidung zwischen Bakteriophagen mit und ohne dem Vorhandensein von Lipiden oder Lipoproteinen, die durch das Chloroform herausgelöst würden.

### **3.2.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden von Dr. W. Verhagen im INSTITUT FÜR VIROLOGIE UND SEUCHENHYGIENE der MEDIZINISCHEN HOCHSCHULE HANNOVER angefertigt. Dazu wurden zunächst 5 µl der Lysate auf einen Formvar-Kohlenstoff-Präparateträger aufgebracht, mit Aqua bidest. gewaschen und mit einer Lösung von 2% Uranylacetat kontrastiert. Die Aufnahmen erfolgten anschließend mit dem Elektronenmikroskop E 201 (Philips). Bei ungenügender Darstellung der Phagen aufgrund geringer Titer wurden diese einer Konzentration mittels Ultrazentrifugation unterzogen, die ebenfalls in Hannover stattfand. 2 ml des Phagenlysates wurden mit einer Beckman TL-100

Zentrifuge (Rotor TLS-55) bei 4°C und 25900 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Die weiteren Arbeitsschritte zur elektronenoptischen Aufnahme wurde dann wie oben beschrieben fortgesetzt. Bei der Auswertung erfolgte zur Ermittlung von Durchschnittswerten die Ausmessung der Phagen auf mehreren Aufnahmen. Zur anschließenden Größenberechnung wurden die Vergrößerungsfaktoren des optischen Systems herangezogen.

### 3.3 Methoden zur DNS-Analyse

#### 3.3.1 Präparation der Phagen-DNS

Die Präparation der DNS erfolgte in Anlehnung an SAMBROOK et al. (68). Neben einer dort beschriebenen und in unserem Institut schon erprobten Methode kam zusätzlich zur Extraktion der DNS aus dem jeweiligen Phagenlysate das Extraktions-Kit „WIZARD<sup>®</sup> Lambda Preps DNA Purification System“ der Firma PROMEGA zur Anwendung.

Zunächst wurden je 10 ml des vorbereiteten Phagenlysates in ein Zentrifugenröhrchen überführt, ein jedes mit 40 µl des mitgelieferten Nuclease-Mixes versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 4 ml des Präzipitationsagens zugegeben, langsam gemischt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gemisch 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und das Pellet in 500 µl Phagenpuffer (*phage buffer*) resuspendiert, wobei man mehrfach langsam an den Seiten des Zentrifugenröhrchens hinab pipettierte, um eine vollständige Resuspension zu erreichen. Die wieder in Lösung gebrachten Phagen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, 10 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert (ABOTT Tischzentrifuge) und der entstehende Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml des *purification resin* (Reinigungsagens) und Mischen folgten die eigentlichen Extraktionschritte. Dazu wurden von den mitgelieferten Spritzen die Stempel entfernt und die Spritzenkörper auf die Minisäulen aufgeschraubt. Das Gemisch aus Resin und Lysat wurde in diese Säulen pipettiert und der Stempel wieder in die Spritzen eingesetzt. Danach wurde der Inhalt in die Säule gedrückt. Anschließend wurden die Spritzen von den Minisäulen getrennt, der Stempel wieder entfernt und die Spritzen wieder mit den Säulen verbunden. Nach Zugabe von 2 ml 80%igem Isopropanol und Zentrifugation für 2 Minuten bei 10000 x g wurden die Minisäulen auf ein Eppendorf-Röhrchen aufgesetzt und je 100 µl auf 80°C erhitztes destilliertes Wasser oder TE-Puffer in die Säulen zugegeben. Den letzten Schritt der Extraktion stellte dann das unmittelbare Zentrifugieren der Minisäulen für 20 Sekunden bei 10000 x g dar. Dieser Schritt diente zum Sammeln der gereinigten DNS in den Eppendorf-Gefäßen. Die gereinigte DNS wurde bei -20°C gelagert. Alternativ zu dem Spritzen-System war eine Extraktion grundsätzlich

auch mit einer Vakuum-Pumpe möglich, die das Durchsaugen der verschiedenen Flüssigkeiten durch die Minisäulen übernahm. Dieses Verfahren kam nur bei einer der Extraktionen zum Einsatz.

### 3.3.2 Restriktionsanalyse der DNS

Zur auf die Extraktion folgenden Restriktionsanalyse wurden die Restriktionsendonukleasen *Eco* RI, *Hind* III, *Hinf* I, *Sau*3AI und *Ava* I der Firma PROMEGA verwendet. Gemäß den vom Hersteller mitgelieferten Vorschriften erfolgte der Ansatz bestehend aus Enzym, beiliegendem 10X-Puffer und Aqua bidest., anschließend wurde das Gemisch bei 37°C für eine bis eineinhalb Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese der Restriktionsansätze

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde die 1%ige DNS-Agaroselösung (SERVA) nach dem Aufkochen in die Gelgießeinrichtung eines Elektrophorese-Sets der Firma OWL (Gelgröße: 13,8 x 11,9cm ) überführt und der Kamm bis zum Erstarren des Geles eingehängt. Nach der Polymerisation des Geles wurde die TAE-Pufferlösung in die Kammern eingegossen, die Restriktionsansätze mit 1µl Blue/Orange Loading Dye (PROMEGA) versetzt und nach vorsichtigem Entfernen des Kammes in die Slots des Geles gefüllt. Ebenso wurden die beiden verwendeten DNS-Marker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 70 Minuten bei einer Spannung von 120 V. Abschließend wurde das Agarose-Gel in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt, unter dem Transilluminator im UV-Licht betrachtet und fotografiert.

Die Auswertung der Gele erfolgte computertechnisch, die Berechnung der Größenangaben der Banden anhand der mitgeführten Marker. Die im folgenden genannten Werte sind dabei jeweils gerundet. Dies ist sowohl bedingt durch die technischen Rahmenbedingungen, z.B. das Auflösungsvermögen des Agarosegels, als auch durch methodenbedingte mathematische Abweichungen.

### 3.4 Methoden zur Proteinanalyse

#### 3.4.1 Extraktion der Phagenproteine

Die Extraktion der Phagenproteine erfolgte nach den von SAMBROOK et. al. (68) beschriebenen Methoden. Das durch die Anreicherungstechniken gewonnene Phagenlysat mit einem Titer von mindestens  $10^8$  pfu/ml wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit SM-Puffer verdünnt, NaCl bis zu einer Konzentration von 1 M zugegeben und die Suspension für eine Stunde im Eisbad inkubiert. Präzipitate wurden 10 Minuten bei  $11000 \times g$  (Zentrifuge Jouan MJ 22i) und  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert, das Sediment verworfen und dem phagenhaltigen Überstand 1 g Polyethylenglykol (PEG) 6000 je 10 ml zugesetzt. Nach der Fällung über Nacht im Eisbad folgte die Zentrifugation bei  $11000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 20 Minuten, Verwerfen des Überstandes und vorsichtige Entfernung noch vorhandener Flüssigkeitsreste. Das Pellet wurde in 1 ml TM-Puffer resuspendiert. Zum Abtrennen verbliebener PEG- und bakterieller Reste wurde die Suspension mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol im Mischungsverhältnis 49:1 versetzt, 30 Sekunden intensiv gemischt und 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  und  $12000 \times g$  zentrifugiert.

Es folgte die Glycerolgradientenzentrifugation des wäßrigen, die Phagen enthaltenden Überstandes, wobei pro 10 ml – Zentrifugenröhrchen 2,5 ml 40% und 3 ml 5% Glycerol in TM-Puffer (v/v) vorgelegt wurden, nach Überschichten des Überstandes wurde mit TM-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Die Gradientenzentrifugation erfolgte für 90 Minuten bei  $130000 \times g$  und  $10^\circ\text{C}$  (OTC Kombi-Plus-Ultrazentrifuge SORVALL/DuPont, USA, Ausschwing-Rotor TH-641). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in  $50 \mu\text{l}$  0,065 M Tris/HCl (pH 6,8) gelöst. Dem resuspendiertem Pellet wurden je  $5 \mu\text{l}$  Glycerol, Mercaptoethanol und 23% wäßrige SDS-Lösung hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Weiterbehandlung erfolgte kurz vor der Elektrophorese.

#### 3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinelektrophorese wurde in einer Mighty Small II – Elektrophoreseapparatur (Hofer Scientifics), unter Verwendung eines 10 Slot-Kamms und  $8,0 \times 10,0$  cm Polyacrylamid-Gelen (SDS-Trenngel 12%, SDS-Sammelgel 6%) durchgeführt. Zum Gießen des Geles diente die mitgelieferte Einrichtung, in der die abgedichteten und mit Abstandhaltern versehenen Platten gehalten wurden. Das Trenngel wurde bis etwa 3 cm unter den oberen Rand eingefüllt und mit  $100 \mu\text{l}$  Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen des Geles zu verhindern. Nach Polymerisation des Trenngels wurde der Isopropylalkohol mit Hilfe von Filterpapier vorsichtig

entfernt und mit Sammelgel bis zum oberen Rand aufgefüllt. Anschließend wurde der Kamm unter Vermeidung von Blasenbildung aufgesetzt und das Gel bis zur Polymerisation stehen gelassen. Nach Entfernung des Kammes folgte das Einsetzen des Geles in die Elektrophoreseapparatur, deren Kammern mit SDS-Laufpuffer gefüllt wurden. Vor Beginn der Elektrophorese wurden die Proteinproben (zwischen 10 und 25  $\mu$ l) bis zu einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l mit Probenpuffer aufgefüllt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert (Heizblock). Nach dem Abkühlen wurden die Proben und ein Proteinstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA und 300 V und wurde, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers den Unterrand des Geles erreicht hatte, nach etwa 1 Stunde beendet. Nach Behandlung des Geles in der Fixierlösung für 1/2-1 Stunde stellte die Färbung des Geles den Abschluß dar.

### 3.4.3 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele

Zur Färbung der Gele diente die Färbetechnik mit Comassie-Blau R-250 (PROMEGA). Im vorbereiteten Färbegrad wurde das Gel auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten behandelt und danach solange im Entfärbegrad belassen, bis die Banden deutlich sichtbar wurden bzw. sich das Gel ausreichend entfärbt hatte. Die Entfärbelösung wurde dabei regelmäßig ausgetauscht. Die gefärbten Gele wurden abfotografiert oder mit einem an einen Computer angeschlossenen Scanner eingelesen und anschließend getrocknet. Die Auswertung der Gele erfolgte anhand der mitgeführten Größenstandards.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung und Vermehrung der Phagen

Die Isolierungsversuche erfolgten aus 2 Abwasserproben, beide wurden in zeitlichem Abstand dem Klärwerk Nord in Halle/Saale jeweils nach ausschließlich mechanischer Reinigung dem Zulauf entnommen.

Die Prüfung auf Anwesenheit virulenter Bakteriophagen erfolgte mit den in Tabelle 2 (2.1) dargestellten Bakterienstämmen der Genera *Fusobacterium* und *Bacteroides* nach der im Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Methode der Originalanreicherung