

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches  
Gesundheitswesen

(LeiterIn: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Martin Wagner, Dipl.ECVPH)

**Virulenzgene und deren Vorkommen in Prophagen von *Salmonella***

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Elisabeth Sattler, B.Sc.

Wien, im Dezember 2020

Betreut von:

**Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH**

Begutachtet von:

**Priv.-Doz. Dr.rer.nat. Peter Rossmannith**

## **Danksagung**

Für diese Arbeit möchte ich mich als erstes bei meiner Betreuerin, Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH, bedanken. Danke für den Vorschlag des Themas, für die Bewahrung des organisatorischen Überblicks während des Versuchs sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein weiteres Dankeschön gebührt Priv.-Doz. Dr.rer.nat. Peter Rossmann, der diese Arbeit begutachtet hat.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Dimitrij Sofka bedanken, der tatkräftig die Arbeit im Labor bei der Durchführung des Experiments unterstützt hat.

Außerdem ein großes Dankeschön an Lisa Trofeit, Studienkollegin und Freundin, für die ach so gute Zusammenarbeit, Unterstützung, Beratung und die vielen lebenserheiternden Momente!

Vielen Dank für die Zusammenarbeit!

## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>6</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Virulenzgene in Salmonella</i>	8
2.1.1 <i>sopE</i>	8
2.1.2 <i>sspH1</i>	8
2.1.3 <i>gipA</i>	9
2.1.4 <i>sefC</i>	9
2.1.5 <i>spvC</i>	9
2.1.6 <i>arnC</i>	10
2.2 <i>Bakteriophagen</i>	10
2.2.1 Lebenszyklus der Phagen	10
2.2.1.1 Lytischer Zyklus	10
2.2.1.2 Lysogener Zyklus	11
2.2.2 Übertragung von Virulenzgenen	12
2.2.2.1 Allgemeines	12
2.2.2.2 Beispiele für Virulenzgenen, die von Phagen getragen werden	12
2.2.2.3 Übertragung von Virulenzgenen in <i>Salmonella</i>	13
2.2.2.4 Gentransfer zwischen Phagen	14
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 <i>Material</i>	15
3.1.1 LB-Agarplatten	15
3.1.2 LB-Broth	15
3.1.3 ssLB-Agar (semisolider Agar)	15
3.1.4 MH Broth <sup>+</sup> MC-Medium	15
3.1.5 Prophageninduktionspuffer (PI-Puffer)	16
3.1.6 Gelherstellung	16
3.1.7 Weitere Materialien	16
3.2 <i>Methoden</i>	17
3.2.1 Anzüchten der Wirtsstämme	17
3.2.2 Anzüchtung der Bakterien	18
3.2.3 Optische Dichtebestimmung	18
3.2.4 Prophageninduktion	18

3.2.5	Bakteriophagennachweis	19
3.2.6	Auswertung der Platten	20
3.2.7	Reinigung des Phagenlysates von extrachromosomaler Bakterien-DNA	21
3.2.8	PCR	21
3.2.9	Gelelektrophorese	22
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1	<i>Salmonella Typhimurium</i>	23
4.1.1	Prophagen aus <i>Salmonella Typhimurium</i>	23
4.1.2	Virulenzgenfragmente in Prophagen aus <i>Salmonella Typhimurium</i>	26
4.2	<i>Salmonella Enteritidis</i>	29
4.2.1	Prophagen aus <i>Salmonella Enteritidis</i>	29
4.2.2	Virulenzgene in Prophagen aus <i>Salmonella Enteritidis</i>	32
4.3	<i>Vergleich von Salmonella Typhimurium und Salmonella Enteritidis</i>	32
4.3.1	Vergleich der Phagen	32
4.3.2	Vergleich der Virulenzgene	33
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
5.1	<i>Prophagenisolierung</i>	34
5.2	<i>Virulenzgene</i>	34
5.3	<i>Optimierung der Methodik</i>	35
5.4	<i>Weiterführende Arbeiten</i>	35
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>37</b>
6.1	<i>Deutsche Abfassung</i>	37
6.2	<i>English version</i>	38
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>39</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>41</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>46</b>
9.1	<i>Abbildungen</i>	46
9.2	<i>Tabellen</i>	47

## 1. Einleitung und Fragestellung

Salmonellen zählen nach *Campylobacter* zu den wichtigsten Krankheitserregern im Lebensmittelbereich (EFSA und ECDC 2018). Allein im Jahr 2018 wurden in Europa 91.857 Fälle bestätigt, von denen 11.581 auf kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser zurückzuführen waren (EFSA und ECDC 2018). Weltweit gesehen werden jährlich geschätzt rund 93,8 Millionen Fälle gastrointestinaler Erkrankungen *Salmonella* zugeschrieben, mit in etwa 80,3 Millionen, die durch Lebensmittel verursacht werden (Majowicz et al. 2010). Dieses Problem betrifft sowohl Entwicklungs- als auch Industrieländer (Mahmoud et al. 2018) und ist somit von allgemeinem Interesse.

*Salmonella* kann in mehr als 3.000 Serovare unterteilt werden (El-Sharkawy et al. 2017). Der häufigste Erreger für Salmonellose weltweit ist *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Mølback et al. 2002).

In der Evolution von Salmonellen spielen Bakteriophagen, kurz Phagen genannt, eine wichtige Rolle (Ehrbar und Hardt 2005). Phagen sind seit 1915 bekannt (Housby und Mann 2009). Es handelt sich dabei um Viren, die Bakterien befallen und diese lysieren (Akhtar et al. 2014, Nabil et al. 2018). Sie können aber auch als sogenannte Prophagen für eine unbestimmte Zeit in das Genom des Wirtsbakteriums eindringen und Erbmaterial von vorangegangenen Infektionen mitbringen. Dieser Mechanismus des horizontalen Austauschs genetischen Materials zwischen sowohl gleichen als auch unterschiedlichen Bakterienarten sorgt dafür, dass sich Bakterien schnell an neue Umgebungen oder Stresssituationen anpassen können und wird als Transduktion bezeichnet. Virulenzgene, Abschnitte eines Genoms, die für die Pathogenität eines Organismus kodieren (Wassenaar und Gastra 2001), können auf diese Weise horizontal übertragen werden (Ehrbar und Hardt 2005). Neben Genen, die für Toxine kodieren, können Phagen auch Virulenzfaktoren, die zum Beispiel die Adhäsionsfähigkeit ihrer Wirten, deren Eindringvermögen in Zellen, ihre Immunresistenz und die Biofilmbildung erhöhen, weitergeben (Rice et al. 2009). Dieser lysogene Austausch an Genmaterial ist für einen Großteil der Vielfalt an Effektorproteinen, die in *Salmonella* spp. gefunden werden können, verantwortlich (Miroid et al. 2001).

In dieser Arbeit wird der Hypothese nachgegangen, inwieweit Prophagen aus Salmonellen aktiviert werden können — darunter versteht man, einen Prophagen, der im Genom eines Wirtes eingebaut ist, wieder in den lytischen Zyklus zu bringen — und inwiefern diese aktivierten Prophagen Virulenzgene mitnehmen. Dazu wurden 50 *Salmonella* Typhimurium

und 50 *Salmonella* Enteritidis Isolate der Gefrierstocksammlung der Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Österreich, induziert, Prophagen zu exprimieren. Diese Phagen wurden isoliert und ihre DNA mittels PCR und Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von sieben Virulenzgenen (*sopE* 50/51, *sopE* 44/45, *sspH1*, *sefC*, *spvC*, *arnC*, *gipA*) untersucht. Einige von diesen (*sopE*, *sspH1*, *gipA*) sind bekannt dafür, dass sie an das Vorhandensein von Prophagen geknüpft sind (Ehrbar und Hardt 2005, Proroga et al. 2019).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Virulenzgene in *Salmonella*

Virulenzgene können an verschiedene DNA-Sequenzen gebunden sein. Demnach können sie entweder in engem Zusammenhang mit Plasmiden, dem Genom der Wirtszelle selbst oder auch mit Viren stehen. Die ersten drei der nachstehenden Virulenzgenfragmente sind bekannt dafür, dass sie mit Bakteriophagen in Verbindung stehen.

#### 2.1.1 *sopE*

*SopE* ist ein Virulenzgen, das von *Salmonella enterica* exprimiert wird (Ozbuyukkaya et al. 2014). Es handelt sich dabei um ein Effektorprotein, welches durch Phagen kodiert wird und so zwischen verschiedenen Salmonellenisolaten transduziert werden kann (Ehrbar und Hardt 2005). Das Protein SopE wird von dem für die Invasion (*Salmonella* ist ein fakultativ intrazellulär pathogenes Bakterium) notwendigen „Type III secretion system-1“ (TTSS-1) bei Zellkontakt abgesondert. Da SopE aber auch nach der Zellinvasion sezerniert wird, ist es ebenso für die frühe intrazelluläre Replikation der Salmonellen in der Wirtszelle nötig (Vonaesch et al. 2014)

Angriffspunkt von SopE sind Proteine der RhoGTPase Familie (Friebel et al. 2001, Ozbuyukkaya et al. 2014). Durch die Interaktion mit diesen wird das Aktinzytoskelett der Wirtszelle verändert und dadurch die Zellmembran derselben aufgeraut, was den Eintritt von Salmonellen in die Zelle erlaubt (Galan und Zhou 2000).

Da *sopE* häufig bei Isolaten des Serovars Typhimurium vorkommt und oft bei Ausbruchsisolaten identifiziert wird, kann angenommen werden, dass SopE ebenfalls eine wichtige Rolle für das Überleben dieser Bakterien in der Umwelt besitzt (Ehrbar et al. 2002).

#### 2.1.2 *sspH1*

Die Ubiquitinligase SspH1 ist ein weiteres an Phagen gebundenes Virulenzprotein, das von *sspH1* kodiert wird (Ehrbar und Hardt 2005). Es kommt in *Salmonella* und ebenso in einer Reihe anderer gramnegativer, pathogener und intrazellulärer Bakterien vor. SspH1 ist ein Effektorprotein, welches von Bakterien, ebenso wie SopE, durch ein „Type III secretion system“ sezerniert wird und seine Wirksamkeit in Eukaryotenzellen entfaltet. Es interagiert mit der eukaryotischen Proteinkinase 1, der PKN1, und reguliert damit verschiedene Signalwege

durch die Reduktion der NF- $\kappa$ B—Freisetzung, wodurch die Produktion proinflammatorischer Zytokine niederreguliert wird (Haraga und Miller 2006). Dies ermöglicht *Salmonella* ein intrazelluläres Überleben und die intrazelluläre Vermehrung.

### **2.1.3 *gipA***

Bei *gipA* handelt es sich um ein Virulenzgen des Serovars Typhimurium (Stanley et al. 2000). Es wird vor allem in der frühen Phase einer Infektion exprimiert, wenn Bakterien den Dünndarm besiedeln (Stanley et al. 2000). Lokalisiert ist das *gipA*-Virulenzgen auf dem lambdoid Phagen Gifsy-1 (Stanley et al. 2000). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass *gipA* auch in einer bestimmten Gruppe von *Escherichia coli*-Isolaten vorkommen kann. In diesen adhärent invasiven *E. coli* nimmt *gipA* eine wichtige Rolle bei der Invasion der Bakterien in die Zellen der Peyer'schen Platten im Gastrointestinaltrakt ein, von welchen sich die Erreger zu den mesenterialen Lymphknoten ausbreiten können (Vazelle et al. 2016).

### **2.1.4 *sefC***

*SefC* bildet gemeinsam mit *sefA* und *sefB* ein Codon für die Biosynthese von *SEF14* (Clouthier et al. 1993). *SEF14* sind dünne, filamentöse Fimbrien, die von *S. Enteritidis* gebildet werden (Clouthier et al. 1993) und essentiell für die volle Virulenz dieses Bakteriums sind (Edwards et al. 2000). Diese Fimbrien dienen der Interaktion zwischen Bakterien und Phagozyten des Wirts (Edwards et al. 2000). *SefC* kodiert für Wandproteine der Zellmembran und wird nur in Anwesenheit des *sefA*-Gens exprimiert (Clouthier et al. 1993). *SEF14* ist in *S. Enteritidis* vertreten, wurde aber noch nicht in *S. Typhimurium* beschrieben (Edwards et al. 2000).

### **2.1.5 *spvC***

Ein in *Salmonella* durch Plasmide übertragenes Virulenzgen ist *spvC* (Mazurkiewicz et al. 2008, Proroga et al. 2019). Das Protein SpvC kann sowohl durch das TTSS-1 wie auch durch TTSS-2 sezerniert werden. Es interagiert mit der wirtseigenen mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) (Li et al. 2007) und inhibiert durch die Hemmung der Produktion von IL-8 und TNF- $\alpha$  die proinflammatorische Immunabwehr (Mazurkiewicz et al. 2008). Dadurch werden die Inflammation des Wirtsgewebes und die Infiltration mit neutrophilen Leukozyten reduziert. Dies ermöglicht eine Besiedelung von Milz und Leber bei einer generalisierten Erkrankung und trägt zur vollständigen Virulenz von *S. Typhimurium* in Mäusen bei (Matsui et al. 2001).

### 2.1.6 *arnC*

*ArnC* gehört zu dem *arn*-Operon, das in der Zelle unter anderem für den Aufbau der Lipopolysaccharidmembran verantwortlich ist (Lin et al. 2014). Das *arn*-Operon wird durch  $\text{Fe}^{3+}$  aktiviert und führt zu einer Lipopolysaccharidmodifikation, die es gramnegativen Bakterien ermöglicht, ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber kationischen, antimikrobiellen Polypeptiden wie Polymyxin B zu erhöhen (Lin et al. 2014).

## 2.2 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind kleine Viren (Jamal et al. 2019), die in der Umwelt ubiquitär vorkommen und als natürliche Antimikrobiotika eine Rolle spielen (Huang et al. 2018). Sie haben eine durchschnittliche Größe von 35—200 kb (Akhtar et al. 2014, Petsong et al. 2019) bzw. 20—200 nm (Jamal et al. 2019) und zeigen meist eine Thermostabilität im Bereich von 30—70 °C (Mahmoud et al. 2018). Ihr Wirkspektrum liegt im pH-Bereich von 3—13 (Huang et al. 2018). Als ubiquitär vorkommende Mikroorganismen sind Phagen ein wichtiger Bestandteil des Ökosystems (Wommack et al. 1992).

### 2.2.1 Lebenszyklus der Phagen

Wie andere Viren brauchen auch Phagen eine Wirtszelle, um sich replizieren zu können (Jamal et al. 2019). Phagen besitzen einen Kopf, der ihre DNA trägt, und einen Schwanz, durch den die DNA in eine Wirtszelle eingeschleust wird (Sharma et al. 2017). In der Zelle angekommen gibt es zwei Replikationsmechanismen, derer sich Phagen bedienen: den lytischen und den lysogenen Zyklus (Sharma et al. 2017). Ob Phagen sich für den einen oder den anderen Zyklus entscheiden, steht unter anderem in Abhängigkeit vom Nährzustand der Wirtszelle und von weiteren Phagen, die die Zelle befallen haben (Oppenheim et al. 2005, Zeng et al. 2010, Fortier und Sekulovic 2013).

#### 2.2.1.1 Lytischer Zyklus

Phagen, die einen lytischen Lebenszyklus aufweisen, werden virulente Phagen genannt (Sharma et al. 2017). Diese injizieren ihre DNA in die bakterielle Wirtszelle, welche dort durch die Zellorganellen vervielfältigt wird (Sharma et al. 2017). Dadurch entstehen innerhalb der Zelle 50—200 neue Phagen sowie weitere Transkriptionsprodukte der Phagen-DNA (Jamal et al. 2019). Infolge der steigenden Anzahl an Phagen und den von ihnen gebildeten, lytischen Proteinen wird der Druck auf die Zellmembran der Wirtszelle immer größer, wodurch sie im

Endeffekt reißt und die neuen Phagen in die Umgebung freigegeben werden (Sharma et al. 2017, Jamal et al. 2019).

### **2.2.1.2 Lysogener Zyklus**

Entscheidet sich ein Phage für den lysogenen Zyklus, verhindert ein Phagenrepressor die Transkription eines Großteils der Phagen-DNA inklusive des Teil, der für den lytischen Zyklus verantwortlich ist (Fortier und Sekulovic 2013). Die erste Phase — auch lysogene Phase genannt — dieses zweiteiligen Lebenszyklus, der bei temperenten Phagen vorkommt (Fillol-Salom et al. 2019), endet darin, dass die Phagen-DNA in das Genom der bakteriellen Wirtszelle eingebaut wird (Jiang und Paul 1998, Díaz-Muñoz und Koskella 2014, Sharma et al. 2017, Jamal et al. 2019). Infolgedessen wird diese DNA gemeinsam mit der Bakterien-DNA vermehrt und in die Tochterzellen weitergegeben (Jiang und Paul 1998, Díaz-Muñoz und Koskella 2014, Jamal et al. 2019). Dabei kann auch die phänotypische Erscheinung des infizierten Bakteriums verändert werden (Sharma et al. 2017). So kann zum Beispiel die Virulenz eines Bakteriums durch den Einbau von Phagen-DNA und den darin enthaltenen Virulenzgenen verändert werden (Brüssow et al. 2004).

Dieser in das Bakteriengenom eingebaute DNA-Abschnitt eines Phagen wird auch als Prophage bezeichnet (Jamal et al. 2019). Prophagen bieten ihrer Wirtszelle oft Schutz gegenüber der Infektion mit anderen, strukturell ähnlichen, lytischen Phagen und sichern so auch ihr eigenes Fortbestehen (Jiang und Paul 1998). Auch in temperenten Bakteriophagen sind lytische Gene enthalten, welche dazu führen können, dass der Phage in die zweite Phase seines Lebenszyklus, in die lytische Phase, übergeht (Díaz-Muñoz und Koskella 2014, Jamal et al. 2019). Dies kann durch verschiedene externe Stimuli hervorgerufen werden und endet damit, dass eine Vielzahl an Phagen aus den Nachkommen der ursprünglich infizierten Bakterienzelle freigegeben wird (Jiang und Paul 1998).

Verliert ein Prophage die Fähigkeit, seine Wirtszelle nach der lysogenen Phase wieder zu verlassen, kann er zu einem sogenannten kryptischen Prophagen werden (Díaz-Muñoz und Koskella 2014). Kryptische Phagen können vorteilhafte Einflüsse auf ihre Wirtszellen haben (Díaz-Muñoz und Koskella 2014), indem sie z.B. deren Stressresistenz gegenüber Umwelteinflüssen wie oxidativen oder osmotischen Stress erhöhen (Wang et al. 2010).

## 2.2.2 Übertragung von Virulenzgenen

### 2.2.2.1 Allgemeines

Prophagen tragen einen nicht zu vernachlässigenden Teil an mobiler DNA und beeinflussen somit die Evolution von Bakterien (Canchaya et al. 2003). Durch zusätzliches Genmaterial ermöglichen Phagen es Bakterien, sich neuen Umweltbedingungen anzupassen (Xia und Wolz 2014). Eine Studie von Thomson et al. (2004) zeigte, dass Phagen einen bedeutenden Anteil zu der horizontalen Übertragung von DNA beitragen. Die Aktivierung von Prophagen kann zur Transduktion und somit zum phagenvermittelten Transfer genetischen Materials zwischen Bakterienzellen führen (Fortier und Sekulovic 2013). Bei der generalisierten Transduktion werden fertige Phagenköpfe fehlerhaft mit Bakterien-DNA anstelle von Phagen-DNA beladen, welche dann von dem Phagen zum nächsten Bakterium transferiert wird und dort in dessen Genom eingebaut werden kann (Brüssow et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Veränderung des Phänotyps der Bakterienzelle durch temperente Phagen ist die lysogene Konversion, bei welcher die Wirtszelle so lange von den Genen eines Prophagen profitieren kann, solange sich dieser in ihr befindet (Canchaya et al. 2003). Durch das Tragen von „cargo“ Genen können sie das Virulenzpotential ihres Wirtes verändern (Thomson et al. 2004). Diese lysogene Konversion kommt auch bei gramnegativen Bakterien vor (Canchaya et al. 2003).

### 2.2.2.2 Beispiele für Virulenzgenen, die von Phagen getragen werden

Ein solches „cargo“ Gen, auch Moron genannt, welches von wesentlicher Bedeutung ist, ist das durch Prophagen kodierte Shigatoxingen *stx* (Brüssow et al. 2004). *Stx* kommt im Genom von Shigatoxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC) vor und ist der vorherrschende Virulenzfaktor in diesen Bakterien (Brüssow et al. 2004). Das Toxin durchquert das intestinale Epithel und schädigt nach Verbreitung durch den Blutkreislauf die Gefäßwände des Kolons, der Nieren und des zentralen Nervensystems, wodurch es zu Durchfall, hämorrhagischer Kolitis, dem hämolytisch-urämisches Syndrom und zu ZNS-Erscheinungen kommen kann (Brüssow et al. 2004). Dieses Gen wird von multiplen Phagen getragen. Dazu zählen zum Beispiel sp15 und 993V, beides *stx1* Phagen, und sp5 und 933W, zwei *stx2* Phagen (Brüssow et al. 2004).

Zu einem weiteren bekannten Virulenzfaktor, der über Phagen eingetragen wurde, zählt das Diphtherietoxin in *Corynebacterium diphtheriae* (Brüssow et al. 2004). Das Diphtherietoxin ist

der Hauptvirulenzfaktor dieses Pathogens und verursacht sowohl lokale Infektionen der Tonsillen, des Rachens, der Nase und der Konjunktiven als auch eine systemische Intoxikation (Brüssow et al. 2004). Bereits in den 1950ern wurde entdeckt, dass die Gene sehr wahrscheinlich an *tox*<sup>+</sup> beta Phagen gebunden sind. Aber auch die Phagen von *C. diphtheriae* sind noch nicht in allen Einzelheiten untersucht (Brüssow et al. 2004).

### **2.2.2.3 Übertragung von Virulenzgenen in Salmonella**

Horizontaler Gentransfer ist auch bei *Salmonella* der Hauptmechanismus, um deren Virulenz weiterzuentwickeln (Ochman et al. 2000). Wie auch zuvor ist hier die lysogene Konversion temperenter Phagen von Bedeutung (Figuroa-Bossi et al. 2001). Diverse Versuche mit *Salmonella* haben gezeigt, dass Prophagen nicht nur kurzlebige und überflüssige DNA im Bakteriengenom sind, sondern Überträger einer Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren (Canchaya et al. 2003). Figuroa-Bossi et al. (2001) definierten Prophagen als „transferierbares Repertoire“ an Virulenzfaktoren in Salmonellen. Die wichtigsten dieser Phagen gehören entweder zur Familie der P2-Phagen, wie die Phagen SopE, Fels-1 und Fels-2, oder zur Familie der lambda-Phagen, wie die Phagen Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3 und P22 (Brüssow et al. 2004).

Der Phage SopE trägt das Virulenzgen *sopE*, welches zuvor schon beschrieben wurde. In einer Studie von Miold et al. (1999) konnte der Prophage davon aus einem epidemischen *S. Typhimurium*-Stamm induziert werden und es konnte außerdem gezeigt werden, dass dabei das Gen *sopE* auf einen empfänglichen Wirtsstamm transferiert wurde. Dies belegte den horizontalen Gentransfer dieses Gens bei *S. Typhimurium* (Figuroa-Bossi et al. 2001).

Figuroa-Bossi et al. (2001) zeigten, dass Gifsy-1 und Gifsy-2, zwei lambdoid Phagen, wichtig für die Virulenz des *Salmonella* Serovars Typhimurium in Mäusen sind. Einige Gene, die zur bakteriellen Virulenz beitragen, sind in dem Genom dieser Phagen enthalten (Figuroa-Bossi et al. 2001). Dazu gehört z.B. das Gifsy-1 Gen *gipA* (Stanley et al. 2000), welches ebenfalls bereits beschrieben wurde. Zusätzlich zu den beiden genannten Phagen dokumentieren Figuroa-Bossi et al. (2001) den Phagen Gifsy-3, welcher den Genlokus für *sspH1* enthält (Miao et al. 1999). Alle drei Gifsy Phagen sind dazu im Stande, sowohl verschiedene Isolate des Serovars Typhimurium als auch Stämme anderer *Salmonella* Serovare zu lysieren (Figuroa-Bossi et al. 2001).

Für die Pathogenität von *Salmonella* am Anfang einer Infektion sind sowohl *sopE* als auch *gipA* von Bedeutung, da *sopE* die Aufnahme der Bakterien in die intestinalen Epithelzellen

begünstigt und *gifA* deren Überleben in den Peyer'schen Platten sichert (Wagner und Waldor 2002).

Auch in *S. Enteritidis* konnten Phagen nachgewiesen werden (Thomson et al. 2008, D'Alessandro et al. 2018). Diese enthielten Gene, die normalerweise in dem Gifsy-2 Phagen aus *S. Typhimurium* beschrieben sind, darunter *sodCI*, *gogA*, *ompX* und *sopE* (Thomson et al. 2008). Weiters wurde *gogB*, ein auf dem Gifsy-1 Phagen lokalisiertes Gen (Figuroa-Bossi et al. 2001) in den Phagen von *S. Enteritidis* detektiert (D'Alessandro et al. 2018). Dieses deckte sich genetisch zu 99 % mit dem Gen aus den *S. Typhimurium*-Phagen, was zu der Annahme führt, dass diese in einem phylogenetischen Zusammenhang stehen könnten (D'Alessandro et al. 2018).

Prophagen werden meist unter Stresssituationen ihrer Wirtszellen aktiviert. Dies kann durch Exposition gegenüber  $H_2O_2$ , Sauerstoffradikalen oder exogenen Einflussfaktoren wie zum Beispiel Antibiotika induziert werden (Wagner und Waldor 2002). In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Bakterien mit  $H_2O_2$  gewählt, um etwaige Prophagen anzuregen.

#### **2.2.2.4 Gentransfer zwischen Phagen**

Virulenzgene können auch zwischen Phagen transferiert werden, selbst wenn diese zu verschiedenen Familien gehören (Miold et al. 2001). Das erklärt auch, dass Gene von *S. Typhimurium*-Phagen in *S. Enteritidis*-Phagen vorkommen können (D'Alessandro et al. 2018). Durch generalisierte Transduktion können genetische Marker eines Prophagen auf einen anderen übertragen werden (Figuroa-Bossi et al. 1997). Als Folge daraus können Hybride zwischen Phagengruppen entstehen (Canchaya et al. 2003). Diese Möglichkeit der Rekombination ist eine wichtige Quelle für die Variabilität des Repertoires phagenassoziierter Virulenzloci (Figuroa-Bossi et al. 1997).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 LB-Agarplatten**

Für die Anzucht der Bakterienstämme wurden im Labor LB-Agarplatten hergestellt. Diese wurden nach Herstellerangaben mit LB-Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™; Agar Bacteriological; 10351303) und LB-Broth (Thermo Scientific™ Oxoid™; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B) angefertigt.

##### **3.1.2 LB-Broth**

Die LB-Broth wurde zur Kultivierung der 100 Salmonellenisolate verwendet. Um dieses Medium herzustellen, wurde LB-Broth (Thermo Scientific™ Oxoid™; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B) nach Herstellerangaben in bi-destilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und in sterile 10 ml Röhren aliquotiert.

##### **3.1.3 ssLB-Agar (semisolider Agar)**

Um ein Medium für die Transduktion zu erhalten, in welchem die Salmonellenstämme ATCC 14028 und DSM 17420 mit den Phagen reagieren, wurde ein ssLB-Agar hergestellt. Dazu wurden 7,5 g LB-Broth (Thermo Scientific™ Oxoid™; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B) und 2,4 g LB-Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™; Agar Bacteriological; 10351303) in 300 ml bi-destilliertem Wasser gelöst und danach zu je 4 ml in sterile, auf 60 °C erwärmte Glasröhren überführt. Der Agar in den Röhren wurde anschließend bis Raumtemperatur abgekühlt und die Röhren im Kühlschrank aufbewahrt. Bei Verwendung wurden sie in kochendem Wasser für 10 Minuten erhitzt, um den Agar zu verflüssigen. Sobald dieser geschmolzen war, wurden die Röhren bei 50 °C in einen Inkubator überführt und vor Gebrauch auf 45 °C abgekühlt.

##### **3.1.4 MH Broth<sup>+</sup> MC-Medium**

Das MH Broth<sup>+</sup> MC-Medium diente als Anzuchtmedium für die Rezipientenstämme von *Salmonella* Enteritidis DSM 17420 und *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Die Zugabe von CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> in einer Konzentration von 5 mM bzw. 100 mM ermöglichte eine bessere Aufnahme der Phagen in die Rezipientenstämme. Zur Herstellung dieses Mediums wurden

2,5 ml  $\text{CaCl}_2$  ( $c = 1 \text{ M}$ ) bzw. 50 ml  $\text{MgSO}_4$  ( $c = 1 \text{ M}$ ) mit 10,5 g Müller Hinton-Broth (Thermo Scientific™ Oxoid™; CM0405) auf 500 ml bi-distilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

### **3.1.5 Prophageninduktionspuffer (PI-Puffer)**

Als externer Stimulus für die Einleitung der lytischen Phase wurde in dieser Arbeit ein Prophageninduktionspuffer auf Basis einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung verwendet. Diese Lösung wurde in Müller Hinton-Broth (Thermo Scientific™ Oxoid™; CM0405) angesetzt. Die Endkonzentration betrug 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung.

### **3.1.6 Gelherstellung**

Als Gel- und Laufpuffer zur Detektion der PCR-Fragmente wurde 1x TAE-Puffer (2 M Tris; 1 M Essigsäure; 0,05 M EDTA; pH 8,5) mit 4  $\mu\text{l}/100 \text{ ml}$  DNA/RNA-Farbstoff, peqGREEN (VWR International; 732-2960), verwendet. Um 1x TAE-Puffer herzustellen, wurden 20 ml von 50x TAE-Puffer in 1 l bi-distilliertem Wasser gelöst. Danach wurden 4 g Agarose (VWR International; 732-2789) zu 400ml dieses 1x TAE-Puffers hinzugefügt und gelöst, um ein 1 %iges Agarosegel zu erhalten. Diese Lösung wurde für 5 Minuten auf höchster Stufe in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Danach wurde sie auf ca. 50 °C abgekühlt und 24  $\mu\text{l}$  des DNA/RNA-Farbstoffs peqGREEN hinzugefügt ( $c = 6 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$  1 % Agarosegel). Anschließend wurde es in eine Gelelektrophoresekammer gegossen und bis zur vollständigen Polymerisierung für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.1.7 Weitere Materialien**

Zur sterilen Filtration des Überstandes wurde ein 0,20  $\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter (VWR International; 514-0073) verwendet. Dieser sowie alle weiteren Materialien sind in Tab. 3.1 angeführt.

Tab. 3.1: Auflistung der verwendeten Materialien

Artikel	Artikelnummer	Firmenname
Spritzenvorsatzfilter 0,2µm	514-0073	VWR International
DNA/RNA-Farbstoff, peqGREEN, 2×1 ml	732-2960	VWR International
AccuStart™ II GelTrack PCR SuperMix, 500×25 µl reactions	733-2239	VWR International
DNA-Leiter, 1 kb (konzentriert), 500 ng/µl, 5×100 µl	25-2030	VWR International
Agarose 500g	732-2789	VWR International
LB-Agar, Miller, 500 Gramm	10081163	Thermo Scientific™ Oxoid
PerfeCTa® DNase I	733-2331	VWR International
RNAse A-Lösung, 20 mg/ml In Puffer, 1000 µl	732-3152	VWR International
Luria-Bertani (LB) broth	OXOICM0996B	VWR International
FILTERSPITZE, 1000 µL, 10 Racks	750288	Greiner Bio-One
FILTERSPITZE, 100 µL, 10 Racks	772288	Greiner Bio-One
FILTERSPITZE, 10 µL, 10 Racks	765288	Greiner Bio-One
Petri dishes 500St. 9mm	STM 101VR20	LabXperts
Pipette Tip 20µl	765290	Greiner Bio-One
Pipette Tip 200µl	685290	Greiner Bio-One
Pipette Tip 1000µl	686290	Greiner Bio-One
PCR Streifen 1250Stück	Nr.: 673210	Greiner BioOne
Deckelkette für PCR Streifen 1250Stück	Nr.: 373270	Greiner BioOne
Röhrchen 1,5ml 4000Stück	Nr.: 616201	Greiner BioOne
Röhrchen 2ml 4000Stück	Nr.: 623201	Greiner BioOne
Röhrchen 15ml 1000Stück	Nr.: 188261	Greiner BioOne

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzüchten der Wirtsstämme

Als Nativstämme wurden die Salmonellenstämme *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 und *Salmonella* Enteritidis DSM 17420 verwendet. Diese besitzen selbst keine induzierbaren Prophagen und führen so zu keinen falsch positiven Ergebnissen — für beide Bakterien ist das Gesamtgenom sequenziert. Die zwei Stämme wurden vom ehemaligen Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und Lebensmittelwissenschaften aus den jeweiligen Stammsammlungen (ATCC American Type Culture Collection und DSMZ Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) bezogen und als Gefrierstock aufbewahrt. Nach Anzucht der Rezipientenstämme auf den LB-Agarplatten wurde von jedem Stamm jeweils eine bakterielle Kolonie in 10 ml LB-Broth inokuliert und über Nacht bei 250 rpm bei 37 °C in einem Thermoschüttler (Eppendorf; New Brunswick™ Innova 40/40R Incubator Shaker 40) inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 100 µl dieser angesetzten Kulturen in 10 ml MH Broth<sup>+</sup> MC-Medium (MH-Broth; 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 mM MgSO<sub>4</sub>) aufgelöst und ca. 2 Stunden bei 250 rpm und 37 °C wieder im Thermoschüttler inkubiert bis die optischer Dichte

(OD) der Suspension 0,300 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hatte. Von dieser Suspension wurden anschließend 300 µl bzw. 600 µl in je 30 ml LB-Flüssigmedium pipettiert, um McF 0,5 bzw. McF 1,0 zu erhalten.

### **3.2.2 Anzuchtung der Bakterien**

Zur Anzuchtung der Salmonellaisolate wurden die Gefrierstocks aus der Stammsammlung der Abteilung Technologie und Hygiene der Lebensmittel der Veterinärmedizinischen Universität Wien herangezogen. Von diesen wurden je 50 Salmonellaisolate des Serovars Enteritidis und 50 Isolate des Serovars Typhimurium auf den zuvor gegossenen, sterilen LB-Agarplatten ausgestrichen.

Pro Platte wurden je zwei Isolate aufgetragen, wobei zuvor auf der Platte sichtlich eine Markierung und Beschriftung (Probennummer und Datum des Ausstrichs) erfolgt war, um einer Verwechslung der Isolate vorzubeugen.

Die Gefrierstocks wurden während der gesamten Zeit auf Eis belassen, um ein Auftauen der Stocks und ein eventuelles Schadennehmen der Kulturen zu verhindern. Nach der Verwendung wurden sie wieder in den Gefrierschrank verbracht und bei -80 °C gelagert. Die beimpften Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde je eine mittelgroße Salmonellenkolonie von der Platte mittels abgeflammter Öse in 10 ml LB-Broth übertragen und gevortext. Die Röhrchen wurden dann wieder über Nacht bei 37 °C unter konstantem Schütteln von 250 rpm inkubiert.

### **3.2.3 Optische Dichtebestimmung**

Bei den ersten Durchläufen wurde die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Flüssigkulturen bestimmt, um zu gewährleisten, dass sich bei allen Proben eine ungefähr ähnliche Anzahl an Bakterien pro ml der Suspension befanden. Diese lag bei den gemessenen Proben durchschnittlich bei 0,378, mit einem Minimalwert bei 0,296 und einem Maximalwert bei 0,421.

Die weiteren Proben wurden nach dem gleichen Protokoll angesetzt.

### **3.2.4 Prophageninduktion**

Um die Prophagen aus den Salmonellen freizusetzen, wurden aus jeder Übernacht-Kultur mit einer  $OD_{600}$  von ungefähr 0,400 2 ml in ein steriles Eppendorfgesäß überführt. Dieses wurde anschließend bei 10.000 g für 5 Minuten zentrifugiert bzw. bis sich am Boden des Röhrchens

ein festes Pellet gebildet hatte. Danach wurde der Überstand abpipettiert und nur mit dem Pellet (= Bakterien) weitergearbeitet.

Als nächster Schritt wurde das Pellet durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in 2 ml PI-Puffer gelöst, gevortext und anschließend bei 30 °C für 30 Minuten inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurden 4 µl Lysozym, mit einer Ausgangskonzentration von 100 mg/ml, zu jedem Röhrchen beigefügt. Die Endkonzentration des Lysozyms betrug 200 µg/ml in den Proben. Die Röhrchen wurden wiederum für 15 Sekunden gevortext und für weitere 30 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Danach wurden die Röhrchen bei 10.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, in welchem nach der Induktion sich die Prophagen befinden sollten, wurde in ein neues 2 ml Röhrchen pipettiert und das Pellet verworfen.

### **3.2.5 Bakteriophagennachweis**

Von diesen Phagensuspensionen (PS) (= Überstände der Proben) wurden, um zwei unterschiedliche Verdünnungen zu erhalten, je 1 ml bzw. 10 µl in frische 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Der Rest der PS wurde im Kühlschrank aufbewahrt, um für eventuelle weitere Verwendungen (Verdünnungsreihen, Wiederholungen des Versuchs, etc.) zur Verfügung zu stehen. Zu diesen Proben wurden nun jeweils 1 ml bzw. 1.990 µl des Wirtsstammes ATCC 14028 bzw. DSM 17420 mit einem McF 1 bzw. 0,5 hinzugefügt und die Röhrchen gevortext.

Zusätzlich zu den Proben wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle angelegt. Für die Positivkontrolle wurden zu 1.990 µl ATCC 14028 bzw. DSM 17420 10 µl der PS  $10^{-6}$  Salmonex 14110-150s beigefügt. Für die Negativkontrolle wurden 2 ml nur von den Wirtsstammverdünnungen verwendet.

Nun wurden Röhrchen mit ssLB-Agar geschmolzen und bei einer Temperatur von 45 °C gehalten. Zu diesen wurden je 24 µl  $\text{CaCl}_2$  (6 µl/ml) hinzu pipettiert und die Röhrchen gevortext. Danach wurde je eine Probenmischung pro Gefäß beigefügt, das Ganze wiederum gevortext und mit einer flüssigen Bewegung auf eine mit Datum und Probennummer beschriftete LB-Platte ausgegossen. Jede Platte wurde vorsichtig geschwenkt bis sie vollständig mit dem Flüssigagar bedeckt war. Anschließend wurde sie zum Abkühlen zur Seite gestellt. Nachdem sich der ssLB-Agar wieder verfestigt hatte, wurden die Probenplatten gestapelt und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

### 3.2.6 Auswertung der Platten

Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung der Probenplatten. Dazu wurden beide Platten der Verdünnungen einer Probe (1 ml bzw. 10 µl Platte) zur Dokumentation fotografiert (Abb. 3.1 — 3.2).



Abb. 3.1: Die 10 µl Verdünnung des Isolates 7 des Serovars Typhimurium zur Veranschaulichung der Dokumentation — Unterseite.



Abb. 3.2: 10 µl Verdünnung des Isolates 7 des Serovars Typhimurium — Oberseite ohne Deckel.

Ausgewertet wurden die „plaque forming units“ (PFU). Diese wurden ausgezählt und auf PFU/ml umgerechnet. Die Umformung auf PFU/ml war wichtig, um die Ergebnisse der einzelnen Stämme miteinander vergleichen zu können.

Nach dieser Dokumentation wurde pro Platte mit 3—4 ml SM-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM TrisHCl; pH 7,5) die oberste Schicht (ssLB-Agar-Schicht) mit einem Drigalskispattel zerstampft. Die Petrischalen wurden anschließend bei Raumtemperatur (RT) 30—60 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die Phagen aus dem ssLB-Agar freizusetzen und später zu gewinnen.

Nach dieser Inkubationszeit von 30—60 Minuten bei RT wurde der SM-Puffer mit den nun darin enthaltenen Phagen mit einer Pipette von jeder Platte abpipettiert und in je ein neues Röhrchen überführt. Diese wurden wieder bei 10.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus SM-Puffer und Phagen, wurde vom Pellet separiert und mit Hilfe

eines 0,20 µm PES-Spritzenvorsatzfilters (VWR International; 514-0073) steril filtriert. Im Pellet, welches anschließend verworfen wurde, befanden sich nach der Zentrifugation etwaige Überreste an Bakterienzellen sowie ssLB-Agarreste. Bis zur weiteren Verwendung wurden die nun sterilen Phagensuspensionen im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.7 Reinigung des Phagenlysates von extrachromosomaler Bakterien-DNA

Um das Lysat von extrachromosomaler Bakterien-DNA und RNA, die die Ergebnisse der PCR verfälschen würden, zu reinigen, wurde dieses mit DNase und RNase behandelt.

Zur Reinigung wurde zuerst ein DNase-RNase-Mix hergestellt. Dazu wurden 4 µl DNase (2 U/µl) und 5 µl RNase (20 mg/ml) mit 8,35 µl 100-fachem Reaction Buffer for DNase (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM MgCl<sub>2</sub>) gemischt. Nachdem alle Bestandteile des Gemisches in entsprechender Menge hinzu pipettiert worden waren, wurde das Gemisch gevortext und 17,35 µl davon mit je 817,65 µl Phagenlysat vermengt. Danach wurden die Proben bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Proben bei einer Temperatur von 65 °C für weitere 15 Minuten inkubiert, um die DNase zu inaktivieren.

### 3.2.8 PCR

Um die Phagen auf Virulenzgene zu überprüfen, wurde eine PCR durchgeführt. Die dafür ausgewählten Virulenzgene waren *sopE 50/51*, *sopE 44/45*, *sspH1*, *sefC*, *spvC*, *arnC* und *gipA*. Für die PCR wurden für jede Probe und Kontrollproben 18 µl eines SuperMixes gemischt und 2 µl ProbenDNA beigefügt. Der SuperMix bestand aus 10 µl AccuStart™II GelTrack™PCR SuperMix (2X) (Quanta BioSciences; 95136-500), je 0,10 µl des virulenzgenspezifischen forward bzw. reverse Primers und 7,80 µl autoklaviertem bi-distillierten Wasser.

Nach dem Vortexen des SuperMixes mit dem beigefügten Phagenlysat wurden die Proben in den PCR Thermocycler verbracht. Zur Durchführung der PCR wurde der Eppendorf MasterCycler (S/N: 5333-00169) verwendet.

Die initiale Denaturierung erfolgte 5 Minuten bei 95 °C. Danach folgten 35 Wiederholungen folgender Zyklen:

- Denaturierung: 94 °C für 30 Sekunden

- Annealing: 55 °C für 30 Sekunden
- Elongation: 72 °C für 1 Minuten

Anschließend folgte die finale Elongation für 5 Minuten bei 72 °C. Danach wurden die Proben analysiert.

### **3.2.9 Gelelektrophorese**

Um die Ergebnisse der PCR sichtbar zu machen, wurde die Gelelektrophorese genutzt. Vor dem Verbringen auf das Agarosegel wurden 10 µl des amplifizierten PCR-Produkts mit 2 µl loading buffer (6x) (pegGOLD; 25-2021) versetzt. Damit wurden die Slots befüllt. Die DNA-Längenmarker befanden sich im ersten, einem mittleren und im letzten Slot jeder Reihe; die positive Kontrolle im vorletzten.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1 %igem Agarosegel für 1 Stunde bei 100 V. Anschließend wurden die Fragmente mittels UV-Licht auf einem UV Transilluminator (MWG BIOTECH; TFX-20M) detektiert.

Die Ergebnisse der jeweiligen Durchläufe pro getestetem Virulenzgen wurden dokumentiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 *Salmonella* Typhimurium

#### 4.1.1 Prophagen aus *Salmonella* Typhimurium

Erstes Ziel dieser Studie war es, Prophagen aus den herangezogenen Bakterienstämmen zu aktivieren. Aus den 50 untersuchten Isolaten des Serovars Typhimurium konnten aus 40 Isolaten (80 %) Phagen isoliert werden. Im Durchschnitt konnten auf den auswertbaren und ausgezählten Platten  $4,65 \cdot 10^6$  PFU/ml nachgewiesen werden. Der Minimalwert lag dabei bei  $5,00 \cdot 10^1$ , der Maximalwert bei  $4,40 \cdot 10^7$ . In Tab. 4.1 sind die positiven und die negativen *Salmonella* Typhimurium-Isolate numerisch aufgelistet. Zur Ermittlung des Durchschnitts der Phagenanzahl wurde für die „nicht auszählbaren“ Proben ein Wert von  $10^7$  angenommen, da sie vergleichbar waren mit den Platten 1–3, bei denen eine  $10^{-6}$  Verdünnung angelegt worden war und so eine genaue Anzahl an Phagen ermittelt werden konnte.

*Tab. 4.1: Isolate des Salmonella Serovars Typhimurium, aus denen Prophagen induziert werden konnten, sowie die Proben, die keine Prophagen enthielten. Die Anzahl der Phagen ist in PFU/ml angegeben. Die Platten, auf denen zu viele Phagen waren, sind mit „nicht auszählbar“ markiert. Diejenigen, die aufgrund eines Fehlers nur geschätzt wurden sind mit „größer als ...“ gekennzeichnet.*

<i>Salmonella</i> Typhimurium Isolate	Prophagen (PFU/ml)		
1	4,40E+07	27	2,96E+05
2	2,30E+07	28	1,33E+05
3	2,50E+07	29	-
4	> 5,00E+05	30	4,86E+05
5	5,00E+05	31	2,35E+05
6	-	32	6,42E+05
7	2,18E+05	33	7,04E+04
8	1,26E+05	34	-
9	1,75E+05	35	2,95E+05
10	-	36	6,64E+05
11	1,29E+04	37	8,10E+03
13	> 5,00E+03	38	2,95E+05
14	> 5,00E+05	39	-
15	> 1,00E+05	40	-
16	5,00E+01	41	-
17	2,89E+05	42	-
18	-	43	6,64E+04

19	> 5,00E+03	44	nicht auszählbar
20	> 5,00E+03	45	nicht auszählbar
21	> 5,00E+03	46	nicht auszählbar
22	> 1,00E+05	47	nicht auszählbar
23	> 5,00E+03	FS 47	-
24	8,01E+04	L 18B	4,10E+07
25	> 5,00E+03	L 36B	7,00E+06
26	3,33E+05	s 157	1,07E+04

Die Abb. 4.1—4.6 zeigen Beispiele der von den aktivierten Phagen verursachten Lyse des Rezipientenstamms ATCC 14028. Grund für die unterschiedliche Anzahl an Plaques ist die starke Variabilität der Anzahl exprimierbarer Phagen zwischen den einzelnen Bakterienisolaten und demzufolge wurde, sofern möglich, je eine auszählbare Verdünnung herangezogen. In Abb. 4.7 sind die Positiv- und die Negativkontrolle zu sehen.



Abb. 4.1: Agarplatte des Isolates 8 des Serovars Typhimurium in 10 µl Verdünnung.



Abb. 4.2: Agarplatte des Isolates 28 des Serovars Typhimurium. Gleich wie beim Isolat 8 wurde hier die 10 µl Verdünnung zur Auszählung herangezogen.



Abb. 4.3: Agarplatte des Isolates 26 des Serovars Typhimurium. Die von den Phagen lysierten Stellen sind hier sehr variabel. Dies deutet auf verschiedene Phagen mit unterschiedlicher lytischer Kompetenz hin.



Abb. 4.4: Agarplatte des Isolates 27 des Serovars Typhimurium. Die PFU zeigen sich relativ regelmäßig die Größe betreffend und liegen anzahlmäßig zwischen denen der Isolate 8 bzw. 28 und 30.

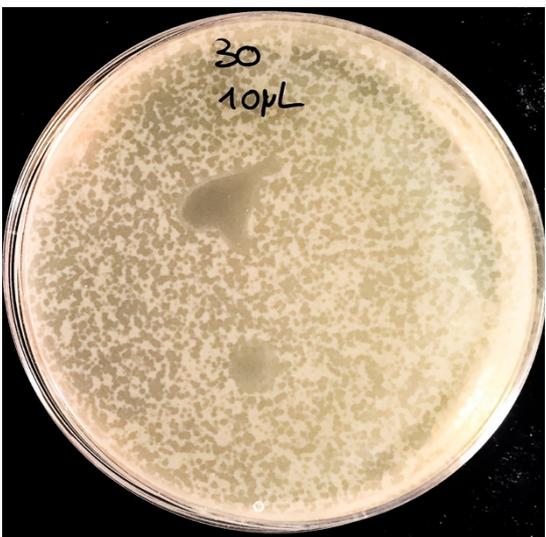


Abb. 4.5: Agarplatte des Isolates 30 des Serovars Typhimurium. Bei dieser 10 µl Verdünnung ist die starke Variabilität der Phagen im Vergleich zu den Phagenisolaten der Platten in Abb. 4.1 und 4.2 zu sehen; einerseits bezüglich der Form der PFU, andererseits bezüglich der Anzahl an induzierten Prophagen.

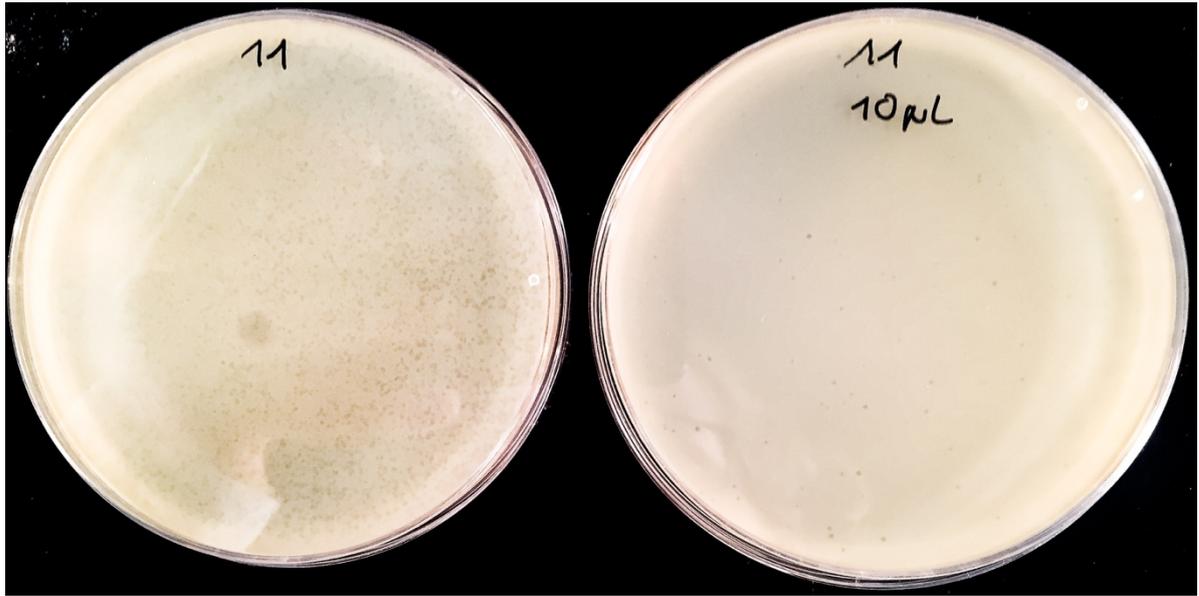


Abb. 4.6: Agarplatten des Isolates 11 des Serovars Typhimurium. Hier ist bereits die 1 ml Verdünnung ausreichend, um die Phagen einzeln auf der Platte darstellen zu können.

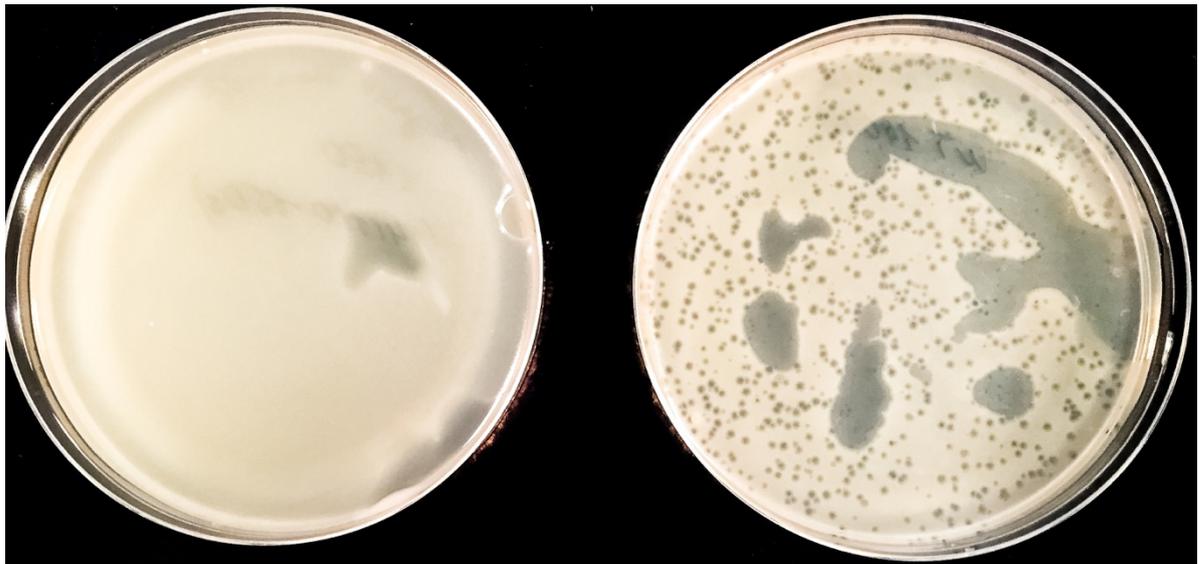


Abb. 4.7: Negativ (links) und positiv (rechts) Kontrolle des Serovars Typhimurium. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um den Stamm ATCC 14028, bei der Positivkontrolle wurde  $PS 10^{-6}$  *Salmonella* 14110-150s dem Stamm beigefügt.

#### 4.1.2 Virulenzgenfragmente in Prophagen aus *Salmonella* Typhimurium

Alle Proben wurden mittels PCR positiv auf die Virulenzgenfragmente *sspH1* und *gipA* getestet. Das *sopE 50/51* Fragment konnte bei fünf der 40 Phagenlysate (PS 1, PS 2, PS 3,

PS 37, PS L18B) amplifiziert werden. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit von 12,50 %. Auf das Virulenzgenfragment *spvC* wurde nur PS 2 positiv getestet (2,50 %). Die Virulenzgenfragmente *sopE 44/45*, *sefC* und *arnC* konnten bei keinen Lysaten nachgewiesen werden (0 %). Im Wirtstamm ATCC 14028 konnten interessanterweise nur die Genfragmente *sopE 50/51*, *spvC* und *gipA* detektiert werden. Die Testung dieses Stammes auf *sspH1* fiel negativ aus. Ebenso konnten keine anderen getesteten Virulenzgenfragmente bei den Lysaten von ATCC 14028 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 und 4.4 dargestellt.

Tab. 4.2: Virulenzgenfragmente, die in den Phagenlysaten aus *Salmonella Typhimurium* nachgewiesen werden konnten.

Phagenlysat	PCR <i>sopE 50/51</i>	PCR <i>sopE 44/45</i>	PCR <i>sspH1</i>	PCR <i>sefC</i>	PCR <i>spvC</i>	PCR <i>arnC</i>	PCR <i>gipA</i>
PS 1	<i>sopE 50/51</i>	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 2	<i>sopE 50/51</i>	-	<i>sspH1</i>	-	<i>spvC</i>	-	<i>gipA</i>
PS 3	<i>sopE 50/51</i>	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 4	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 5	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 7	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 8	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 9	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	-
PS 11	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 13	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 14	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 15	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 16	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 17	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 19	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 20	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 21	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 22	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 23	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 24	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 25	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 26	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	-
PS 27	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 28	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 30	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 31	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 32	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 33	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 35	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>

PS 36	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 37	<i>sopE 50/51</i>	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 38	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 43	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 44	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	-
PS 45	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 46	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS 47	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS L 18B	<i>sopE 50/51</i>	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS L 36B	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>
PS s 157	-	-	<i>sspH1</i>	-	-	-	<i>gipA</i>

Tab. 4.3: Amplifizierbare Virulenzgenfragmente aus der DNA von *S. Typhimurium* ATCC 14028

<b><i>S. Typhimurium</i></b>	<b>PCR <i>sopE 50/51</i></b>	<b>PCR <i>sopE 44/45</i></b>	<b>PCR <i>sspH1</i></b>	<b>PCR <i>sefC</i></b>	<b>PCR <i>spvC</i></b>	<b>PCR <i>arnC</i></b>	<b>PCR <i>gipA</i></b>
ATCC 14028	<i>sopE 50/51</i>	-	-	-	<i>spvC</i>	-	<i>gipA</i>

Anschaulich gemacht wurden die Ergebnisse der PCR mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden alle positiven Proben (*S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*) numerisch in die Slots verbracht und zusätzlich Marker und Kontrollproben beigefügt. Die Abb. 4.9 zeigt die Gelelektrophorese bei der Testung auf das Virulenzgen *gipA*.

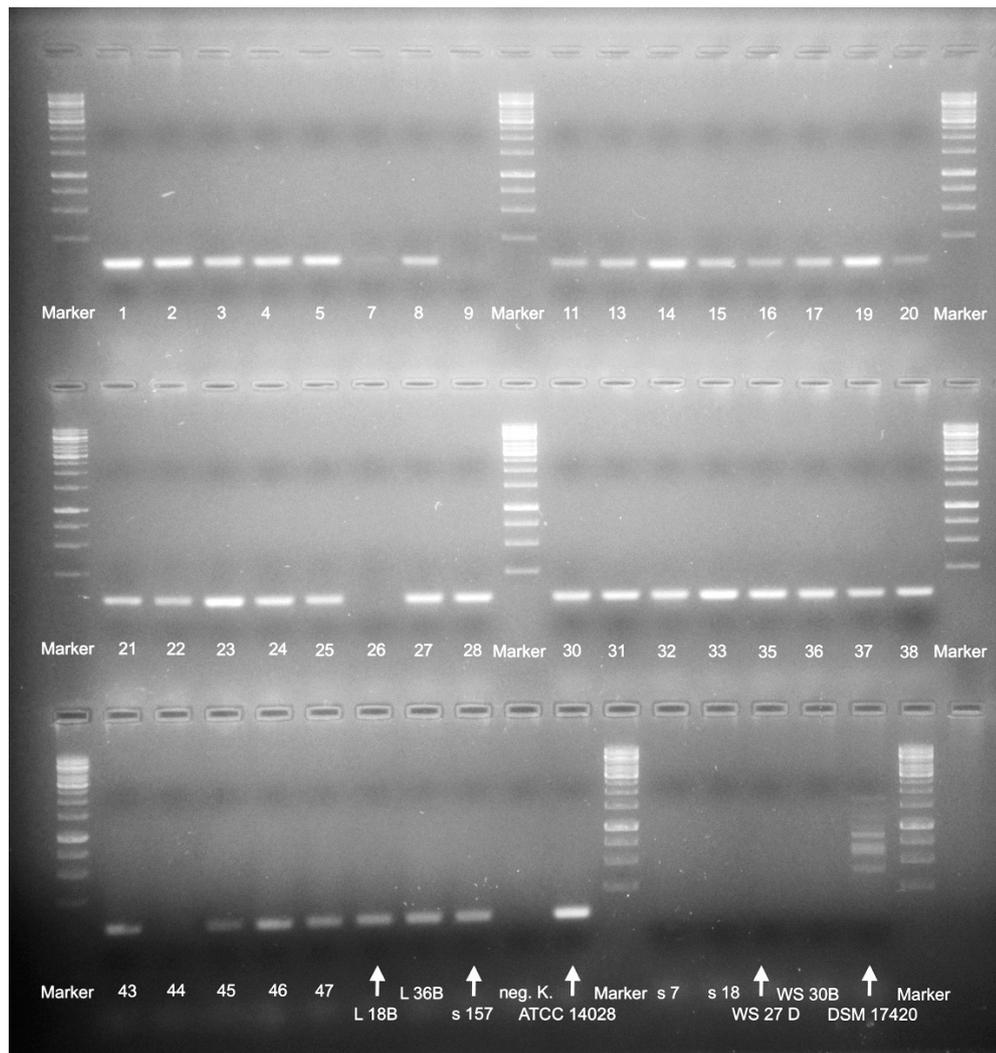


Abb. 4.8: PCR-Ergebnisse zu dem Virulenzgen *gipA*. Hier wurden sowohl die Phagenlysate des Serovars *Typhimurium* als auch des Serovars *Enteritidis* getestet. Die negativen Proben sind deutlich zu erkennen. PS 7 ist nur schwach positiv.

## 4.2 *Salmonella* Enteritidis

### 4.2.1 Prophagen aus *Salmonella* Enteritidis

Die 50 Proben von *Salmonella* Enteritidis wurden sowohl auf ATCC 14028 als auch auf DSM 17420 getestet. Auf DSM 17420, welcher der eigentliche Rezipientenstamm des Serovars Enteritidis ist, konnten nur aus 8 % der Isolate Prophagen aktiviert werden. Dies waren die Stämme s 7, s 18, WS 27D und WS 30B (Tab. 4.4). Bei diesen lag der geschätzte

Mittelwert bei  $1,00 \cdot 10^4$  PFU/ml. Aus den übrigen Isolaten konnten keine Prophagen induziert werden (Tab. 4.4). Bei der Isolierung der Prophagen auf dem Rezipientenstamm des Serovars Typhimurium ATCC 14028 konnten nur aus 4 % der Isolate, nämlich aus den Proben s 7 und s 18, Phagen gewonnen werden. Bei diesen enthielt s 7 54 PFU/ml, s 18 war nicht auszählbar.

Tab. 4.4: Isolate des *Salmonella* Serovars *Enteritidis*, aus denen auf DSM 17420 Prophagen induziert werden konnten, sowie die Proben, die keine Prophagen enthielten. Die Anzahl der Phagen ist in PFU/ml angegeben.

<i>Salmonella</i>	
Enteritidis Isolate	Prophagen (PFU/ml)
E 4	- E 29
E 5	- E 30
E 6	- FS 4A
E 7	- FS 5
E 8	- FS 10
E 9	- FS 15
E 10	- FS 19
E 11	- FS 27B
E 12	- FS 30
E 13	- FS 34
E 14	- FS 51
E 15	- FS 52
E 16	- FS 55
E 17	- FS 60
E 18	- FS 63
E 19	- FS 69
E 20	- FS 83
E 21	- FS 91
E 22	- FS 101
E 23	- s 7 > 1,00E+04
E 24	- s 18 > 1,00E+04
E 25	- WS 27A
E 26	- WS 27D > 1,00E+04
E 27	- WS 30A
E 28	- WS 30B > 1,00E+04

In Abb. 4.9 ist die Probe s 7 des Serovars *Enteritidis* in der 1 ml Verdünnung auf dem Stamm ATCC 14028 sowie in Abb. 4.10 die Positiv- und Negativkontrolle dieses Serovars dargestellt.



Abb. 4.9: 1 ml Verdünnung des Enteritidisisolates s 7 auf ATCC 14028. Die Phagenplaques sind klein und im Foto heben sie sich kaum vom Hintergrund ab (Pfeile).

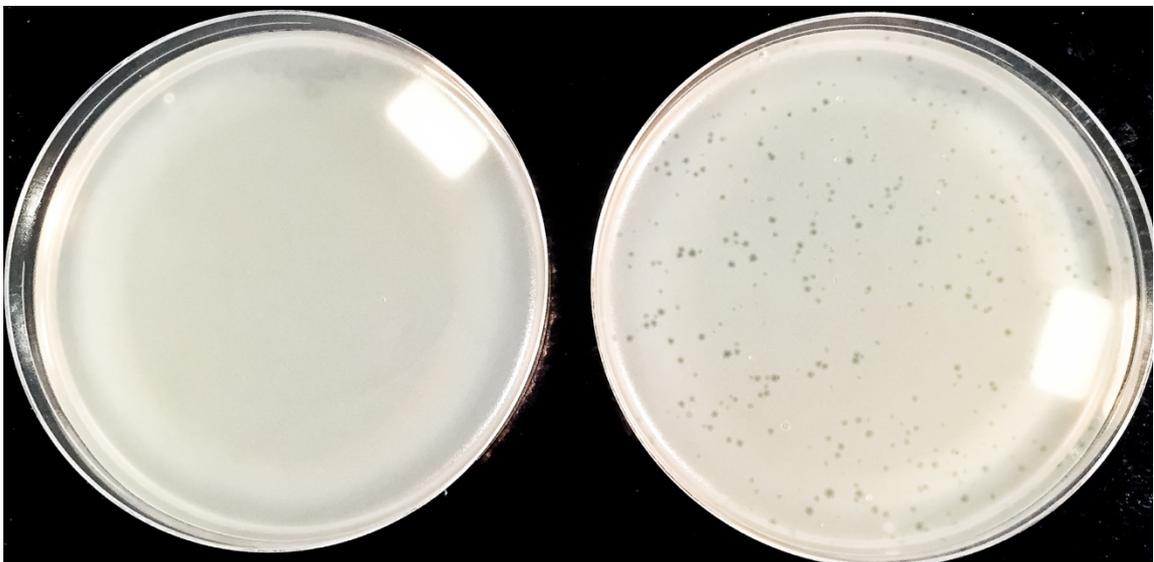


Abb. 4.10: Negativ- (links) und Positivkontrollen (rechts) des Serovars Enteritidis. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um den reinen Rezipientenstamm, bei der Positivkontrolle wurde PS  $10^6$  Salmonalex 14110-150s dem Stamm beigefügt.

### 4.2.2 Virulenzgene in Prophagen aus *Salmonella* Enteritidis

Alle Proben des Serovars Enteritidis wurden negativ auf Virulenzgenfragmente getestet. Die Phagenlysate der vier positiven Stämme wiesen keinen Genabschnitt auf, der durch die Primer von *sopE* 50/51, *sopE* 44/45, *sspH1*, *sefC*, *spvC*, *arnC* oder *gipA* getriggert werden hätte können. In der DNA des Wirtsstammes DSM 17420 konnten allerdings fünf der sieben Virulenzgenfragmente nachgewiesen werden (*sopE* 50/51, *sopE* 44/45, *sspH1*, *sefC*, *spvC*) (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Aktivierbare Virulenzgenfragmente aus der Positivkontrolle für *S. Enteritidis* DSM 17420

<i>S. Enteritidis</i>	PCR <i>sopE</i> 50/51	PCR <i>sopE</i> 44/45	PCR <i>sspH1</i>	PCR <i>sefC</i>	PCR <i>spvC</i>	PCR <i>arnC</i>	PCR <i>gipA</i>
DSM 17420	<i>sopE</i> 50/51	<i>sopE</i> 44/45	<i>sspH1</i>	<i>sefC</i>	<i>spvC</i>	-	-

## 4.3 Vergleich von *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis

### 4.3.1 Vergleich der Phagen

Im Vergleich zu den Stämmen des Serovars Enteritidis exprimierten die des Serovars Typhimurium im Durchschnitt um  $4,64 \cdot 10^6$  mehr PFU/ml. So gab es bei den Enteritidisproben trotz gleicher Verdünnung wie bei den Typhimuriumproben keine Platte, die aufgrund ungenügender Dilution nicht ausgezählt werden hätte können. Die PFU stellten sich bei Enteritidis alle solitär dar. Außerdem waren die PFU der Enteritidisphagen auf ATCC 14028 generell kleiner als die der Typhimuriumphagen, wie in der Abb. 4.11 zu sehen ist.

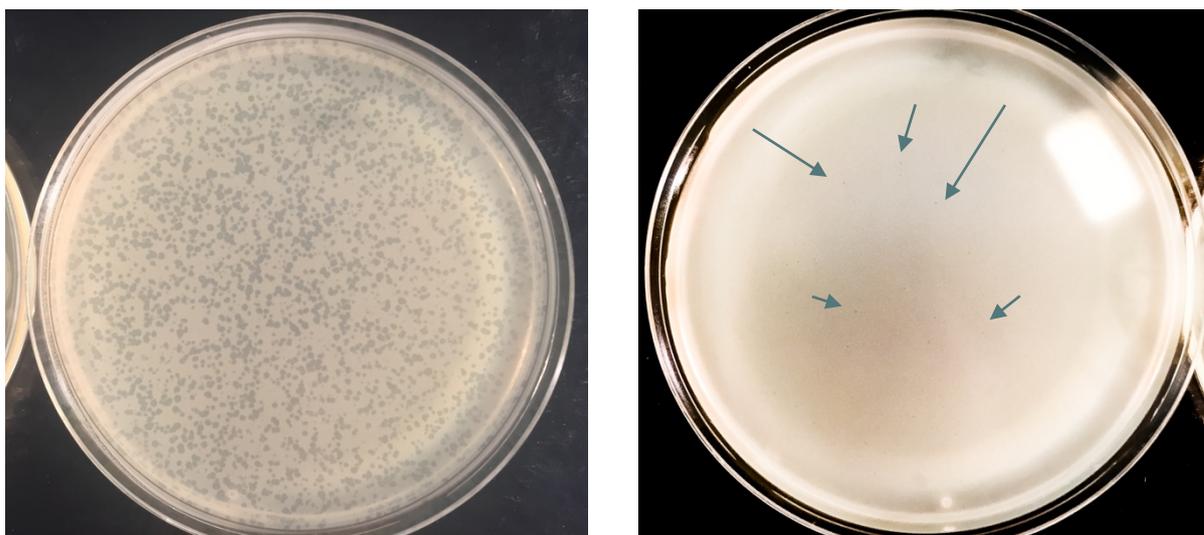


Abb. 4.11: Agarplatten des Isolates 27 des Serovars Typhimurium (links – 10  $\mu$ l Verdünnung) und des Isolates s 7 des Serovars Enteritidis (rechts – 1 ml Verdünnung) im Vergleich. Die Phagen von Enteritidis sind im Gegensatz zu denen von Typhimurium kaum zu erkennen.

#### 4.3.2 Vergleich der Virulenzgene

Trotzdem sich aus einigen Enteritidisproben Prophagen induzieren ließen, konnten in diesen im Gegensatz zu den Proben des Serovars Typhimurium keine Virulenzgenfragmente detektiert werden. *SspH1* und *gipA* kamen bei keinem der Phagenlysate des Serovars Enteritidis vor, obwohl sie bei 100 % bzw. 94 % der Typhimuriumphagenlysate amplifiziert werden konnten. Interessanterweise konnten allerdings in dem Rezipientenstamm DSM 17420 fünf der Virulenzgenfragmente nachgewiesen werden und im dem Wirtsstamm ATCC 14028 nur drei.

## 5. Diskussion

### 5.1 Prophagenisolierung

In dieser Studie wurden Prophagen aus zwei verschiedenen *Salmonella* Serovaren aktiviert und diese auf das Vorhandensein von Virulenzgenfragmenten innerhalb ihres Genoms überprüft. Es wurde gezeigt, dass einige Prophagen aus *Salmonella* nach wie vor aktiviert werden können, was die zu Beginn beschriebene Hypothese bestätigt. Dies steht im Einklang mit Studien aus der Literatur, in denen Prophagen aus *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium relativ häufig zu exprimieren waren (Akhtar et al. 2014, Mahmoud et al. 2018).

Dass aus Typhimurium mehr Phagen aktiviert werden konnten als aus Enteritidis, ist nicht überraschend. Auch in der Literatur wurden Prophagen häufiger aus *Salmonella* Typhimurium als aus *Salmonella* Enteritidis induziert (Akhtar et al. 2014, Mahmoud et al. 2018).

### 5.2 Virulenzgene

Ziel dieser Studie war nicht nur, die Salmonellaisolate auf das Vorhandensein von Prophagen zu überprüfen, sondern auch Virulenzgene im Genom der isolierten Phagen nachzuweisen. Interessant ist dabei, dass mehrere Virulenzgene bei den Proben der *Salmonella* Typhimurium-Stämme detektiert, aber keine der *Salmonella* Enteritidis-Proben positiv auf diese Genfragmente getestet werden konnten. Das bedeutet, dass Phagen des Serovars Typhimurium eine größere Relevanz hinsichtlich einer etwaigen Transduktion von Virulenzgenen auf neue Wirtsstämme haben könnten. Da aus der Enteritidis-Positivkontrolle allerdings fünf der sieben Sequenzen nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen, dass keiner der Enteritidisphagen diese Genfragmente in seinem Genom aufnehmen konnte.

*SspH1* und *gipA* waren bei allen bzw. 94 % Typhimuriumphagensuspensionen vorhanden. Dies war anzunehmen, da es sich hierbei um an Phagen gebundene Virulenzgenfragmente handelt (Proroga et al. 2019). Proroga et al. (2019) konnte bei 79,00 % (*sspH1*) bzw. 74,20 % (*gipA*) der Phagenisolate des Serovars Typhimurium nachweisen. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von Huehn et al. (2010), die *sspH1* aus keinem ihrer untersuchten Isolate exprimieren konnten.

Zu diesen mit Phagen in Zusammenhang stehenden Virulenzgenfragmenten zählt auch *sopE* (Proroga et al. 2019). Das Genfragment *sopE 50/51* wurde nur bei fünf der 40 Proben in dieser

Studie detektiert. Das stimmt auch überein mit den Ergebnissen in der Literatur, in der nur 12,90 % der Phagen *sopE* trugen (Proroga et al. 2019). Auch eine ältere Studie von Miroid et al. (1999) spricht davon, dass *sopE* nur selten bei Typhimuriumisolaten vorkommt. *SopE 44/45* konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Interessanterweise fiel der Test auf *spvC* bei einem Phagenlysat positiv aus. Bei *spvC* handelt es sich um ein plasmidgebundenes Genfragment (Proroga et al. 2019). Dieses war auch im ATCC 14028 positiv. Es ist möglich, dass sich Prophagen auch in Plasmide einnisten und teilweise Gensequenzen aus diesen aufnehmen bzw. dass gesamte Plasmide von Phagen aufgenommen werden (Jiang und Paul 1998). Derartige Mechanismen könnten dieses positive Ergebnis erklären.

Die übrigen Virulenzgenfragmente (*sefC*, *arnC*) konnten in keinem der Phagenlysate nachgewiesen werden und sind auch in der Literatur nicht bei den prophagengebundenen Virulenzgenfragmenten zu finden (Proroga et al. 2019). Das gibt Grund zu der Annahme, dass diese Virulenzgensequenzen natürlicherweise nicht oder sehr selten durch Phagen übertragen werden.

Anzumerken ist, dass allein die Aktivierbarkeit von Prophagen und das Vorhandensein von Virulenzgenfragmenten noch nicht bedeutet, dass diese auch auf weitere Wirtsstämme transduziert werden. In dieser Studie wurden nur die Lyse von Kolonien der Rezipientenstämme und die Virulenzgenfragmente in den aktivierten Phagen nachgewiesen.

### **5.3 Optimierung der Methodik**

Es gibt immer Möglichkeiten, eine Arbeit zu verbessern. Eine Optimierung unter anderem wäre, einen größeren Pool an Bakterienisolaten heranzuziehen oder die hier verwendeten auf weitere Virulenzgenfragmente zu untersuchen.

### **5.4 Weiterführende Arbeiten**

In dieser Studie wurden einige Aspekte beleuchtet, die weiterführende Arbeiten benötigen würden. Es wurden zwar Prophagen induziert, diese zu charakterisieren und ihr Genom zu sequenzieren könnte das Ziel einer nachfolgenden Studie sein.

Um das Wirtsspektrum der Prophagen zu ermitteln könnten verschiedene Wirtsstämme verwendet werden. Dadurch könnte die Spezifität der Phagen auf unterschiedliche

Rezipientenstämme getestet werden. Durch die Verwendung weiterer Wirtsstämme, würde auch die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass weitere Prophagen mit anderer Spezifität aktiviert werden könnten.

In dieser Studie und auch in einigen der Literaturstellen (Akhtar et al. 2014, Mahmoud et al. 2018) konnten häufiger Phagen aus dem Serovar Typhimurium als aus dem Serovar Enteritidis exprimiert werden. Den Mechanismus dahinter herauszufinden, ob und warum diese Serovare enger oder weniger eng mit Phagen interagieren bzw. ob diese Resistenzmechanismen gegenüber Phagen ausbilden, könnte in weiterführenden Arbeiten behandelt werden.

Folgearbeiten könnten sich außerdem mit einer möglichen Transduktion von Virulenzgenfragmenten auf andere Hosts auseinandersetzen. Weiterführend dazu könnte untersucht werden, ob Phagen in der Umwelt überleben und nach einer gewissen Zeit nach wie vor in der Lage sind, ihre DNA zu transduzieren. Dies würde die Bedeutung von Phagen als Zwischenlager für Virulenzgene unterstreichen.

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Deutsche Abfassung

*Salmonella* sind mit unter anderem eine der wichtigsten Krankheitserreger im Lebensmittelbereich. Ihre weltweite Verbreitung macht die Salmonellose zu einem Problem allgemeinen Interesses. Bakteriophagen, kurz Phagen, tragen dabei einen wesentlichen Teil zu der Anpassungsfähigkeit der Bakterien an ihre Umwelt bei. Durch horizontalen Gentransfer mittels Transduktion können Genabschnitte, die für Virulenzfaktoren kodieren, zwischen Bakterien übertragen werden bzw. durch die lysogene Konversion temporär zur Verfügung gestellt werden. Diese Virulenzfaktoren verändern die phänotypische Erscheinung ihres Trägers, indem sie zum Beispiel die Zytoskelettstruktur, die Zellmembran oder ihre Immunresistenz modellieren und dadurch ihre Virulenz gegenüber anderen Zellen erhöhen.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass aus 80 % der untersuchten *Salmonella* Typhimurium-Isolate und 8 % der *Salmonella* Enteritidis-Isolate Phagen isoliert werden konnten. Dabei wurden durchschnittlich  $4,65 \cdot 10^6$  PFU/ml bzw.  $1,00 \cdot 10^4$  PFU/ml detektiert. Aus den Phagensuspensionen der Typhimuriumisolate enthielten alle Proben Genfragmente von *sphH1* und *gipA*, 12,50 % enthielten *sopE 50/51* und 2 % *spvC*. Im Gegensatz dazu konnten in keinem der Phagenlysate der Enteritidis-Isolate Genabschnitte nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine größere Bedeutung des Serovars Typhimurium in der Transduktion von Virulenzgenen auf neue Wirtsstämmen hindeuten. Interessanterweise ließen sich aus dem Rezipientenstamm für Typhimurium, ATCC 14028, nur drei Virulenzgene (*gipA*, *sopE 50/51*, *spvC*) detektieren, aus dem Rezipientenstamm für Enteritidis, DSM 17420, allerdings fünf von sieben (*sopE 50/51*, *sopE 44/45*, *sphH1*, *sefC*, *spvC*).

Die Virulenzgene *sefC* und *arnC* konnten in keiner Phagensuspension der Probenisolate detektiert werden, weder in den Isolaten des Serovars Typhimurium noch denen des Serovars Enteritidis. Dies deutet darauf hin, dass Phagen diese Gene nicht oder nur sehr selten übertragen. Selbiges kann für *spvC* angenommen werden, das nur in einer Probe nachgewiesen wurde.

## 6.2 English version

*Salmonella* is among the most important pathogens in the food sector. Its worldwide prevalence turns salmonellosis into a problem of common interest. Thereby, bacteriophages, short phages, contribute significantly to the adjustability of these bacteria within their environment. Horizontal gene transfer via transduction enables the transmission of gene sequences, which themselves encode virulence factors, from one bacteria to another. Lysogenic conversion is another way of making these factors temporary available for the bacteria. Virulence factors can change the phenotypic appearance of their host by modelling its cytoskeleton, its cell membrane or its immune resistance, increasing its virulence against other cells by doing so.

In this study phages could be isolated from 80 % of the *Salmonella* Typhimurium isolates and from 8 % of the *Salmonella* Enteritidis isolates. Respectively,  $4.65 \cdot 10^6$  PFU/ml and  $1.00 \cdot 10^4$  PFU/ml were detected on average. All acquired phage suspensions of the serovar Typhimurium contained *sspH1* and *gipA*, 12.50 % contained *sopE 50/51* and 2 % *spvC*. Contrary to this, the phage lysates of the serovar Enteritidis did not show any gene sequences of the investigated virulence genes. This could indicate that the serovar Typhimurium plays a major role when it comes to the transduction of virulence factors onto new hosts. Interestingly, the recipient host of Typhimurium, ATCC 14028, only tested positive for three virulence genes (*gipA*, *sopE 50/51*, *spvC*), whereas the recipient host of Enteritidis, DSM 17420, did so for five out of seven genes (*sopE 50/51*, *sopE 44/45*, *sspH1*, *sefC*, *spvC*).

The virulence genes *sefC* and *arnC* could not be detected in any phage suspension, neither from isolates of the serovar Typhimurium nor from isolates of the serovar Enteritidis. This could indicate that phages do not or only very seldom transfer these genes. The same fact can be assumed for *spvC*, which tested positive in only one sample.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Corynebacterium</i>
ca.	circa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E.	<i>Escherichia</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
et al.	et alii – und weitere
FDA	Food and Drug Administration
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
IL	Interleukin
kb	kilo Basenpaare
LB-Agar	Luria Bertani-Agar
LB-Broth	Luria Bertani-Broth
McF	McFarland Faktor
mg	Milligramm
MH-Broth	Müller Hinton-Broth
mM	Millimol
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer

OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PES	Polyethersulfon
PFU	plaque forming units – Plaque formende Einheiten
PI-Puffer	Prophageninduktionspuffer
PS	Phagensuspension
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute – Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Salmonella</i>
SM-Puffer	Puffer mit Natriumchlorid und Magnesiumsulfat
ssLB-Agar	semisolider LB-Agar
TAE-Puffer	Puffer mit Tris-Base, Essigsäure und EDTA
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8. Literaturverzeichnis

- Akhtar M, Viazis S, Diez-Gonzalez F. 2014. Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control*, 38:67–74.
- Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D. 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3):560–602.
- Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann M-L, Brüssow H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4):417–424.
- Clouthier SC, Müller KH, Doran JL, Collinson SK, Kay WW. 1993. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 175(9):2523–2533.
- D'Alessandro B, Pérez Escanda V, Balestrazzi L, Iriarte A, Pickard D, Yim L, Chabalgoity JA, Betancor L. 2018. A novel prophage identified in strains from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is a phylogenetic signature of the lineage ST-1974. *Microbial Genomics*, 4(3).
- Díaz-Muñoz SL, Koskella B. 2014. Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments. *Advances in Applied Microbiology*. 135–183, Elsevier;
- Edwards RA, Schifferli DM, Maloy SR. 2000. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3):1258–1262.
- EFSA, ECDC. 2018. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 276.
- Ehrbar K, Hardt W. 2005. Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infection, Genetics and Evolution*, 5(1):1–9.
- El-Sharkawy H, Tahoun A, El-Gohary AE-GA, El-Abasy M, El-Khayat F, Gillespie T, Kitade Y, Hafez HM, Neubauer H, El-Adawy H. 2017. Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms in Egypt. *Gut Pathogens*, 9(1):8.
- Figuroa-Bossi N, Coissac E, Netter P, Bossi L. 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 25(1):161–173.
- Figuroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. 2001. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 39(2):260–272.

- Fillol-Salom A, Alsaadi A, Sousa JAM de, Zhong L, Foster KR, Rocha EPC, Penadés JR, Ingmer H, Haaber J. 2019. Bacteriophages benefit from generalized transduction. *PLOS Pathogens*, 15(7):1007888.
- Fortier L-C, Sekulovic O. 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5):354–365.
- Friebel A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, Hardt W-D. 2001. SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* Activate Different Sets of RhoGTPases of the Host Cell. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36):34035–34040.
- Galan JE, Zhou D. 2000. Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16):8754–8761.
- Haraga A, Miller SI. 2006. A *Salmonella* type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cellular Microbiology*, 8(5):837–846.
- Housby JN, Mann NH. 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14(11–12):536–540.
- Huang C, Shi J, Ma W, Li Z, Wang J, Li J, Wang X. 2018. Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, 111:631–641.
- Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, et al. 2010. Virulotyping and Antimicrobial Resistance Typing of *Salmonella enterica* Serovars Relevant to Human Health in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5):523–535.
- Jamal M, Bukhari SMAUS, Andleeb S, Ali M, Raza S, Nawaz MA, Hussain T, Rahman S u., Shah SSA. 2019. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, 59(2):123–133.
- Jiang SC, Paul JH. 1998. Significance of Lysogeny in the Marine Environment: Studies with Isolates and a Model of Lysogenic Phage Production. *Microbial Ecology*, 35(3):235–243.
- Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C, Li S, Chen S, Zhou J-M, Shao F. 2007. The Phosphothreonine Lyase Activity of a Bacterial Type III Effector Family. *Science*, 315(5814):1000–1003.
- Lin QY, Tsai Y-L, Liu M-C, Lin W-C, Hsueh P-R, Liaw S-J. 2014. *Serratia marcescens* arn, a PhoP-Regulated Locus Necessary for Polymyxin B Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9):5181–5190.
- Mahmoud M, Askora A, Barakat AB, Rabie OE-F, Hassan SE. 2018. Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella*

- serovars isolated from broilers in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 266:8–13.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6):882–889.
- Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. 2001. Virulence Plasmid-Borne *spvB* and *spvC* Genes Can Replace the 90-Kilobase Plasmid in Conferring Virulence to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Subcutaneously Inoculated Mice. *Journal of Bacteriology*, 183(15):4652–4658.
- Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P, Holden DW. 2008. *SpvC* is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology*, 67(6):1371–1383.
- Miao EA, Scherer CA, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ, Miller SI. 1999. *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Molecular Microbiology*, 34(4):850–864.
- Miold S, Rabsch W, Rohde M, Stender S, Tschape H, Russmann H, Igwe E, Hardt W-D. 1999. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein *SopE* from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17):9845–9850.
- Miold S, Rabsch W, Tschäpe H, Hardt W-D. 2001. Transfer of the *Salmonella* type III effector *sopE* between unrelated phage families 1. Edited by M. Gottesman. *Journal of Molecular Biology*, 312(1):7–16.
- Nabil NM, Tawakol MM, Hassan HM. 2018. Assessing the impact of bacteriophages in the treatment of *Salmonella* in broiler chickens. *Infection Ecology & Epidemiology*, 8(1):1539056.
- Ozbuyukkaya G, Ozkirimli Olmez E, Ozergin Ulgen K. 2014. Aminopurine derivatives as putative *SopE* inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(1):137–145.
- Petsong K, Benjakul S, Chaturongakul S, Switt A, Vongkamjan K. 2019. Lysis Profiles of *Salmonella* Phages on *Salmonella* Isolates from Various Sources and Efficiency of a Phage Cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms*, 7(4):100.
- Proroga YTR, Mancusi A, Peruzzy MF, Carullo MR, Montone AMI, Fulgione A, Capuano F. 2019. Characterization of *Salmonella Typhimurium* and its monophasic variant 1,4, [5],12:i:- isolated from different sources. *Folia Microbiologica*, 64(6):711–718.

- Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb JS, Kjelleberg S. 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *The ISME Journal*, 3(3):271–282.
- Sharma S, Chatterjee S, Datta S, Prasad R, Dubey D, Prasad RK, Vairale MG. 2017. Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1):17–55.
- Stanley TL, Ellermeier CD, Slauch JM. 2000. Tissue-Specific Gene Expression Identifies a Gene in the Lysogenic Phage Gifsy-1 That Affects *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Survival in Peyer's Patches. *Journal of Bacteriology*, 182(16):4406–4413.
- Thomson N, Baker S, Pickard D, Fookes M, Anjum M, Hamlin N, Wain J, House D, Bhutta Z, Chan K, et al. 2004. The Role of Prophage-like Elements in the Diversity of *Salmonella enterica* Serovars. *Journal of Molecular Biology*, 339(2):279–300.
- Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, et al. 2008. Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research*, 18(10):1624–1637.
- Vazeille E, Chassaing B, Buisson A, Dubois A, de Vallée A, Billard E, Neut C, Bommelaer G, Colombel J-F, Barnich N, et al. 2016. GpA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated *Escherichia Coli*: *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(1):68–81.
- Vonaesch P, Sellin ME, Cardini S, Singh V, Barthel M, Hardt W-D. 2014. The *Salmonella* Typhimurium effector protein SopE transiently localizes to the early SCV and contributes to intracellular replication: SopE localizes to SCV. *Cellular Microbiology*, 16(12):1723–1735.
- Wagner PL, Waldor MK. 2002. Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. *Infection and Immunity*, 70(8):3985–3993.
- Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, Wood TK. 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nature Communications*, 1(1):147.
- Wassenaar TM, Gastra W. 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiology Letters*, 201(1):1–7.
- Wommack KE, Hill RT, Kessel M, Colwell' RR. 1992. Distribution of Viruses in the Chesapeake Bay. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 58:6.
- Xia G, Wolz C. 2014. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21:593–601.

Zeng L, Skinner SO, Zong C, Sippy J, Feiss M, Golding I. 2010. Decision Making at a Subcellular Level Determines the Outcome of Bacteriophage Infection. *Cell*, 141(4):682–691.

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.1 Abbildungen

Abb. 3.1: Die 10 µl Verdünnung des Isolates 7 des Serovars Typhimurium zur Veranschaulichung der Dokumentation — Unterseite.....	20
Abb. 3.2: 10 µl Verdünnung des Isolates 7 des Serovars Typhimurium — Oberseite ohne Deckel.....	20
Abb. 4.1: Agarplatte des Isolates 8 des Serovars Typhimurium in 10 µl Verdünnung. ....	24
Abb. 4.2: Agarplatte des Isolates 28 des Serovars Typhimurium. Gleich wie beim Isolat 8 wurde hier die 10 µl Verdünnung zur Auszählung herangezogen.....	24
Abb. 4.3: Agarplatte des Isolates 26 des Serovars Typhimurium. Die von den Phagen lysierten Stellen sind hier sehr variabel. Dies deutet auf verschiedene Phagen mit unterschiedlicher lytischer Kompetenz hin. ....	25
Abb. 4.4: Agarplatte des Isolates 27 des Serovars Typhimurium. Die PFU zeigen sich relativ regelmäßig die Größe betreffend und liegen anzahlmäßig zwischen denen der Isolate 8 bzw. 28 und 30. ....	25
Abb. 4.5: Agarplatte des Isolates 30 des Serovars Typhimurium. Bei dieser 10 µl Verdünnung ist die starke Variabilität der Phagen im Vergleich zu den Phagenisolaten der Platten in Abb. 4.1 und 4.2 zu sehen; einerseits bezüglich der Form der PFU, andererseits bezüglich der Anzahl an induzierten Prophagen. ....	25
Abb. 4.6: Agarplatten des Isolates 11 des Serovars Typhimurium. Hier ist bereits die 1 ml Verdünnung ausreichend, um die Phagen einzeln auf der Platte darstellen zu können. ....	26
Abb. 4.7: Negativ (links) und positiv (rechts) Kontrolle des Serovars Typhimurium. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um den Stamm ATCC 14028, bei der Positivkontrolle wurde PS 10 <sup>-6</sup> Salmonex 14110-150s dem Stamm beigefügt. ....	26
Abb. 4.8: PCR-Ergebnisse zu dem Virulenzgen gipA. Hier wurden sowohl die Phagenlysate des Serovars Typhimurium als auch des Serovars Enteritidis getestet. Die negativen Proben sind deutlich zu erkennen. PS 7 ist nur schwach positiv. ....	29
Abb. 4.9: 1 ml Verdünnung des Enteritidisisolates s 7 auf ATCC 14028. Die Phagenplaques sind klein und im Foto heben sie sich kaum vom Hintergrund ab (Pfeile).....	31

- Abb. 4.10: Negativ- (links) und Positivkontrollen (rechts) des Serovars Enteritidis. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um den reinen Rezipientenstamm, bei der Positivkontrolle wurde PS  $10^{-6}$  Salmoalex 14110-150s dem Stamm beigefügt.....31
- Abb. 4.11: Agarplatten des Isolates 27 des Serovars Typhimurium (links – 10 µl Verdünnung) und des Isolates s 7 des Serovars Enteritidis (rechts – 1 ml Verdünnung) im Vergleich. Die Phagen von Enteritidis sind im Gegensatz zu denen von Typhimurium kaum zu erkennen.....33

## 9.2 Tabellen

- Tab. 3.1: Auflistung der verwendeten Materialien .....17
- Tab. 4.1: Isolate des Salmonella Serovars Typhimurium, aus denen Prophagen induziert werden konnten, sowie die Proben, die keine Prophagen enthielten. Die Anzahl der Phagen ist in PFU/ml angegeben. Die Platten, auf denen zu viele Phagen waren, sind mit „nicht auszählbar“ markiert. Diejenigen, die aufgrund eines Fehlers nur geschätzt wurden sind mit „größer als ...“ gekennzeichnet.....23
- Tab. 4.2: Virulenzgenfragmente, die in den Phagenlysaten aus Salmonella Typhimurium nachgewiesen werden konnten.....27
- Tab. 4.3: Amplifizierbare Virulenzgenfragmente aus der DNA von S. Typhimurium ATCC 14028.....28
- Tab. 4.4: Isolate des Salmonella Serovars Enteritidis, aus denen auf DSM 17420 Prophagen induziert werden konnten, sowie die Proben, die keine Prophagen enthielten. Die Anzahl der Phagen ist in PFU/ml angegeben.....30
- Tab. 4.5: Aktivierbare Virulenzgenfragmente aus der Positivkontrolle für S. Enteritidis DSM 17420.....32