

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

Stammspezifische Identifizierung pathogener und biotechnologisch relevanter Bakterien durch in vitro Amplifikation und Detektion charakteristischer Genfragmente

André Mehlen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer
2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 25.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 11.08.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	7
1 Mikroorganismen	7
2 Nährmedien	8
3 Zellanzucht und Stammhaltung.....	8
4 Nukleinsäureisolierung.....	9
4.1 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNS nach Wisotzkey <i>et al.</i> (1990, mod.)	9
4.2 Isolierung von Plasmid-DNS	10
5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	11
6 Agarosegelelektrophorese	12
7 Enzymatische Modifikationen von DNS.....	13
7.1 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen.....	13
7.2 Verknüpfung von DNS-Molekülen mit T4-DNS-Ligase.....	13
8 Verwendete Oligonukleotid-Primer für PCR- und Sequenzierungstechniken.....	14
8.1 PCR-Primer	14
8.2 Adaptoren	14
8.3 Sequenzierprimer	15
9 In vitro Amplifikation und Markierung von DNS mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki <i>et al.</i> (1988)	15
9.1 Allgemeines.....	15
9.2 PCR mit dem <i>Ex Taq</i> TM -Kit (TaKaRa Shuzo Co., Otsu, J).....	16
9.3 Klonierung von PCR-Produkten	16
9.4 Sonderformen der PCR	17
9.4.1 Gradienten-PCR	17
9.4.2 Amplifikation von DNS aus Zellen.....	18
9.4.3 Random and limited PCR (RL-PCR).....	18
9.5 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	19
10 Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH).....	19
10.1 Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen	19
10.2 Vorbereitende Arbeiten	20
10.2.1 Präparation der Adaptoren	20
10.2.2 Restriktionsverdau der DNS und Ligation der Adaptoren.....	20
10.2.3 Präparation der Ziel- und der Subtraktor-DNS	20
10.2.4 Durchführung der Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH).....	20
10.2.4.1 Beschichten der Mikrotiterplatten mit Subtraktor-DNS	20
10.2.4.2 Ausschlußhybridisierung.....	21
10.2.4.3 Isolierung und Analyse der stammspezifischen Ziel-DNS	22
10.3 Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH).....	23
11 Sequenzanalyse von DNS	23
11.1 Sequenzierung	24
11.2 Polyacrylamidgelelektrophorese	25

12	Auswerten der Sequenzdaten und Konstruktion stammspezifischer Primer	26
13	Durchführung stammspezifischer PCR-Ansätze.....	26
14	Methoden zur Isolierung und Identifizierung spezifischer DNS-Fragmenten	27
14.1	RL-PCR.....	27
14.2	Spezifisches DNS-Fischen	28
14.2.1	DNS-Fischen mit stammspezifischen Primern	29
14.2.2	Molekulare Screeningmethode.....	30
C. Ergebnisse		31
1	Differenzierung von 3 <i>Streptomyces</i> Stämmen mittels Mikrotiterplatten- Ausschlußhybridisierung (MASH) entwickelter Primer.....	31
1.1	Entwicklung stammspezifischer Primer	31
1.2	PCR mit dem Hybridisierungsüberstand.....	32
1.3	Mit MASH isolierte DNS-Fragmente, für die einzelnen <i>Streptomyces</i> Stämme spezifische DNS-Fragmente.....	33
1.3.1	<i>Streptomyces</i> sp. A spezifisches DNS-Fragment	33
1.3.2	<i>Streptomyces</i> sp. A und <i>Streptomyces</i> sp. C spezifische DNS-Fragmente	34
1.3.3	<i>Streptomyces</i> sp. B spezifische DNS-Fragmente	35
1.4	In vitro Amplifikationen mit den <i>Streptomyces</i> sp. B spezifischen Primern	37
1.5	In vitro Amplifikationen mit den <i>Streptomyces</i> sp. A und <i>Streptomyces</i> sp. C spezifischen Primern	38
1.6	Differenzierung zwischen <i>Streptomyces</i> sp. A und <i>Streptomyces</i> sp. C	38
1.7	Spezifität und PCR-Bedingungen für die konstruierten und getesteten <i>Streptomyces</i> - spezifischen Primerpaare.....	39
2	Konstruktion pathovarspezifischer Oligonukleotidprimer für verschiedene <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> Pathovare.....	40
2.1	Mit MASH isolierte pathovarspezifische DNS-Fragmente	40
2.1.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> spezifisches DNS-Fragment	40
2.1.2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> spezifisches DNS-Fragment.....	40
2.1.3	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> spezifisches DNS-Fragment	41
2.1.4	<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> spezifisches DNS-Fragment.....	42
2.1.5	<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> spezifisches DNS-Fragment	42
2.2	In vitro Amplifikationen mit den verschiedenen <i>Xanthomonas</i> -Primer	43
2.2.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> spezifisches Primerpaar	43
2.2.2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> spezifisches Primerpaar.....	43
2.2.3	<i>Xanthomonas hortorum</i> (campestris) pv. <i>pelargonii</i> spezifisches Primerpaar.....	44
2.2.4	<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> spezifisches Primerpaar.....	44
2.2.5	Differenzierung zwischen <i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> und <i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i>	44
2.2.6	Gradienten-PCR zur Differenzierung zwischen <i>X.</i> pv. <i>lobelia</i> und <i>X.</i> pv. <i>isotoma</i>	45
2.2	Spezifität und PCR-Bedingungen für die entwickelten und getesteten <i>Xanthomonas</i> - spezifischen Primer	46
3	Konstruktion artspezifischer Oligonukleotidprimer für verschiedene <i>Legionella</i> Stämme.....	48
3.1	Mit MASH isolierte artspezifische Legionellen DNS-Fragmente	48
3.1.1	<i>Legionella pneumophila</i> Corby spezifisches DNS-Fragment.....	48
3.1.2	<i>Legionella longbeachae</i> spezifische DNS-Fragmente	49
3.1.3	<i>Legionella hackeliae</i> spezifische DNS-Fragmente	50
3.1.4	LLAP10 spezifische DNS-Fragmente.....	51
3.2	In vitro Amplifikationen mit den verschiedenen <i>Legionella</i> -spezifischen Primer	51

3.2.1	<i>Legionella pneumophila</i> Corby spezifisches Primerpaar.....	52
3.2.2	<i>Legionella longbeachae</i> spezifische Primerpaare	52
3.2.3	<i>Legionella hackeliae</i> spezifische Primerpaare	53
3.2.4	<i>Legionella</i> LLAP 10 spezifisches Primerpaar.....	53
3.3	Spezifität und PCR-Bedingungen für die entwickelten und getesteten <i>Legionella</i> -spezifischen Primer	54
4.	„Spezifisches DNS-Fischen“ in Mikrotiterplatten und Identifizierung der isolierten DNS-Fragmente.....	57
4.1	Vergleichende Sequenzanalyse von drei virB11-Varianten.....	57
4.2	Vergleichende Sequenzanalyse von zwei Typ IV pre-pilin Leader Peptidase-Varianten	59
5	Entwicklung einer Screeningmethode im MTP-Format	60
5.1	Prinzip der molekularen Screeningmethode	60
5.2	Isolierung und Analyse der unterschiedlichen <i>Paenibacillus polymyxa</i> Spacer	61
5.2.1	Sequenzanalyse der isolierten Spacer-DNS	62
5.2.2	Suche nach t-RNS-Genen in den Spacersequenzen	64
5.2.3	Konstruktion operonspezifischer Primer ausgehend von den unterschiedlichen Spacersequenzen	64
5.2.4	PCR mit den entwickelten operonspezifischen Primern	65
5.2.5	16S-rRNS Sequenzanalyse.....	65
5.2.6	Konstruktion verschiedener 16S-rRNS operonspezifischer Primer.....	65
5.2.7	Operonspezifische in vitro Amplifikationen mit verschiedenen Primerkombinationen.....	66
5.3	Zusammenfassung der verschiedenen Primerkombinationen	67
D.	Diskussion.....	68
1	Konstruktion stammspezifischer Primer mittels MASH für diverse Bakterienstämme ..	68
1.1	Einstellung der Hybridisierungsbedingungen	69
1.2	Kriterien für die Konstruktion stammspezifischer Primer und deren Anwendung.....	70
2	Konstruktion stammspezifischer <i>Streptomyces</i> -Primer	71
3	Konstruktion pathovar spezifischer <i>Xanthomonas</i> -Primer	73
3.1	Konstruktion <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> spezifischer Primer	73
3.2	Konstruktion <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> spezifischer Primer.....	75
3.3	Konstruktion <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> spezifischer Primer	75
3.4	Konstruktion <i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobeliae</i> spezifischer Primer	75
3.5	Konstruktion <i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> spezifischer Primer	76
3.6	Differenzierung zwischen <i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> und <i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ..	77
4	Konstruktion artspezifischer <i>Legionella</i> -Primer	78
4.1	Konstruktion <i>Legionella pneumophila</i> Corby spezifischer Primer.....	80
4.2	Konstruktion <i>Legionella longbeachae</i> spezifischer Primer	81
4.3	Konstruktion <i>Legionella hackeliae</i> spezifischer Primer	82
4.4	Konstruktion LLAP 10 spezifischer Primer.....	82
5	Isolierung und Identifizierung spezifischer Gene	83
5.1	Methoden zur gezielten Isolierung und Identifizierung von Genfragmenten	84
5.1.1	RL-PCR.....	84
5.1.2	Spezifisches DNS-Fischen	85
5.2	Gene von <i>Xanthomonas campestris</i> Stämmen	86
5.2.1	VirB Operon	86
5.2.2	Typ IV pre-pilin Leader Peptidase	88
5.3	Gene von <i>Legionella</i> -Arten	89
6	Screenen nach spezifischen Genfragmenten	90

6.1	Detektion der Multiple rRNS-Operone von <i>Paenibacillus polymyxa</i>	91
6.1.1	In vitro Amplifikation und Sequenzanalyse der 16S-rRNS Genvarianten	93
6.2	Anwendung der entwickelten Screeningmethode auf andere Gene.....	94
E.	Zusammenfassung	96
F.	Literatur	98
G.	Anhang	114

Abkürzungen

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
B	Belgien
bp	Basenpaar
C	Cytosin, Cytidin
D	Deutschland
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Frankreich
g	Fallbeschleunigung

G	Guanin, Guanosin
GB	Großbritannien
GC Mol%	Guanin + Cytosin
H ₂ O _{dest.}	vollentsalztes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser (MilliQ, Millipore, Eschborn, D)
IR	Infrarot
J	Japan
kb	Kilobase
M molar	(mol / l)
MASH	Mikrotiterplatten-Ausschlussybridisierung
MTP	Mikrotiterplatte
mod.	modifiziert
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönlich
POD	Meerrettichperoxidase
pv.	pathovar
rDNS	DNS kodierend für rRNS
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Finnland
sp.	Species (Einzahl)
ssp.	Subspecies
SSC	Standard-Saline-Citrat
T	Thymin, Thymidin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _D	Dissoziationstemperatur
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, Uridin
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v / v	Volumen / Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
w / v	Masse / Volumen

A. Einleitung

Zur Detektion und Identifizierung von Mikroorganismen werden verschiedene Methoden eingesetzt. Als Nachweisebenen kommen der gesamte Organismus, Zellkomponenten, Stoffwechsel- bzw. Genprodukte sowie speziesspezifische Gensequenzen in Frage. Daneben sind die Kultivierung der Mikroorganismen auf Selektiv- und Mangelmedien, immunologische und biochemische Verfahren sowie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Ehrlich et al., 1991) etablierte und standardisierte Nachweisverfahren. Eine kultivierungsunabhängige Methode ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Hierbei werden z. B. meistens Bereiche der 16S- und der 23S-rRNS als Zielstruktur verwendet, die sich aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und der hohen Kopienzahl von 10^3 - 10^4 pro Zelle sehr gut zur Detektion und Identifizierung von Mikroorganismen eignet (Amman et al., 1995). Mittels dieser Methoden ist eine zuverlässige Differenzierung von Mikroorganismen bis hin zur Artebene meistens problemlos möglich.

Immer öfters wird jedoch eine weitergehende Differenzierung von Stämmen einer Mikroorganismenspezies und deren spezifischer Nachweis unerlässlich. Da immer mehr gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVO) bei biotechnologischen Verfahren verwendet werden, benötigt man z.B. für die Risikobewertung bei unfallbedingter Freisetzung dieser GVO's zuverlässige Nachweistechiken. Des weiteren ist die ständige Kontrolle der Zusammensetzung von Starterkulturen für die Lebensmittelindustrie von enormer Bedeutung. In der Medizin ist die Differenzierung von pathogenen Stämmen einer Bakterienspezies oder Variation eines Virus und deren schnelle und sensitive Detektion essentiell. So stellen Detektions- und Identifizierungsverfahren wichtige Methoden im mikrobiologischen Labor dar, um unterschiedliche Stämme einer bestimmten Bakterienspezies zu unterscheiden. So untersucht man z.B. mit molekularbiologischen Verfahren die Ähnlichkeit bzw. informative Bereiche des Genoms verschiedener Isolate und kann identische, nahe verwandte oder nicht in Beziehung stehende Stämme identifizieren.

Eine Differenzierung verschiedener Stämme einer Spezies ist mit Hilfe der 16S-rRNS- bzw. 23S-rRNS-Gene als Zielstruktur in der Regel aber nicht mehr möglich (Stackebrandt und

Goebel, 1994), da diese Makromoleküle zu konserviert sind und sich innerhalb einer Art nicht oder nur kaum unterscheiden. So mussten für Stammdifferenzierungen alternative Unterscheidungsmöglichkeiten gesucht werden.

Viele dieser Verfahren basieren auf der Erzeugung von DNS-Bandenmuster, welche dann für die Differenzierung der verschiedenen Stämme einer Spezies verwendet werden. So wird z.B. beim RFLP-Verfahren (Restriction Fragment Length Polymorphism) die DNS von Mikroorganismen spezifisch mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und dadurch der sogenannte „genetische Fingerabdruck“ generiert, welcher z.B. mittels Gelelektrophorese visualisiert und dann verglichen wird. Bei der AFLP-(Amplified Fragment Length Polymorphism) Methode (Vos et al., 1995) wird die DNS mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten und an die Enden der entstanden Fragmente werden verschiedene Adaptoren ligiert. In einem PCR-Schritt werden die Fragmente, die zwei unterschiedliche Adaptoren an ihren Enden besitzen, selektiv amplifiziert. Die so erhaltenen PCR-Produkte werden elektrophoretisch aufgetrennt, wodurch ein stammspezifisches DNS-Bandenmuster erzeugt werden soll. Eine andere Methode, bei der mit Hilfe der PCR spezifische Bandenmuster erzeugt werden, ist die RAPD-(Randomly Amplified Polymorphic DNA) PCR (Welsh et al., 1990). Durch den Einsatz sehr kurzer Oligonukleotidprimer, Hexamere z.B., werden bei diesem Verfahren mittels PCR spezifische DNS-Bandenmuster erzeugt und für die Differenzierung verwendet. Hierbei handelt es sich um einige der gängigsten Methoden um unterschiedliche Isolate zu identifizieren. Bei all diesen Methoden sind die erzeugten Bandenmuster abhängig von den wenigen Sequenzunterschieden auf der chromosomalen DNS, die entweder als Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme oder als Primerbindestellen benutzt werden. Deshalb wird man, je nach Restriktionsenzym oder PCR-Bedingungen, immer andere Bandenmuster erhalten, die auch nicht immer alle Sequenzunterschiede aufzeigen können.

Die Qualität einer Typisierungsmethode wird aber daran gemessen, wie gut sie in der Lage ist, die Anforderungen, die eine optimale Differenzierung von Stämmen erfordert, zu erfüllen. So sollen die unterschiedlichen Identifizierungsmethoden folgende Kriterien erfüllen: Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit, Unterscheidungskraft, einfache Durchführung und Interpretation. So kann sich z. B. die Interpretation des Ergebnisses als sehr schwierig gestalten, wenn ein sehr komplexes Muster als Ergebnis vorliegt.

Eine Methode, die nicht auf der Generierung spezifischer Bandenmuster beruht, sondern auf der Isolierung stammspezifischer DNS-Fragmente, ist die Ausschlusshybridisierungstechnik (Bjourson et Cooper 1988). Eine weiterentwickelte Form dieser Technik stellt das sog. MASH-Verfahren (Mikrotiterplatten-Ausschlusshybridisierung) (Wassil et al., 1998; Zwirglmair et al., 2001) dar. Wie bereits erwähnt, dienen diese subtraktiven Hybridisierungstechniken dazu, stammspezifische DNS-Fragmente zu isolieren, welche nach erfolgter Sequenzanalyse, z.B. für die Konstruktion stammspezifischer Primerpaare bzw. Sonden, genutzt werden. So sollen die verschiedenen Stämme einer Art dann nicht mehr durch ein Bandenmuster unterschieden werden, sondern durch eine stammspezifische PCR, bei welcher nur DNS des Stammes, für den das Primerpaar konstruiert wurde, die Erzeugung eines PCR-Produktes zulässt. Somit wird der Nachweis entsprechender Organismen durch den Einsatz stammspezifischer Primer erheblich vereinfacht. Bei der Durchführung der Identifizierung genügt eine normale Standard PCR. Außerdem ist die Auswertung bzw. die Differenzierung eindeutig, da sie ein positives bzw. negatives Ergebnis liefert.

In dieser Arbeit sollte sowohl für einige pflanzen- und humanpathogen Mikroorganismen als auch für biotechnologisch relevante Bakterienstämme stammspezifische Nachweise entwickelt werden. So ist bis heute z.B. die eindeutige Identifizierung einiger pflanzenpathogenen Mikroorganismen nur durch Infektion der entsprechenden Wirtspflanzen möglich. Dies ist ein zeitaufwendiger Prozess, und es ist von größtem Interesse, die Identifizierung der einzelnen *Xanthomonas* Arten bzw. Pathovaren zu vereinfachen, da diese Organismen großen wirtschaftlichen und ökologischen Schaden anrichten können. Deshalb kam es im Rahmen dieser Arbeit zu einer Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP). Es sollten für einige ausgewählte pflanzenpathogene Xanthomonaden pathovarspezifische Primer entwickelt werden, um diese durch in vitro Amplifikation routinemäßig im Labor nachweisen zu können.

Auf Grund ihrer Bedeutung für die pharmazeutische und biotechnologische Industrie wurde unter anderem auch versucht, *Streptomyces* Stämme voneinander zu differenzieren. So soll die schnelle, einfache und zuverlässige Identifizierung bzw. Differenzierung einzelner *Streptomyces* Arten und ihrer Mutanten gewährleistet sein. Es existieren bereits sowohl einige RAPD Primer, (Malakawi et al., 1999; Yuan et al., 1995; Martin et al., 2000; Kong et al., 2001) als auch *Streptomyces* spezifische Sonden (Roberts und Crawford, 2000), um zwischen zahlreichen Streptomyceten zu differenzieren. Um den oben erwähnten

Qualitätskriterien einer zuverlässigen Identifizierungsmethode gerecht zu werden, wurden stammspezifische Primer für den spezifischen Nachweis der einzelnen Stämme konstruiert. Hier kam die MASH-Methode, die sich bereits in mehreren Fällen sehr gut für solche Aufgaben bewährt hat, z. B. zur Differenzierung verschiedener *Lactococcus* Stämme (Wassil et al., 1998), zum Einsatz. Hierbei sollten auch die eventuellen Grenzen des Ausschlusshybridisierungsverfahrens in Mikrotiterplattenformat ausgetestet werden. Die Streptomyceten stellen aufgrund ihres hohen DNS GC-Gehalts von 72 % eine Herausforderung dar, da der hohe GC-Gehalt die Isolierung stammspezifische DNS-Fragmente erschwert.

Ein weiteres, ebenso spannendes Feld innerhalb der Mikrobiologie sind human-pathogene Mikroorganismen, wie Legionellen, die Verursacher der sogenannten Legionellose. Es gibt zwei Arten von Legionellose: die Legionärs-Krankheit und das Pontiak-Fieber. Bei der Legionärs-Krankheit handelt es sich um eine Lungenentzündung für die mehrere Legionellen Arten verantwortlich sein können. Der Verlauf der Krankheit kann je nach *Legionella*-Art unterschiedlich schwer sein (Harris et al., 1998; Speers and Tribe, 1994). Außerdem sind 1%-15% der „community acquired pneumonia“ durch Legionellen verursacht (Marrie et al., 1989; Friss-Moller et al., 1986). Obschon über 40 *Legionella* Arten beschrieben wurden, gibt es diagnostische Tests fast ausschließlich nur für *Legionella pneumophila* serogroup I (Plouffe et al., 1995), da die Mehrzahl *Legionella*-bedingter Lungenentzündungen hauptsächlich auf *Legionella pneumophila* zurückzuführen sind. Daneben wurden aber auch *Legionella micdadei* und *Legionella bozemanii* schon als Verursacher identifiziert (Fang et al., 1989).

Um die durch *Legionella* verursachten Infektionen zu diagnostizieren, müssen heutzutage immer noch Kultivierungsverfahren angewendet werden. Wie bereits erwähnt existieren diagnostische Tests nur für *Legionella pneumophila*. Außerdem sind die kommerziell erhältlichen Medien dahin gehend optimiert, um hauptsächlich *Legionella pneumophila* zu detektieren, während andere Legionellenarten im Wachstum unterdrückt werden (Lee et al., 1993). So muß für die anderen Legionellenarten eine Inkubationszeit von 14 Tagen angewendet werden, um überhaupt einige von den langsam wachsenden Stämmen identifizieren zu können (Taylor and Albrecht, 1995). Des Weiteren sind *Legionella* Infektionen nicht immer eindeutig zu identifizieren, da bakterielle Lungenentzündungen auch von anderen Mikroorganismen verursacht werden. Aus diesen Gründen liegt es also nahe, mit standardisierten PCR-Methoden die Erreger sicher und schnell zu identifizieren. Einige

Studien haben bereits über die Nützlichkeit von PCR-Methoden zum Nachweis von *Legionella pneumophila* (Cloud et al., 2000; Hirakata et al., 1996; Jaulhac et al., 1998; Lo Presti et al., 2000; Weir et al., 1998) berichtet.

Es existieren bereits Verfahren mit denen *Legionella*-DNS aus Blutproben mittels PCR nachgewiesen werden können (Aoki et al., 2003). Das vereinfacht die Detektion der Legionellen um ein vielfaches, da es nicht immer einfach ist, Probenmaterial aus den Lungen zu entnehmen. Ein weiterer Vorteil der PCR-Nachweisteknik ist, dass man die einzelnen *Legionella*-Arten bzw. -Stämme eindeutig nachweisen kann. Noch einfacher ist die auf PCR beruhende Detektion mit Urin als Ausgangsmaterial (Helbig et al., 1999; Maiwald et al., 1995; Socan et al., 2000). Deshalb sind spezifische Primer ein wichtiges Instrument, um die verschiedenen *Legionella*-Arten schnell und zuverlässig zu identifizieren bzw. voneinander zu differenzieren, und so gezielter gegen die entsprechenden Infektionen vorgehen zu können.

Ziel dieser Arbeit war aber nicht nur die Konstruktion stammspezifischer Primerpaare, mit deren Hilfe die verschiedenen Stämme einer Art differenziert werden sollen, sondern darüber hinaus eine weitergehende Analyse der isolierten stammspezifischen DNS-Fragmente. Wichtig für das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Krankheitserreger und Wirtszelle ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche diesen zu Grunde liegen. Durch das Verständnis dieser molekularen Mechanismen kann die Verhinderung bzw. die Bekämpfung solcher Infektionen wirkungsvoller vollzogen werden. Heute versucht man meist, die verantwortlichen Gene durch aufwendige vergleichende Genomsequenzierungen zu identifizieren. Mittels MASH kann man aber viel schneller und einfacher spezifische Genbereiche isolieren und analysieren. Außerdem kann man durch gezielte Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen die Wahrscheinlichkeit, Fragmente bestimmter Gene zu isolieren, erhöhen, indem man z. B. die Ausschlusshybridisierung mit apathogenen Stämme und einem pathogenen Stamm derselben Art durchführt. So kann man z.B. Pathogenitätsfaktoren anreichern. Da man aber mit der MASH eher kurze DNS-Fragmente (ca. 200 bp) anreichert, wurden Methoden getestet bzw. entwickelt um, ausgehend von diesen kurzen Fragmenten, größere DNS-Fragmente mit mehr Information zu erhalten, um damit eine bessere Datenbankanalyse durchführen und zusätzlich die isolierten DNS-Fragmente identifizieren zu können.

Da heute zunehmend mehr molekularbiologische Methoden neben anderen effizienten Screeningmethoden eingesetzt werden, um bestimmte Gene wie z. B. Pathogenitätsfaktoren oder Stoffwechselgene zu erfassen und zugänglich zu machen, z. B. für medizinische oder biotechnologische Zwecke, wurde eine Methode im MTP-Format entwickelt, um nach bestimmten Genen zu screenen bzw. sie zu isolieren.

B. Material und Methoden

1 Mikroorganismen

Organismus	Stammnummer	Medium	T [°C]	Anzucht
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campetris</i> ^T	LMG 568	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campetris</i> ^a	PD587	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campetris</i> ^a	PD649	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> ^T	LMG 7314	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i> ^a	LMG 817	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i> ^a	00/18/2b	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> ^T	LMG 860	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> ^a	98/103/3a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> ^a	99/113/1a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> ^a	GSPB 7/97/2719	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/54/4a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/83/3a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	93/82/2b	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/60/1b	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/83/2a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/54/1a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/83/2a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/54/2a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/60/1a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	88/54/3c	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	99/18/1a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>lobelia</i> ^a	99/18/1b	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/134/1a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/134/2a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/134/3a	M54	26	aerob

<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/175/2a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/175/2b	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/192/1a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/192/2a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/192/2b	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/270/3a	M54	26	aerob
<i>Xanthomonas</i> pv. <i>isotoma</i> ^a	01/270/4a	M54	26	aerob
<i>Legionella pneumophila</i> ^b	-	-	-	-
<i>Legionella longbeachae</i> ^b	-	-	-	-
<i>Legionella hackeliae</i> ^b	-	-	-	-
LLAP 10 ^b	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. A ^c	Isolat A	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. B ^c	Isolat B	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. C ^c	Isolat C	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ^c	-	-	-	-

Tab. B1: Verwendete Mikroorganismen

LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, B

a: Isolate zur Verfügung gestellt von Dr. G. Poschenrieder (Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising, D)

b: DNS zur Verfügung gestellt von Dr. M. Steinert (Institut für Molekulare Infektionsmikrobiologie, Würzburg, D)

c: DNS zur Verfügung gestellt von E. Waltenberger (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München, Freising, D)

T: Typstamm

2 Nährmedien

M54 (Medium 54; lt DSMZ-Katalog)

Glucose	20 g
Hefeextrakt	10 g
CaCO ₃	20 g
Agar	12 g nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	Ad 1000 ml

3 Zellanzucht und Stammhaltung

Die Stämme wurden unter den in Tab. B1 aufgeführten Bedingungen angezogen. Aerobe Anzucht erfolgte unter Schütteln in Erlenmeyerkolben bzw. auf Festmedien.

Die Stämme wurden wenige Wochen auf Festmedium bei 4 °C aufbewahrt. Zur Kontrolle auf Reinheit wurden Verdünnungsausstriche durchgeführt und ggf. die 16S-rDNS ansequenziert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen hergestellt und bei -80 °C gelagert.

4 Nukleinsäureisolierung

4.1 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNS nach Wisotzkey *et al.* (1990, mod.)

Lösungen

Saline-EDTA-Lösung:	0,15 M Natriumchlorid 0,01 M EDTA; pH 8,0
1xSSC:	0,150 M Natriumchlorid 0,015 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0
Lysozymlösung:	10 mg / ml Lysozym (Merck, Darmstadt, D) in 1xSSC
Rnase A-Lösung:	10 mg / ml Rnase A (Merck, Darmstadt, D) in 2xSSC, 10 min auf 100 °C erhitzt (zur Inaktivierung von Dnasen)
Proteinase K-Lösung:	10 mg / ml Proteinase K (Roche, Mannheim, D)
SDS-Lösung:	25% (w / v) Natriumdodecylsulfat
Natriumacetatlösung:	5 M Natriumacetat; pH 5,5
Chisom:	Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1)
Ethanol	

Zellernte und -lyse

- Zentrifugation von 2 ml ÜN-Kultur für 5 min mit 14000 x g bei 4 °C
- Aufnahme des Niederschlags in 1 ml Saline-EDTA-Lösung, erneut abzentrifugieren
- Resuspendieren der Zellen in 500 µl Saline-EDTA-Lösung
- Zugabe von 20 µl Lysozymlösung und Inkubation für 30 min bei 37 °C
- Zugabe von 5 µl Rnase A-Lösung und Inkubation für 30 min bei 37 °C
- Zugabe von 5 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 60 min bei 37 °C
- Zugabe von 40 µl SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65 °C (Inaktivierung von DNasen)

Reinigung der DNS

- Zugabe von 180 µl Natriumacetatlösung und 745 µl Chisom, schütteln
- Zentrifugation für 5 min mit 14000 x g bei RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase

- Zugabe von 2 Vol Ethanol und Fällern der DNS für 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zentrifugation für 2 min mit $14000 \times g$ bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Waschen der DNS mit 70%igem Ethanol
- Zentrifugation für 1 min mit $14000 \times g$ bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Trocknen der DNS für 10 min in der Vakuumzentrifuge
- Aufnehmen der DNS in $100\ \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2 Isolierung von Plasmid-DNS

Plasmidschnellisolierung nach Holmes und Quigley (1981)

Lösungen

STET-Puffer:	8% (w / v) Saccharose 5% (w / v) Triton-X-100 (Serva, Heidelberg, D) 50 mM EDTA 50 mM Tris / HCl, pH 8,0
Lysozymlösung:	10 mg / ml Lysozym (Merck, Darmstadt, D) in 1xSSC

Die Zellen wurden durch Hitze ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) und in Gegenwart von STET-Puffer und Lysozym aufgeschlossen. Anschließend wurden die gewonnene Plasmid-DNS durch Isopropanolfällung gereinigt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Standard-Protokoll nach Holmes und Quigley (1981).

Plasmidisolierung mittels kommerziell erhältlicher Systeme

Plasmid-DNS, die einer Sequenzanalyse unterzogen werden sollte, wurden mit Hilfe des Plasmid-Präparations-Kits „Mini-Prep Plasmid-Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden, D) aus den Zellen gewonnen. Die mitgelieferten und gebrauchsfertigen Puffer wurden laut Standardprotokoll des Herstellers verwendet. Der Zellaufschluss erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, dem sich die Reinigung der Plasmid-DNS mittels Säulenchromatographie anschließt. Dabei bindet die DNS in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration und eines niedrigen pH-Wertes (pH 5) an das modifizierte Silicagel der Anionenaustauscher-Säule, während Polysaccharide, Nukleotide und Proteine im folgenden Waschschrift abgetrennt

werden. Die Elution der Plasmid-DNS erfolgt mit einem geeigneten Puffer mit höherem pH-Wert ($\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ oder Tris / HCl, pH 8,5).

5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die einzelnen Nukleotide der DNS haben ihr Absorptionsmaxima zwischen 253 nm und 271 nm (pH 7,0). Zur Konzentrationsbestimmung nach Clark und Switzer (1977) wurde ein Aliquot der DNS-Lösung in eine Quarzküvette überführt und in einem Spektralphotometer (Pharmacia, Freiburg, D) bei 260 nm vermessen.

Folgende Näherungswerte (www.Eppendorf.com) lagen der Konzentrationsbestimmung zugrunde:

Doppelsträngige (ds) DNS: 1 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ entspricht 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Einzelsträngige (ss) DNS: 1 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ entspricht 33 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Verunreinigungen können durch die Bestimmung der Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm und Bildung der Quotienten $E_{260\text{nm}} / E_{230\text{nm}}$ und $E_{260\text{nm}} / E_{280\text{nm}}$ festgestellt werden. Dabei gelten folgende Richtwerte (Marmur, 1961):

$$\frac{E_{260\text{nm}}}{E_{230\text{nm}}} > 2,2 \quad \text{und} \quad \frac{E_{260\text{nm}}}{E_{280\text{nm}}} > 1,9$$

Zur Berechnung der Konzentration von einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden die Werte aus Tab. B2 in Verbindung mit folgender Formel verwendet:

$$c = \frac{V_{\text{Mess}} \times \text{OD}_{260\text{nm}}}{V_{\text{Probe}} \times \epsilon \times d}$$

c: Konzentration des Oligonukleotids [mM]

V_{Mess} : Messvolumen [ml]

V_{Probe} : Probenvolumen [ml]

d: Schichtdicke [cm]

ϵ : Oligonukletidspezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$];
berechnet aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Nukleotide (vgl. Tab. B2) des Oligonukleotids

Nukleotid	Extinktionskoeffizient bei 260 nm [$\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$]	Molekulargewicht [g / mol]
DAMP	15,20	312,2
DCMP	7,05	288,2
DGMP	12,01	328,2
DTMP	8,40	303,2

Tabelle B2: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der Desoxynukleotide

6 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld im Agarosegel nach Masse und Konformation (linear, offen zirkular bzw. superhelikal) aufgetrennt. Durch Anlagerung von SYBRGreenTM kann die DNS unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe, Reinheit oder Konzentration von Nukleinsäuren (chromosomale DNS, DNS-Amplifikate, Plasmide) verwendet. Zur Bestimmung der Größe und Menge der aufgetragenen DNS erfolgte ein visueller Vergleich der Banden mit einem mitgeführten Längenstandard bekannter Menge. Zu beachten ist dabei, dass das Mengenverhältnis von SYBRGreenTM zu DNS das Laufverhalten beeinflussen kann.

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

100xTAE:	4,0 M Tris 2,0 M Eisessig 0,2 M EDTA; pH 8,0
Agarosegel:	1-2% Agarose (Gibco / BRL, Eggenstein, D) in 1xTAE aufschmelzen
Probenpuffer	10 mM EDTA 5% (w / v) Ficoll (Sigma, Deisenhofen, D) v) Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 0,05% SYBRGreen TM 0,10% FMC BioProducts, Rockland, ME, USA)
Standard:	1 µg 1-kb-Standard (Gibco / BRL, Eggenstein, D)
Apparatur	Horizontalgelelektrophoreseapparatur Typ H3: 11 x 14 cm, 100 ml Gelvolumen (Gibco / BRL, Eggenstein, D)
Geldokumentation	UV-Transilluminator, Wellenlänge: 302 nm (Bachofer, Reutlingen, D) Cybertech CS1 Image Dokumentation System (Cybertech, Berlin, D)

Elektrophorese-Bedingungen

- Probe bzw. Standard mit 1 Vol Probenpuffer mischen und auf Agarosegel auftragen
- Elektrophorese in 1xTAE bei 90-120 mA (konstante Stromstärke)
- Dokumentation auf dem Transilluminator

7 Enzymatische Modifikationen von DNS

7.1 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von genomischer DNS wurden die Restriktionsendonukleasen *Sau* 3A und Bam HI (AmershamPharmacia Biotec, Little Chalfot, UK) verwendet.

Reaktionsansatz:

- x μ l DNS-Lösung (max. 4 μ g DNS)
- 4 μ l 10 x Inkubationspuffer
- x U Restriktionsenzym (pro 1 μ g DNS 1 U Enzym)
- ad 40 μ l H₂O_{reinst}

Die Inkubationsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Um bei dem nachfolgenden Ligationsschritt (vgl. B 7.2) eine Ligation zwischen den beiden Enden eines oder den Enden zweier verschiedener DNS-Fragmenten zu vermeiden, wurden die Enden der DNS durch Zugabe von 1 μ l (=8 U) alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim, D) für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert.

Die geschnittene und dephosphorylierte DNS konnte nun durch Phenolausschüttung mit anschließender Ethanol-fällung (vgl. B 4.1) oder mittels eines DNS-Reinigungskit (vgl. B 9.5) von restlichem Enzym und Salzen des Inkubationspuffer befreit werden.

7.2 Verknüpfung von DNS-Molekülen mit T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden von doppelsträngigen DNS-Molekülen (Weiss et al. 1968). Dieses Enzym wurde zur Ligation von ds-Oligonukleotidadaptoren (vgl. B 8.2) an geschnittener, genomischer DNS eingesetzt.

Die Ligation erfolgt über Nacht im Wasserbad bei 16 °C nach folgendem Ansatz:

- 0,4 μ g verdaute und gereinigte DNS
- x μ l Linker-Oligonukleotide P1/P2 bzw. S1/S2
- 1,5 μ l 10 x Ligationspuffer
- 1 μ l T4-DNS-Ligase (1 U / μ l; Boehringer, Mannheim, D)
- ad 15 μ l H₂O_{reinst}

8 Verwendete Oligonukleotid-Primer für PCR- und Sequenzierungstechniken

In den nachfolgenden Tabellen sind allgemeine PCR- und Sequenzierprimer aufgelistet, die nicht im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Fa. MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) synthetisiert und aufgereinigt.

Folgende Basensymbole wurden verwendet (IUB, Nomenclature Committee, 1985)

M = A oder C; **S** = C oder G; **V** = A oder C oder G; **B** = C oder G oder T;
R = A oder G; **Y** = C oder T; **H** = A oder C oder T; **N** = A oder C oder G oder T
W = A oder T; **K** = G oder T; **D** = A oder G oder T;

Die Dissoziationsstemperatur T_D wurde nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$T_D [^\circ\text{C}] = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

A, C, G, T : Anzahl der entsprechenden Nukleotide

8.1 PCR-Primer

Name	Position*	Sequenz [5'-3']	T_D [°C]	GC [%]
616Valt	8	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	58	45
632V	1490	TKA AGT CGT AAC AAG G	44	38
630R	1529	CAK AAA GGA GGT GAT CC	50	47

Tabelle B3: 16S-rRNS-spezifische Primer
V: Vorwärtsprimer (bindet an + bzw. kodierenden Strang)
R: Rückwärtsprimer (bindet an – bzw. nicht kodierenden Strang)
*: Brosius *et al.*, 1981

Name	Position*	Sequenz [5'-3']	T_D [°C]	GC [%]
118R	115	GTT BCC CCA TTC GG	45	62
985R	2654	CCG GTC CTC TCG TAC T	52	63

Tabelle B4: 23S-rRNS-spezifische Primer
V: Vorwärtsprimer (bindet an + bzw. kodierenden Strang)
R: Rückwärtsprimer (bindet an – bzw. nicht kodierenden Strang)
*: Brosius *et al.*, 1981

8.2 Adaptoren

Die Oligonukleotide P1, P2, S1 und S2 (vgl. Tab. B5) wurden als Adaptoren bzw. als Linker verwendet. Die zueinander komplementären Oligonukleotide P1 und P2 bzw. S1 und S2 weisen im doppelsträngigen Zustand *Sau* 3A- bzw. *Bam* HI-kompatible Überhänge auf. Somit ist eine Ligation mit *Sau* 3A- bzw. *Bam* HI-geschnittener DNS möglich. Die Primer P1 und S1 werden zusätzlich zur Amplifizierung der Ziel bzw. Subtraktor DNS verwendet.

Name	Sequenz[5'-3']	T _D [°C]	GC [%]
P1	AGG GGA TAA CCA ATT CAC ACA CCA	70	46
P2	GAT CTG GTG TGT GAA TTG GTT ATC CCC T	82	46
S1	CGC CAG GGA ACA CCC AGT CAC GAC	80	67
S2	GAT CGT CGT GAC TGG GTG TTC CCT GGC G	92	64

Tabelle B5: Adaptoren für T- und S-DNS

8.3 Sequenzierprimer

Als Sequenzierprimer wurden sowohl 16S-rRNS-spezifische Primer als auch die Primer M13V / M13R für den TOPO-TA-Klonierungsvektor mit M13 Promotoren verwendet. Die Primer waren entweder IR 800 oder IR 700 markiert.

Name	Position*	Sequenz [5'-3']	T _D [°C]	GC [%]
97K	343	CTG CTG CCT CCC GTA	53	67
100K	1492	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	52	42

Tabelle B6: 16S-rRNS-spezifische Sequenzierprimer

*: Brosius et al., 1981

Name	Sequenz [5'-3']	T _D [°C]	GC [%]
M13 V	GTA AAA CGA CGG CCA GT	52	53
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50	47

Tabelle B7: Primer für TOPO-TA-Klonierungsvektor mit M13-Promotoren

9 In vitro Amplifikation und Markierung von DNS mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki et al. (1988)

9.1 Allgemeines

Die PCR ist ein enzymatisches Verfahren zur spezifischen Amplifikation definierter DNS-Abschnitte durch zyklische Wiederholung folgender Reaktionsschritte:

Denaturierung: Thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNS

Annealing: Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Zielsequenzen

Elongation: Verlängerung der Primer durch thermostabile Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) in 5'-3'-Richtung

Da die in einem Zyklus synthetisierten DNS-Stücke im nächsten Amplifikationszyklus wieder als Matrizen dienen, wird eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht. Nach 25 bis 35 Zyklen kann unter optimalen Bedingungen eine 10⁶-fache Amplifikation der von den Primern flankierten DNS-Region erreicht werden. Eine weitere Amplifikation ist auch durch

Erhöhung der Zyklenzahl nicht möglich, da ab einer gewissen Konzentration an amplifizierter DNS das Amplifikationsplateau erreicht wird (Saiki et al., 1988).

Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach den verwendeten Primern. Als Anhaltspunkt dient die Dissoziationstemperatur (vgl. B.8), in der Praxis muss jedoch für jedes Primerpaar die optimale Hybridisierungstemperatur empirisch gefunden werden. Die Dauer der Elongationsphase richtet sich nach der Länge des Amplifikates und der verwendeten Polymerase (ca. 1 min pro 1,5 kb beim *Ex Taq*TM-System).

9.2 PCR mit dem *Ex Taq*TM-Kit (TaKaRa Shuzo Co., Otsu, J)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Primus 96 Thermocycler (MWG Biotech AG, Ebersberg, D) durchgeführt.

Der Einsatz der *Ex Taq*TM-DNS-Polymerase ermöglicht die Amplifizierung größerer DNS-Abschnitte und weist durch eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität eine zehnfache Reduktion der Fehlerrate auf. Des Weiteren wird in größerem Maße Adenosin am 3'-Ende des amplifizierten DNS-Fragments angehängt, was eine Klonierung in den TOPO TA-Klonierungsvektor ermöglicht (vgl. B 9.3).

Reaktionsansatz

Reaktionspuffer (10x)	10 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	8 µl
Primer 1 (50 µM)	0,4 µl
Primer 2 (50 µM)	0,4 µl
DNS	1-100 ng
<i>Ex Taq</i> TM	0,4 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 100 µl

Temperaturprofil

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1	94 °C	4 min	Anfangsdenaturierung
25-35	94 °C	30 sec	Denaturierung
	x °C	30 sec	Annealing
	72 °C	y sec	Elongation
1	72 °C	10 min	Finale Elongation

x : Primerpaarabhängige Hybridisierungstemperatur

y : ca. 1 min pro 1,5 kb

9.3 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des „TOPO-TA-Cloning Kit“ (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). Der in diesem System enthaltene Vektor ist linearisiert

und besitzt Thymidin-Überhänge. Die zu klonierenden PCR-Produkte weisen aufgrund der matrizenunabhängigen, terminalen Transferaseaktivität der verwendeten DNS-Polymerasen Adenosin-Überhänge auf.

Im „TOPO-TA-Cloning“ Kit wird zur Ligation das Enzym Topoisomerase (“Gyrase”) verwendet um Verbindung zwischen Vektor und PCR-Produkt herzustellen. Diese Verbindung entsteht durch ein „Verdrillen“ der beiden DNS-Doppelstränge, eine echte Ligation findet erst nach der Transformation in der Bakterienzelle statt. Die Transformation erfolgte nach den Angaben des Herstellers durch Hitzeschock.

50 bis 150 µl des Klonierungsansatzes wurden laut Hersteller auf LB-Amp-X-Gal-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion der rekombinanten Gene erfolgt durch „Blau-Weiß-Test“. Dieser Test beruht auf der α -Komplementation der β -Galaktosidase, deren Gen teils auf dem Vektor, teils im Transformantenchromosom codiert ist. Das funktionstüchtige Enzym setzt das Substrat X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-Indol- β -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um. Bei einer erfolgreichen Klonierung wird das α -Peptid durch Insertion des zu klonierenden DNS-Fragments unterbrochen und die α -Komplementation verhindert. Die Bakterienkolonie bleibt weiß.

9.4 Sonderformen der PCR

9.4.1 Gradienten-PCR

Um das Hybridisierungsverhalten von Primern bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen zu untersuchen, wurde eine Gradienten-PCR in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, D) durchgeführt. Dieser Thermocyclertyp besitzt drei voneinander unabhängige Heizelemente unter dem Reaktionsblock, welche die Schaffung eines sigmoiden Temperaturgradienten ermöglichen. Dabei ist der Reaktionsansatz zu dem in B.9.2 beschrieben identisch.

Temperaturprofil

Anzahl Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1	94	4 min	Anfangsdenaturierung
	94	30 sec	Denaturierung
30	$x \pm 6^*$	30 sec	Annealing
	72	y sec	Elongation
1	72	10 min	Finale Elongation

x : Primerpaarabhängige Annealingtemperatur

y : ca. 1 min pro 1 kb

*Beispiel: Bei einer berechneten Annealingtemperatur von $56 \pm 6 \text{ °C}$ wurde ein Gradient von $56 \pm 6 \text{ °C}$ programmiert, d.h. ein Temperaturgradient von 50 °C bis 62 °C wurde im Heizblock aufgebaut.

9.4.2 Amplifikation von DNS aus Zellen

Unter Umgehung einer vorherigen Nukleinsäureisolierung können Bakterienzellen zur *in vitro* Amplifizierung von DNS eingesetzt werden. So ist die Vervielfältigung bestimmter DNS-Bereiche direkt, z.B. aus Flüssigkulturen oder von Agarplatte, möglich.

Durchführung

- 50 µl einer ÜN-Kultur abzentrifugieren (5 min, 14000 x g) bzw. einer Impföse Kolonie von einer Agarplatte abnehmen und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendieren und abzentrifugieren
- Niederschlag mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ waschen
- Niederschlag in x µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendieren
- Weitere Durchführung wie unter B.9.2 beschrieben, jedoch anstatt der DNS-Lösung 2µl der Zellsuspension einsetzen und die Anfangsdenaturierung von 4 min auf 10 min, zwecks Zelllyse, erhöhen

9.4.3 Random and limited PCR (RL-PCR)

Die RL-PCR (Richter und Ludwig, bisher unveröffentlicht) stellt eine abgewandelte Form einer Standard-PCR dar. Der auffälligste Unterschied ist, dass bei der RL-PCR nur ein Primer zum Einsatz kommt. Abb. B 14.1 zeigt eine schematische Darstellung einer RL-PCR. Die ersten 30 Zyklen finden unter ziemlich stringenten Bedingungen statt, so dass der Primer nur an die Zielsequenz bindet damit die Polymerase verschieden lange Einzelstränge synthetisieren kann. Anschließend folgt ein unstringenter Zyklus während dessen der Primer die Möglichkeit hat, unspezifisch an die Einzelstränge zu binden und diese dann komplementiert werden können. Nach diesem Zyklus kann der eingesetzte Primer dann

sowohl als Vorwärts- wie auch als Rückwärtsprimer fungieren. Die letzten 30 Zyklen finden dann unter Standard-Bedingungen statt.

9.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach der PCR wurden die Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

10 Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH)

10.1 Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen

Folgende Formeln wurden zur Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen herangezogen und in Anlehnung daran die optimalen Hybridisierungsbedingungen empirisch ermittelt.

Zur Abschätzung der Dissoziationstemperatur bei Oligonukleotiden in DNS/DNS-Hybriden wurde folgende Formel nach Suggs *et al.* (1981) verwendet.

$$T_D[^\circ\text{C}] = 2 \times (\text{A}+\text{T}) + 4 \times (\text{G}+\text{C})$$

Zur Berechnung der Schmelztemperatur von Polynukleotiden wurde folgende Formel verwendet (Howley *et al.*, 1979)

$$T_M[^\circ\text{C}] = 81,5 + 16,6 \times \log M + 0,41 \times (\% \text{G}+\text{C}) - 0,7 \times \% \text{FA}$$

Zeichenerklärung:

T_M	= Schmelztemperatur in Grad Celsius
T_D	= Dissoziationstemperatur in Grad Celsius
M	= Konzentration der Natriumionen in der Hybridisierungslösung
$\% \text{G}+\text{C}$	= Gehalt an Guanosin und Cytosin in Prozent
$\% \text{FA}$	= Formamidgehalt

Optimale Hybridisierungsbedingungen liegen bei $T_M - 25 \text{ }^\circ\text{C}$ vor, stringente Bedingungen bei $T_M - 10 \text{ }^\circ\text{C}$

10.2 Vorbereitende Arbeiten

10.2.1 Präparation der Adaptoren

Zur Herstellung der Adaptoren P und S (vgl. B 8.2), die einen 5'-*Sau3A* kompatiblen Überhang besitzen, wurden je 100 pmol der Oligonukleotide P1/P2 bzw. S1/S2 in 40 µl 10mM Tris/HCL pH 8,5 in einem ERG für 10 min auf 65 °C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

10.2.2 Restriktionsverdau der DNS und Ligation der Adaptoren

Vier bis fünf µg genomischer DNS der verwendeten Stämme wurden ÜN mit *Sau3A* verdaut. Anschließend folgte ein Reinigungsschritt (siehe B 9.5)

Adaptor P wurde nun mit der genomischen, geschnittenen DNS des zu untersuchenden Zielstammes ligiert, während Adaptor S mit den *Sau3A*-Fragmenten der DNS der verwendeten Subtraktoren-Stämme verknüpft wurde. Dazu wurden stets 300 ng verdaute DNS mit 100 ng des jeweiligen Adaptors eingesetzt. Überschüssige Adaptoren, sowie Salze und Enzym wurden in einem Reinigungsschritt entfernt (siehe B 9.5)

10.2.3 Präparation der Ziel- und der Subtraktor-DNS

Die modifizierte Ziel-DNS, nachfolgend als P-DNS bezeichnet, wurde unter Verwendung des Oligonukleotidprimers P1 nach der in B 9.2 beschriebenen Weise mittels einer PCR mit 30 Zyklen amplifiziert. Dasselbe geschah mit der modifizierten Subtraktor-DNS (S-DNS), allerdings mit Hilfe des Primers S1. Die Hybridisierungstemperatur betrug in beiden Fällen 55 °C. Zur Kontrolle wurden Aliquots (5µl) der PCR-Reaktionen auf einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels SYBRGreenTM (vgl. B 6) unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe B 9.5) und anschließend zur Konzentrationsbestimmung bei 260 nm photometrisch vermessen (siehe B 5).

10.2.4 Durchführung der Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH)

10.2.4.1 Beschichten der Mikrotiterplatten mit Subtraktor-DNS

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterplatte	MaxiSorp TM (NUNC, Roskilde, DK)
PCR-Produkt	1µg S-ligierte, amplifizierte, aufgereinigte Subtraktor-DNS pro

Kavität	
PBS	130 mM NaCl 10 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (0,2 M Na_2HPO_4 mit 0,2 M NaH_2PO_4 auf pH 7,2 eingestellt)
PBS+ MgCl_2	100 mM MgCl_2
Ofen	IEMS Incubator / Shaker HT (Labsystems, Helsinki, SF)
Klebefolie	NUNC, Roskilde, DK

Pro Kavität einer Mikrotiterplatte wurde 1-2 μg S-DNS-Gemisch (von bis zu acht verschiedenen Subtraktor-Stämmen) in 50 μl PBS+ MgCl_2 gegeben, 10 min im Wasserbad bei 95 °C denaturiert und dann 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Platten über Nacht oder mindestens 1 h bei 60 °C getrocknet. Danach wurden die Kavitäten mit je 100 μl PBS+ MgCl_2 gewaschen, um eventuell nicht gebundene S-DNS-Fragmente wegzuspülen.

Die beschichteten Mikrotiterplatten sind bei 4 °C, mit Klebefolie verschlossen, zwei bis drei Wochen lagerfähig.

10.2.4.2 Ausschlußhybridisierung

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterplatte	MaxiSorp TM (NUNC, Roskilde, DK) beschichtet mit S-DNS
PCR-Produkt	50 ng P-ligierte, amplifizierte, aufgereinigte Ziel-DNS pro Kavität
PBS	vgl. B 10.2.4.1
Blockingstammlsg.	10 % Blockingreagenz (Roche, Mannheim, D)
Blocking-PBS	1 % Blockingreagenz in PBS (Blockingstammlsg. mit PBS 1:10 verdünnen)
Hybridisierungspuffer	5x SSC (vgl. B.4.1) 1 % Blockingreagenz (= 10 % Blockingstammlsg.) 0,1 % N-Laurylsarkosin 0,02 % SDS (vgl. B.4.1) x % Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)
Ofen	vgl. B 10.2.4.1
Klebefolie	vgl. B 10.2.4.1

Prähybridisierung

- Inkubation der beschichteten MTP mit 100 μl Hybridisierungslösung pro Kavität für 30-60 min bei der ermittelten Hybridisierungstemperatur (vgl. B 10.1) im Hybridisierungssofen

Hybridisierung

- Denaturierung der PCR-Produkte für 10 min bei 95 °C im Wasserbad

- Inkubation für 1,5-2 h bei entsprechender Hybridisierungstemperatur (vgl. B 10.1) in der MTP im Ofen

Isolierung stammspezifischer DNS

- Abnehmen von 10 µl des Überstandes pro Kavität
- PCR mit 2 µl des Überstandes mit Primer P1 (vgl. B 9.2)
- Klonierung der Amplifikate in den TOPO-TA-Klonierungsvektor
- Sequenzieren der rekombinanten DNS

10.2.4.3 Isolierung und Analyse der stammspezifischen Ziel-DNS

Während der Hybridisierung bilden die Ziel-DNS-Fragmente mit den immobilisierten Subtraktor-DNS-Fragmenten, bei hinreichender Sequenzkomplementarität, Hybride. DNS-Fragmente bzw. deren Hybride, die hinsichtlich ihrer Sequenz hinreichend unterschiedlich zur Referenz-DNS, also spezifisch für die Ziel-DNS sind bleiben im Überstand und können mittels anschließender PCR vervielfältigt werden. Diese Vervielfältigung erfolgte unter Verwendung des Primers P1 bei einer Annealingtemperatur von 55 °C (vgl. B 9.2). Zur Kontrolle wurden die Fragmente in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. B 6). Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden in den TOPO-TA-Vektor (vgl. B 9.3) kloniert und einer DNS-Sequenzanalyse unterzogen (vgl. B 11)

10.3 Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH)

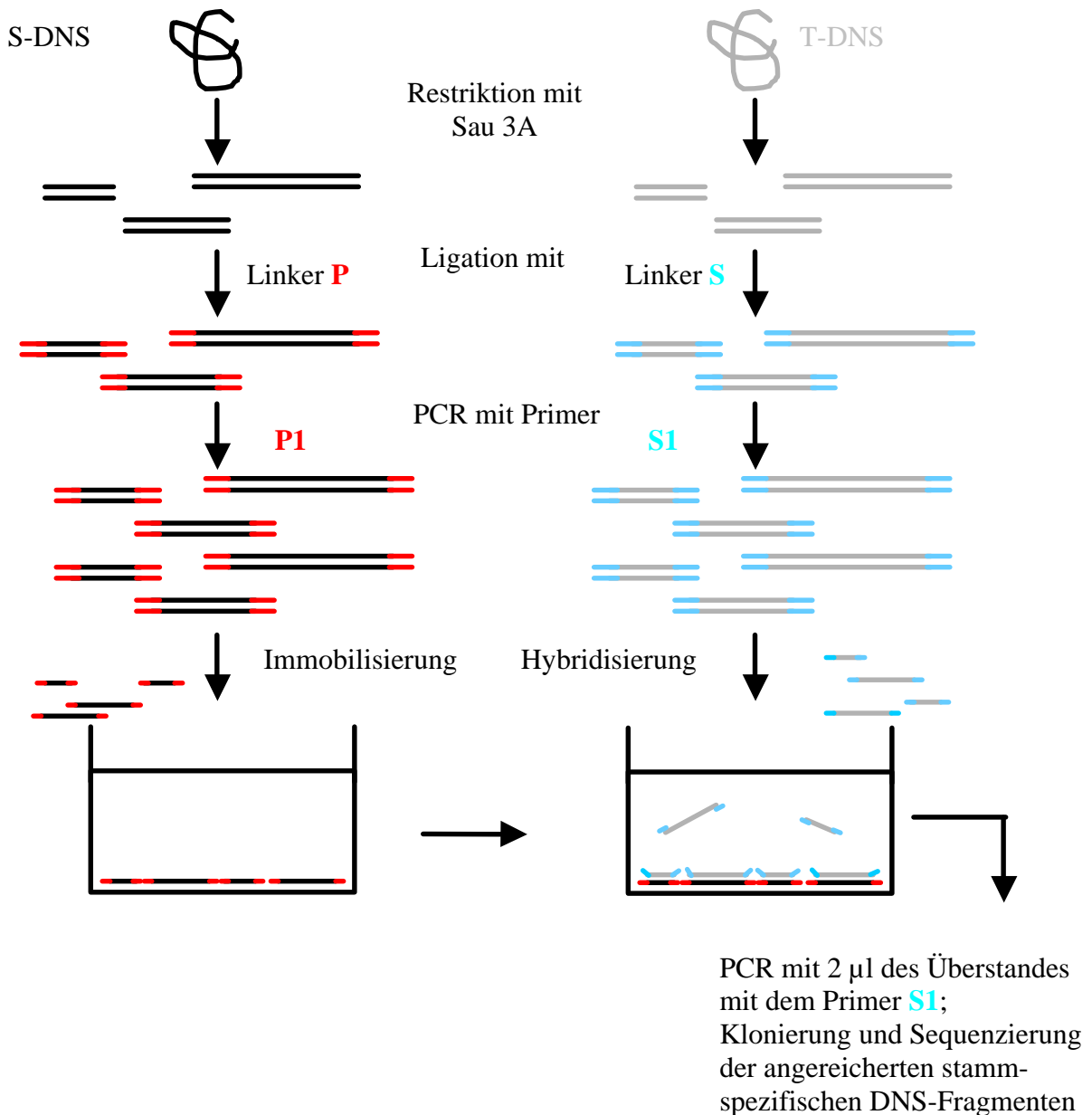


Abb. B1: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatten-Ausschlußhybridisierung (MASH)

11 Sequenzanalyse von DNS

Die DNS-Sequenzanalyse erfolgte mittels linearer Amplifikationssequenzierung („Cycle-Sequencing“) (Murray, 1989). Dabei handelt es sich um eine Kombination der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und einer PCR-Amplifizierung (Saiki *et al.*, 1988) unter Verwendung von IR-markierten Primern. Didesoxynukleotide (ddNTPs) sorgen

für die notwendigen Kettenabbrüche bei der Primerelongation. Sequenzierreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase™ Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) oder dem SequiTherm Excel™ II DNA Sequencing Kit-LC (66 cm, Epicentre, Madison, WI) durchgeführt. Als Farbstoffe dienten IRDye700 und IRDye800 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D). Beide Systeme diskriminieren kaum zwischen dNTPs und ddNTPs (Tabor und Richardson, 1995) und bauen ddNTPs ca. 1000 mal besser ein als z.B. die *Taq*-Polymerase (Reeve und Fuller, 1995).

Im Anschluß wurden die erhaltenen Fragmente im Polyacrylamidgel in einem LI-COR Global IR² DNA Sequencer (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D) aufgetrennt und mittels Laser online detektiert. Die Auswertung der Sequenziergele erfolgte mit *e*-Seq DNA Sequencing and Analysis Software (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D).

11.1 Sequenzierung

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Sequenzierkit	Thermo Sequenase™ Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) SequiTherm Excel™ II DNA Sequencing Kit-LC (66 cm, Epicentre, Madison, WI)
Primer	5 µM IR-markiert (vgl. B 8.3)
Mikrotiterplatte	Polycarbonat, V-Boden Biozym; Hess. Oldendorf, D)
Klebefolie	Microseal™, A'-Film (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)
Thermocycler	Typ PTC-100™

Durchführung

- Die Komponenten für die DNS-Sequenzierung wurden nach den Angaben des Herstellers gemischt
- Verschließen der Mikrotiterplatte mit Klebefolie
- Durchführung der Reaktionen im Thermocycler nach folgendem Programm:

Anzahl Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1	94	3 min	Anfangsdenaturierung
25	94	30 sec	Denaturierung
	45	30 sec	Annealing
	72	30 sec	Elongation
1	72	10 min	Finale Elongation

- Anschließend Zugabe von 3 µl Stopppuffer
- Kurz vor dem Auftragen 5 min bei 94 °C denaturieren

11.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (1xTBE)	134 mM Tris 44,5 mM Borsäure 2,5 mM EDTA; pH 8,0
Harnstoff	
Sequagel XR	(National Diagnostics, Hull, GB)
Sequagel Complete	(National Diagnostics, Hull, GB)
APS-Lösung	10 % (w/w) Ammoniumpersulfat (Aliquots bei -20 °C lagern)
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
Glasplatten	66 cm (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Spacer	0,25 mm (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Kamm	0,25 mm (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Sequenzierapparatur	LI-COR Global IR ² DNA Sequencer (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)
Software	e-Seq DNA Sequencing and Analysis Software (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)

Durchführung

- 6 g Harnstoff in 1,5 ml 10xTBE und 11,25 ml H₂O_{reinst} lösen
- Zugabe von 24 ml Sequagel XR, 6 ml Sequagel Complete, 300 µl APS-Lösung und 15 µl TEMED
- Lösung sterilfiltrieren und Gel nach Herstellerangaben gießen
- 1,5 h polymerisieren lassen
- Gel in Sequenzierapparatur einhängen, Pufferbecken mit 1xTBE füllen und den Vorlauf starten
- Nach dem Vorlauf Auftragen der denaturierten Sequenzierreaktionen
- Elektrophorese (2000V, 25 mA, 45 W, 45 °C)
- Ende des Gellaufs nach ca. 10-12 h
- Auswerten der Sequenziergele mit o.g. Software

12 Auswerten der Sequenzdaten und Konstruktion stammspezifischer Primer

Die ermittelten Sequenzen wurden in der BLAST-Genbank (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) auf Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen überprüft.

Die Primer wurden so konstruiert, dass sie etwa 18 Basen lang sind und einen GC-Gehalt von ca. 50 % aufweisen.

13 Durchführung stammspezifischer PCR-Ansätze

Zur Ermittlung der höchstmöglichen Primerbindungstemperatur wurde zunächst eine Gradienten-PCR (vgl. B 9.4.1) mit der chromosomalen DNS des Zielstammes durchgeführt. Danach erfolgte eine PCR (vgl. B 9.2) mit der DNS sämtlicher Subtraktorenstämme und, falls möglich, weiterer Referenzstämme, unter Verwendung der ermittelten, optimalen Annealingtemperatur.

Die PCR-Bedingungen der einzelnen stammspezifischen Primerpaare sind jeweils im Ergebnisteil aufgeführt.

14 Methoden zur Isolierung und Identifizierung spezifischer DNS-Fragmenten

14.1 RL-PCR

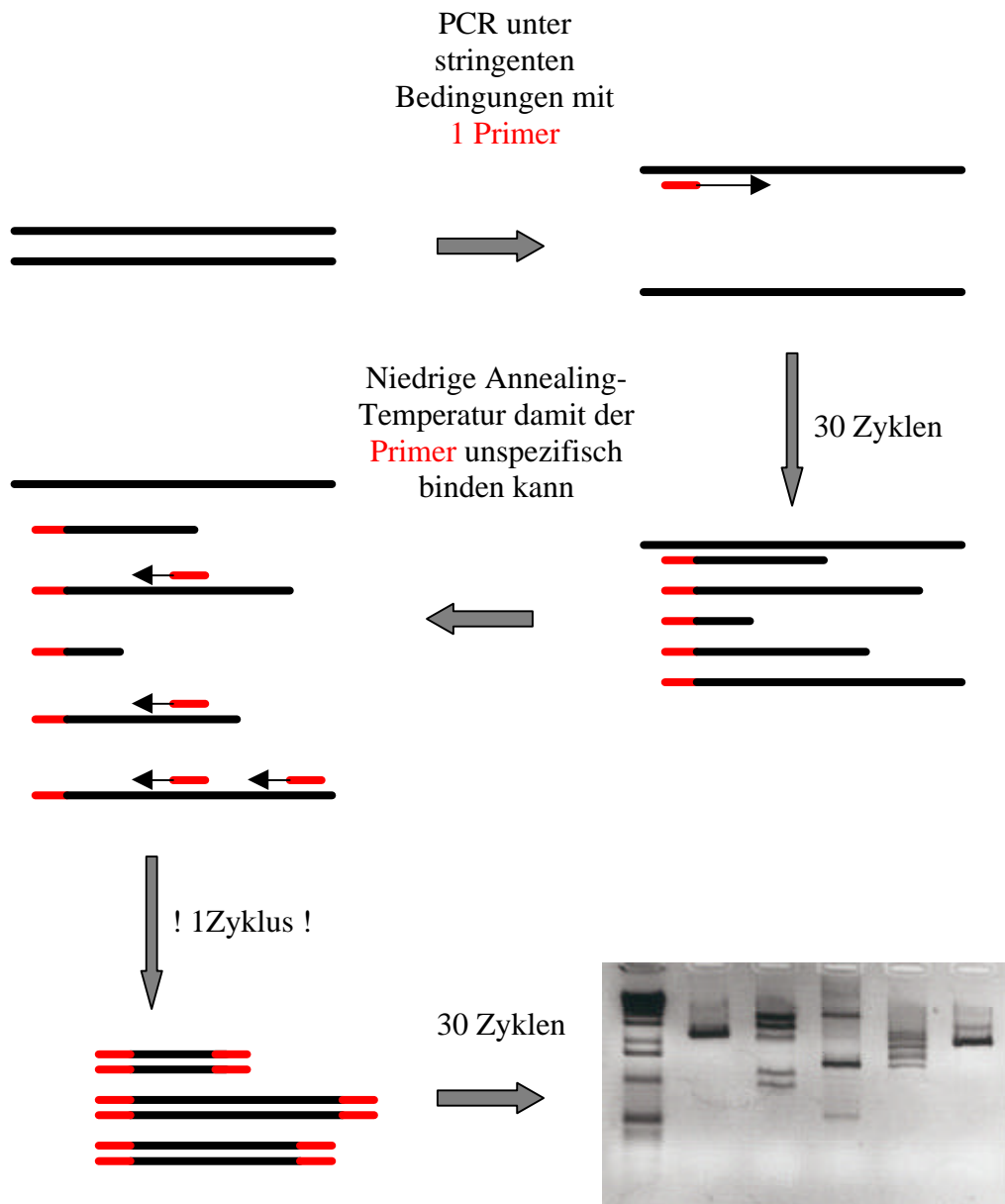


Abb. B2: Schematische Darstellung einer RL-PCR

14.2 Spezifisches DNS-Fischen

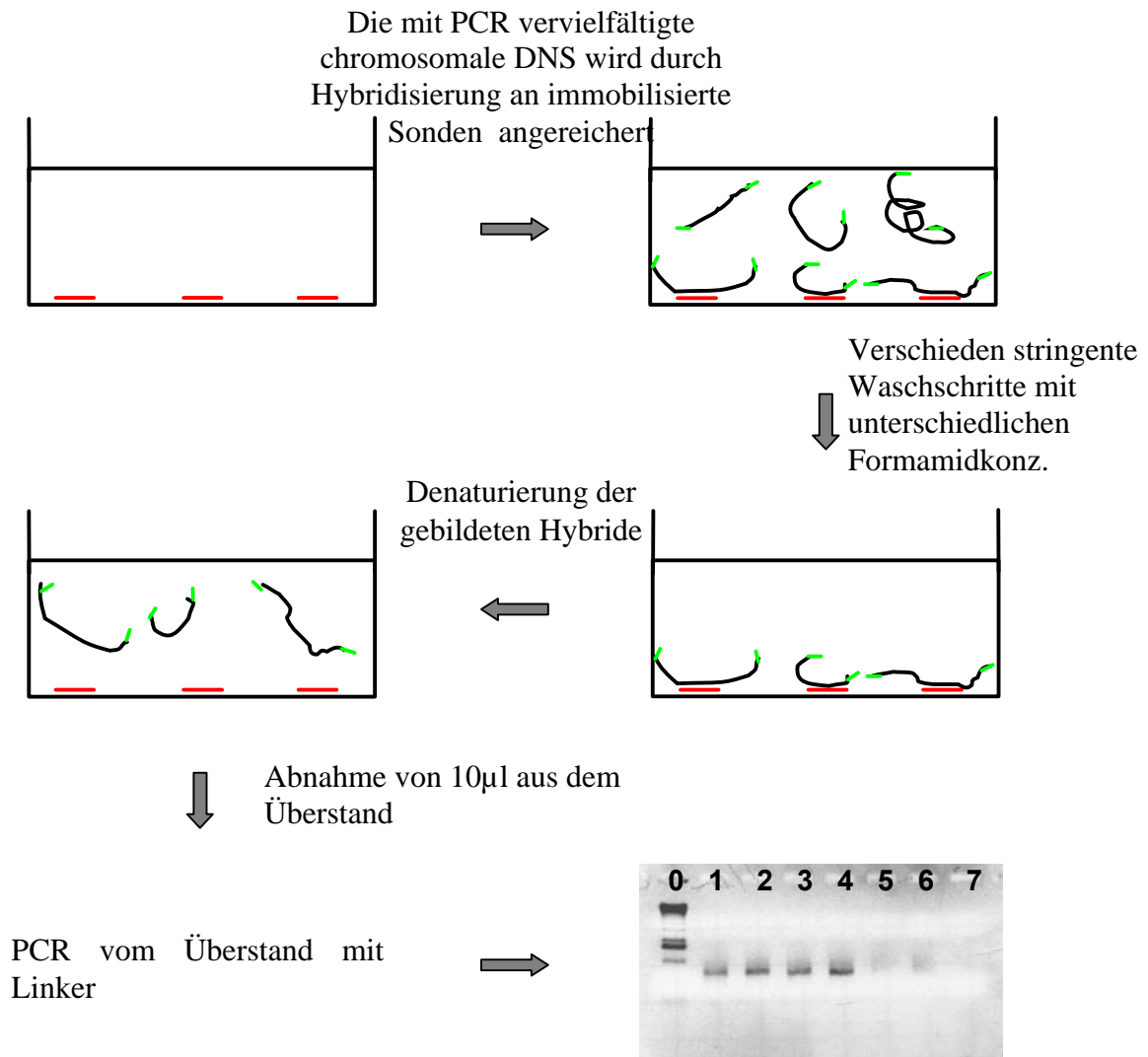


Abb. B3: Schematische Darstellung der Methode des spezifischen Fischens

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterplatte	vgl. B 10.2.4.1
PCR-Produkt	1µg stammspezifisches PCR-Produkt
BamHI DNS	50 ng vgl. B 7.1
Sondenlg.	10 µM am 5'Ende phosphorylierter stammspezifischer Primer
PBS	vgl. B 10.2.4.1
PBS+MgCl ₂	vgl. B 10.2.4.1
Ofen	vgl. B 10.2.4.1
Klebefolie	vgl. B 10.2.4.1
Blockingstammlsg.	vgl. B 10.2.4.2
Blocking-PBS	vgl. B 10.2.4.2
Hybridisierungspuffer	vgl. B 10.2.4.2
EDC-Lösung	10 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
Tris-Waschlösung	10 mM Tris/HCl; pH 7,5 150 mM NaCl

	0,05% Tween 20
TMACl-Waschlsg.	50 mM Tris/HCl; pH 7,5
	2 mM EDTA
	0,1 % SDS
	3 M Tetramethylammoniumchlorid (TMACl)
	x % Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)

14.2.1 DNS-Fischen mit stammspezifischen Primern

Immobilisierung (Nikiforov und Rogers, 1995)

- 100 µl EDC-Lösung mit 2 µl Sondenlösung mischen und in Kavität pipettieren
- Inkubation der MTP ÜN bei 37 °C im Ofen
- 3x Waschen mit je 100 µl Tris-Waschlösung bei RT und Ausklopfen der Mikrotiterplatte

Prähybridisierung

- Inkubation mit 100 µl Hybridisierungslösung der beschichteten MTP für 30-60 min bei 37 °C im Hybridisierungssofen

Hybridisierung

- Denaturierung des PCR-Produktes für 10 min bei 95 °C im Wasserbad
- Inkubation für 1,5-2 h bei 37 °C im Hybridisierungssofen

Waschen

- 3x Waschen mit je 100 µl Waschlösung für 10 min bei 37 °C im Hybridisierungssofen

Isolierung stammspezifischer DNS

- 3x Waschen mit 100 µl PBS, anschließend 50 µl H₂O_{reinst} auf die Kavität draufgeben
- Denaturierung für 20 min bei 100°C im Hybridisierungssofen
- Abnehmen von 10 µl vom Überstand
- PCR mit 2 µl vom Überstand mit Primer S1 (vgl. B 9.2)
- Klonierung des Überstand in Topo TA Klonierungsvektor (vgl. B 9.3)
- Sequenzieren der Klone (vgl. B 11)

14.2.2 Molekulare Screeningmethode

Immobilisierung

- 1 µg stammspezifisches PCR-Produkt in 50 µl PBS+MgCl₂ (vgl. B.10.2.4.2) aufnehmen und für 10 min bei 95 °C im Wasserbad denaturieren
- Inkubation für 1 h bei 37 °C in der Mikrotiterplatte im Hybridisierungssofen
- Entleeren der MTP durch Ausklopfen auf Zellstoffpapier
- 1-12 h bei 60 °C im Ofen trocknen

Prähybridisierung (vgl. B 10.2.4.2)

Hybridisierung (vgl. B 10.2.4.2)

- Nach dem Verdau der DNS mit Bam HI (vgl. B 7.1) und der Ligation (vgl. B 7.2) erfolgt eine Amplifikation mit Adaptor (vgl. B 9.2)
- Denaturierung des PCR-Produktes für 10 min bei 95 °C im Wasserbad
- Inkubation für 1,5-2 h bei errechneter Hybridisierungstemperatur (vgl. B 10.1) in der MTP im Ofen
- Ausklopfen der MTP und Waschen mit 100 µl PBS

Gezielte Isolierung spezifischer DNS-Fragmente

- Auf gewaschene Kavität (vgl. B 14.2.1) 50 µl H₂O_{reinst} geben und 20 min im Ofen bei 95 °C zur Denaturierung der gebildeten Hybride inkubieren
- Abnehmen von 10 µl des Überstandes
- PCR mit 2 µl des Überstandes mit Adaptor (vgl. B 9.2)
- Klonierung der PCR-Fragmente in den TOPO-TA-Klonierungsvektor (vgl. B 9.3)
- Sequenzieren der Klone (vgl. B 11)

C. Ergebnisse

1 Differenzierung von 3 *Streptomyces* Stämmen mittels Mikrotiterplatten- Ausschlußhybridisierung (MASH) entwickelter Primer

Am Institut lagen 3 *Streptomyces* Stämme vor, die nicht mit den herkömmlichen Methoden differenziert werden konnten. Es sollte nun versucht werden, stammspezifische Primer für diese Stämme zu entwickeln, um sie so zu differenzieren. Des weiteren war dieser Versuch interessant, um die Grenzen der MASH auszutesten, da die Streptomyceten einen sehr hohen GC-Gehalt (72% GC) haben und bei einer genomischer DNS-DNS Hybridisierung kaum Unterschiede aufweisen. Es sollte daher versucht werden, ob man unter diesen Voraussetzungen noch spezifische DNS-Fragmente für die einzelnen Streptomyceten mittels MASH isolieren kann.

1.1 Entwicklung stammspezifischer Primer

Nachdem die DNS wie unter B 10.2 beschrieben präpariert worden war, wurde eine MASH, mit den 3 Stämmen durchgeführt. Es wurden jedes Mal die PCR-Fragmente von 2 Stämme pro Kavität immobilisiert (insg. 1-2 µg/Kavität) und anschließend mit der präparierten DNS (vgl. B 10.2) des dritten Stammes, bei verschiedenen Formamid Konzentrationen im Hybridisierungspuffer, hybridisiert (vgl. Abb. C1)

Formamid im Hybridisierungspuffer	Stamm A Hybridisierung mit 50 ng DNS pro Kavität	Stamm B Hybridisierung mit 50 ng DNS pro Kavität	Stamm C Hybridisierung mit 50 ng DNS pro Kavität
20%	BC	AC	BA
25%	BC	AC	BA
30%	BC	AC	BA
35%	BC	AC	BA
40%	BC	AC	BA
45%	BC	AC	BA
50%	BC	AC	BA
55%	BC	AC	BA

Abb. C1: Schematische Darstellung einer MASH in der Mikrotiterplatte. Die Zellen der Tabelle stellen die Kavitäten der MTP dar. Pro Kavität wurden jeweils die DNS von 2 Stämmen immobilisiert und mit dem dritten Stamm bei unterschiedlichen Formamidkonzentrationen (20%-55%) hybridisiert

1.2 PCR mit dem Hybridisierungsüberstand

Nach 1,5 – 2stündiger Hybridisierung wurden 10 µl vom Hybridisierungsüberstand vorsichtig abgenommen, und anschließend eine PCR mit dem S1 Oligonukleotidprimer durchgeführt (vgl. B 9.2). Auf Abb. C2 handelt es sich um eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR der einzelnen Hybridisierungsüberständen. Wie der Pfeil in Abb. C2 markiert, erkennt man ab einer Formamidkonzentration von 30 % im Hybridisierungspuffer eine distinkte Bande.

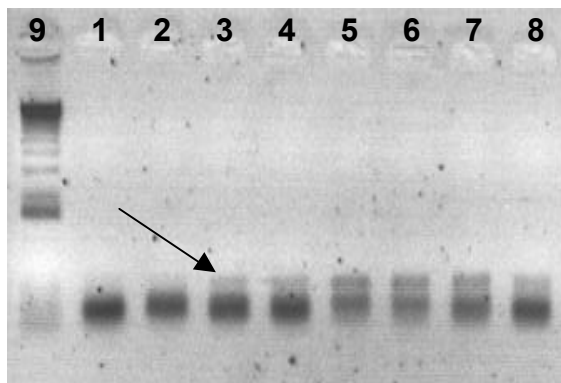


Abb. C2: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente, generiert mit dem Oligonukleotidprimer S1 mit 2 µl vom Überstand der Hybridisierungen mit Stamm A

Spurenbelegung:

- 1) 20 % Form. im Hyb.puffer
- 2) 25 % Form. im Hyb.puffer
- 3) 30 % Form. im Hyb.puffer
- 4) 35 % Form. im Hyb.puffer
- 5) 40 % Form. im Hyb.puffer
- 6) 45 % Form. im Hyb.puffer
- 7) 50 % Form. im Hyb.puffer
- 8) 55 % Form. im Hyb.puffer
- 9) KBL

Es wurde nun für alle 3 Stämme eine PCR eines Aliquots vom Überstand der Hybridisierung in Gegenwart von 45% Formamid mit dem Linker S1 als Primer durchgeführt. Das Gelbild

(vgl. Abb. C3) zeigt bereits einen Unterschied von Stamm B zu Stamm A und C. So ergab die PCR nur mit der DNS der Stämme A und C eine deutliche Bande.

In einem nächsten Schritt wurden die spezifischen Banden, die mit der DNS von Stamm A und C generiert wurden, ausgeschnitten, aufgereinigt und für weitere Sequenzanalysen in einen TOPO-TA-Cloning Vektor kloniert (vgl. B 9.3). Die mittels PCR angereicherten DNS-Fragmente von Stamm B wurden ebenfalls kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei den Banden von den Stämmen A und C um 23S-rDNS-Fragmente handelte. Für den Stamm B konnten ebenfalls 23S-rDNS-Fragmente sowie weitere DNS-Fragmente unbekannter Sequenz isoliert werden. Es wurden nun aufgrund der Sequenzdaten der entsprechenden isolierten Fragmenten Primer konstruiert und auf ihre Spezifität (vgl. Tab C1) getestet.

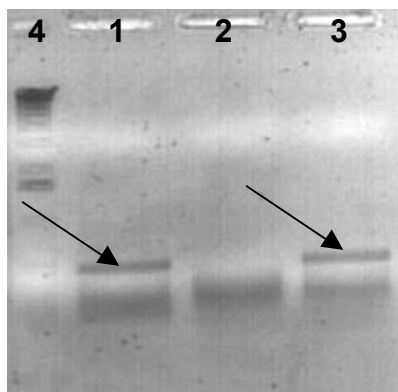


Abb. C3: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente, generiert mit dem Oligonukleotidprimer S1 mit 2 µl vom Hybridisierungsüberstand (45 % Formamid)

Spurenbelegung:

- | | |
|------------|------------|
| 1) Stamm A | 3) Stamm C |
| 2) Stamm B | 4) KBL |

1.3 Mit MASH isolierte DNS-Fragmente, für die einzelnen *Streptomyces* Stämme spezifische DNS-Fragmente

Nachfolgend sind die Sequenzen der „spezifischen DNS-Fragmente“ die mittels MASH isoliert wurden aufgeführt. Die aufgrund dieser Sequenzdaten konstruierten Primer bzw. die Zielsequenzen sind grau unterlegt. Der Zielstamm, für den die Primer spezifisch sein sollen, und die Subtraktorenstämme sind ebenfalls aufgelistet.

1.3.1 *Streptomyces* sp. A spezifisches DNS-Fragment

Für *Streptomyces* sp. A konnte nur ein spezifisches DNS-Fragment mittels MASH isoliert werden. Tab. C1 zeigt die Sequenz des erhaltenen Fragmentes mit den dafür konstruierten Primern bzw. Zielsequenzen (grau unterlegt). Die Länge des spezifischen PCR-Produktes beträgt 189 bp.

Name	KLON A0_2
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. A
Subtraktor	<i>Streptomyces</i> sp. C
Sequenz	ACGTTGTAGG CGTCGAGGGT TGTCGCGGTG ACGTTCAGGA TTCCGTTGAC GCCGTANNAG CTCGGAGGTC ACTTGCAGCT TTTCGAAGCT GGACACTCCT GTGGCTGTTG ATGCCTTTNT CCGCCGTGAT GGCTCGCGAT GTCCAGCGTG CTGTCCTCTC CCAGAAGTGT GCCCTGGATG TGAGGTTGT
Entwickelte Primer	KlonA0_2V KlonA0_2R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	189 bp
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Tab. C1: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

1.3.2 *Streptomyces* sp. A und *Streptomyces* sp. C spezifische DNS-Fragmente

Obschon es sich um eine Ausschlusshybridisierung mit Stamm A als Zielstamm handelte, waren die angereicherten DNS-Fragmente für *Streptomyces* sp. A und *Streptomyces* sp. C spezifisch. Tab. C2 führt sowohl die isolierten DNS-Fragmente als auch die aufgrund der Sequenzdaten entwickelten Primer wie auch die Länge der spezifischen PCR-Produkte auf.

Name	KLON A2
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. A
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. B; <i>Streptomyces</i> sp. C
Sequenz	GATCTCGACG TCGACGTGCA CGTCCGGTGT GGACACCGGT GAGGACACGT ACCTGTCCGT CCGTCGACCT CAACGAGCCC GTTCTCGTAG GTGGGCAGCG CGGGGCCGAT GTCGGTGTTT TCCTCCCGGA TGAGGAAGTG GTGGTACTCG GCAGGAACGA GCCACGGCGG NGTTTCTCGC ATCACGATAG GACCCATCTG ATG
Entwickelte Primer	KlonA2V KlonA2R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	203 bp
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
Name	KLON A4
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. A
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. B; <i>Streptomyces</i> sp. C
Sequenz	ATCTCTCTTT CACAGTCTGC CGACTGTGAG ACAAGTAAGA AACCCTCATG ATAGGCGAAG GGCATGCGAA AGGCCGGCGT AGAGGGTAAG ACCCCGTAGC TGAAATTGTG GCGGCTTGTT TGAGAGACAC CCAAGTAGCA CGGGGCCCGA GAAATCCCGT GTGAATCTGG CGGGACCACC CGTTAAGCCT AAATATTCCC TGGTGACCGA TAGCGGATAG TACCGTGAGG AATGGTGAAA AGTACCGCGG GAGCGAGTGA AATAGTACCT GAAACCGTGT GCCTACAAGC CGTGGGAGCG TCGGGATGCG AGTTTACTCG TATCCTCGTG ACTGCGTGCC TTTTGAAGAA TGAGCCTGCG AGTTTGCGGT GTGTTGCGAG GTTAACCCGT GTGGGGAGCC GTAGCGAAAG CGAGTCCGAA CAGGGCGATT CAGTAGCGCG CTCAAGACCC GAAGCGGAGT GATC
Entwickelter Primer	KlonA4V
Länge des spezifischen	1347 bp mit Primerpaar KlonA4V / KlonAC23SR

PCR-Produkts	
Sequenzähnlichkeiten	92 % zum 23S-rRNS Gen von <i>Streptomyces avermitilis</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
Name	KLON A8
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. A
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. B; <i>Streptomyces</i> sp. C
Sequenz	TGGTCGCCCT CGCGGTCCGG GTCTCCTTCC CACa c CTCCA CGgTCAaCCT CTTGAGGTTG TcCTTCGTCG GCTCGTACGA CTTACACGC TGCTGCGGCA gGCGCTGGTT TCGGCCGATG AGTGCCTGa ACTTCCGTCT GCCCTCACGG TCCTTAGtGA TGGTGCCCaG GGCATGTGTG TTCACCACAC GGATGGTGCT C T TTCAGCTCC TCGTCCATGG CTGCGGCGCA gATGGcCGCT CCCTCGgCCA CCGCAgTCAT CGGGTTCGCAC ATGTTGTGTc CAc g NGCTCG CAGTCGAGCG cCTCCGAGAC TGCGGCGCGc ACCGCG
Entwickelte Primer	KlonA8V KlonA8R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	326 bp
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
Name	KLON AC23SR
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. A
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. B; <i>Streptomyces</i> sp. C
Sequenz	TATCCTACAC AAGCCCNAA CCGaCACAtA TCAAACtGtA GTAAAGGTCC CGGGGTCTTT CCGTCCTgCt gCGCGAAACG AgcATctTTA CTCGTAGTGC AATTtCACCG GGCCTATGGt TGAGACAGTC GAGAAGTCGT TACGcCATTc GTGCAGGTcG GAACTTACCC GACAAGGAAT TTCGCTACCT TAGGATGGTT ATAGTTACCA CCGCCGTTTA CTGGCGCTTA AGTTCTCAGC TTCGCCAGAA CGAATCCTGG cTAACCGGTC CCCTTAACGT TCCAGCACCG GGCAGGcGTC AGTCCGTATA CATCGCCTTA CGGCTTCGCA CGGACCTGTG TTTTtAGTAA ACAGTCGCTT CTCGCTGGTC TCTGCGGCAC ACCCAGCTCA CCAAGCATGT TGGATC
Entwickelter Primer	KlonAC23SR
Länge des spezifischen PCR-Produkts	1347 bp mit Primerpaar KlonA4V / KlonAC23SR
Sequenzähnlichkeiten	96 % zum 23S-rRNS Gen von <i>Streptomyces avermitilis</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Tab. C2: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

1.3.3 *Streptomyces* sp. B spezifische DNS-Fragmente

In Tab. C3 sind DNS-Fragmente aufgeführt, die mittels MASH für *Streptomyces* sp. B angereichert werden konnten. Die ermittelten Sequenzdaten dieser Fragmente wurden zur Konstruktion mehrere *Streptomyces* sp. B. spezifischen Primer (grau unterlegt) genutzt (vgl. Tab. C3).

Name	KLON B2
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. B
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. A; <i>Streptomyces</i> sp. C
Sequenz	GACGAATACG GTGAAGGCTA TTTTCCGCAT TCATGTcGCT

	TTTCGTCCGT	CCGTTTCGTTT	GTTCGTCATC	GTTTGGCTCG
	TTCGCCCTTG	TATTCCACCC	GACCGGCGGA	AAGGTCACGG
	CCTGGGAAC	CATGGCCGGG	ACGCTCACCC	GTTTCGGCGTA
	ATGAACCGTC	GGAATGTC		
Entwickelte Primer	KlonB2V	KlonB2R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	178 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			
Name	KLON B4			
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. B			
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. A; <i>Streptomyces</i> sp. C			
Sequenz	TGCATTTAGG	TGCAGCGTCG	TGTGTTTCTT	GCCGGAGTAG
	AGCACTGGAT	AGGCGATGGG	CCCTACCGGG	TTACTGACCT
	TAGCCAAACT	CCGAATGCCG	GTAAGTGAGA	GCGCGGCAGT
	GAGACTGTGG	GGGATAAGCT	CCATGGTCGA	GAGGGAAACA
	AGCCCAGAGC	ATCGACTAAG	GCCCTAAGCG	TACGTAAGTG
	GGAAAGGATG	TGGAGTCGCA	GAGACAAACC	AGGAGGTTGG
	CTTAGAAGCA	GCCACCTTGA	AAGAGTGCGT	AATAGCTCAC
	TGGTCAAGTG	ATTCCGCGCC	GACAATGTAG	CGGGGCTCAA
	GCGTACCGCC	GAAGTCGTGT	CATTGCAGTA	CATACCCCCA
	ACGGACTGTG	ATGGGTAGGG	GAGCGTCGTG	TGCC
Entwickelte Primer	KlonB4V	KlonB4R	KlonB4Ra	
Länge des spezifischen PCR-Produkts	394 bp mit Primerpaar KlonB4V	KlonB4R		
	400 bp mit Primerpaar KlonB4V	KlonB4Ra		
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			
Name	KLON B5			
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. B			
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. A; <i>Streptomyces</i> sp. C			
Sequenz	ACGTTCTTCG	GTGCGGATGC	CCCAGACGTG	GTCGAGGACC
	TGAACACCAC	CCGCTTGGCC	ATATGGCGGG	TGAGGCGAGG
	GTGGCGTACG	AGCTCAGATG	GTTGATGTAG	AAGTTCTCTT
	CCGGTGTCC	CAGGGCCTTG	TCGAACTGGG	ACTTCAACCT
	CCCCGACCTT	GCCGTCGGCG	TCGTCCGTGT	CGTAGTGGTC
	CTGAATGCTG	GCGTCGCCCA	GGGGATTCCG	GGGAGTCCGG
	CGACAATTGA	GAGCACCACG	ATC	
Entwickelte Primer	KlonB5V	KlonB5R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	263 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			
Name	KLON B7			
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. B			
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. A; <i>Streptomyces</i> sp. C			
Sequenz	GGGGTAGGGG	AGATCTGTGG	TGCGGAACTC	CCGGGGCAGC
	AGCCCCTGGA	GACGCGGATT	TCCTGGATGC	TCGACCACGT
	CCTTGACGGT	GTCGATGCCG	CGCCAGTAGC	CGGAGAGCCG
	GTAGCCTGAT	GAGTCGTCCG	TCGCTGGCCA	GTTCCGGGAA
	GGTGCTGTCC	TCGTGGTCCC	CTTGTTGGGG	AGCAGCTGGA
	CCACGTCGGG	ATTGAAGACG	TAGATTCCGG	CGTTGATC
Entwickelte Primer	KlonB7V	KlonB7R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	238 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			
Name	KLON B12			
Zielstamm	<i>Streptomyces</i> sp. B			
Subtraktoren	<i>Streptomyces</i> sp. A; <i>Streptomyces</i> sp. C			

Sequenz	CGCGGGGTGG	CTGCTGGGCT	GC TT CGAAAT	CG TTGGACGC
	CTTCGGTTGG	TCGGCGAGCA	TCCGAGGGTG	ACAGATGATG
	CTGATTACTG	GGGACCGTTC	ACGCGGAACC	CGAAGTGTGT
	CCGTTTTGCA	GAGTTGTCCG	GTGTGGCGAT	GT CCGCATTG
	CT CGATGGAG	ACCTGTCCGA	AGCCAGCAGG	GTGGCAGGGG
	TTTCTCTGAC	CGAGTACTTC	CTGACCGACG	AGCACGGTGG
	CTGTGGCAGT	TCGGCTCGAC	CAGATGGCCG	CGATC
Entwickelte Primer	KlonB12V	KlonB12R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	275 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			

Tab. C3: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

1.4 In vitro Amplifikationen mit den *Streptomyces* sp. B spezifischen Primern

Es konnten gleich mehrere Stamm B spezifische Primer konstruiert und getestet werden. Die Abb. C4 und Abb. C5 zeigen, dass mit den Primer KlonB2V / KlonB2R, KlonB4V / KlonB4R, KlonB4V / KlonB4Ra und KlonB5V / KlonB5R mit der DNS von Stamm B spezifische Banden generiert werden konnten. Alle Primer sind mit ihrer Sequenz und den evaluierten Spezifitäten in Tab. C4 aufgeführt.

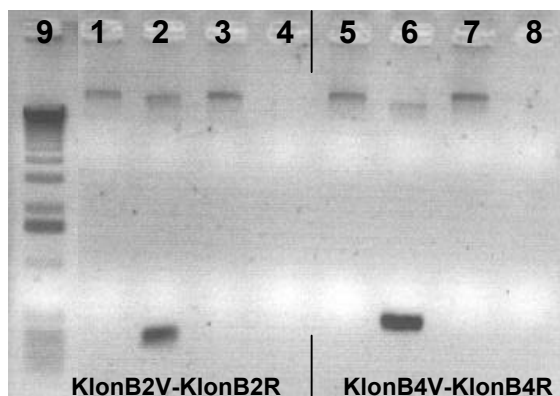


Abb. C4: Stammspezifischer Nachweis für den Stamm B unter Verwendung der Primerpaare KlonB2V / KlonB2R und KlonB4V / KlonB4R

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1) Stamm A | 6) Stamm B |
| 2) Stamm B | 7) Stamm C |
| 3) Stamm C | 8) Negativkontrolle |
| 4) Negativkontrolle | 9) KBL |
| 5) Stamm A | |

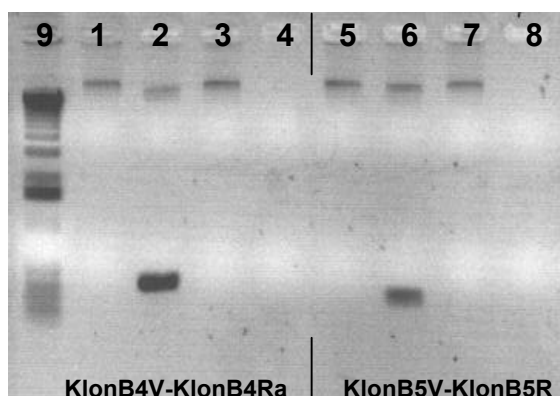


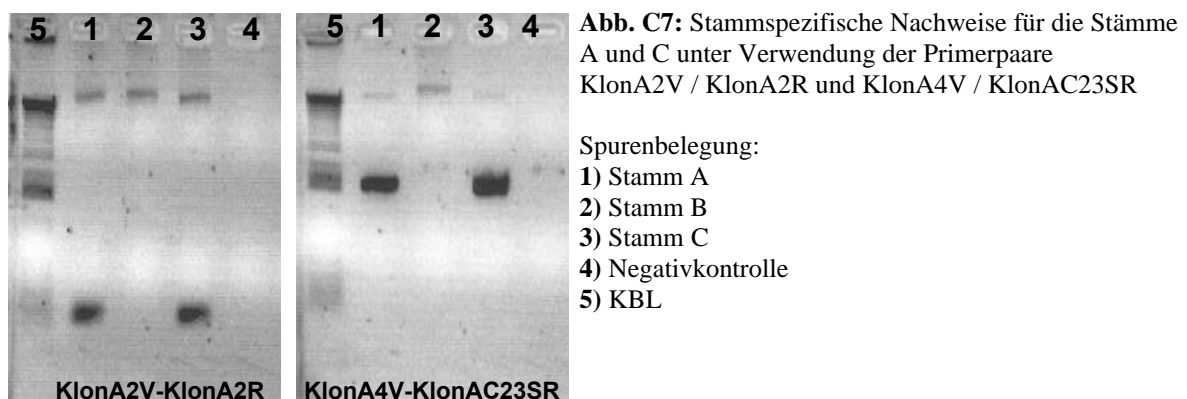
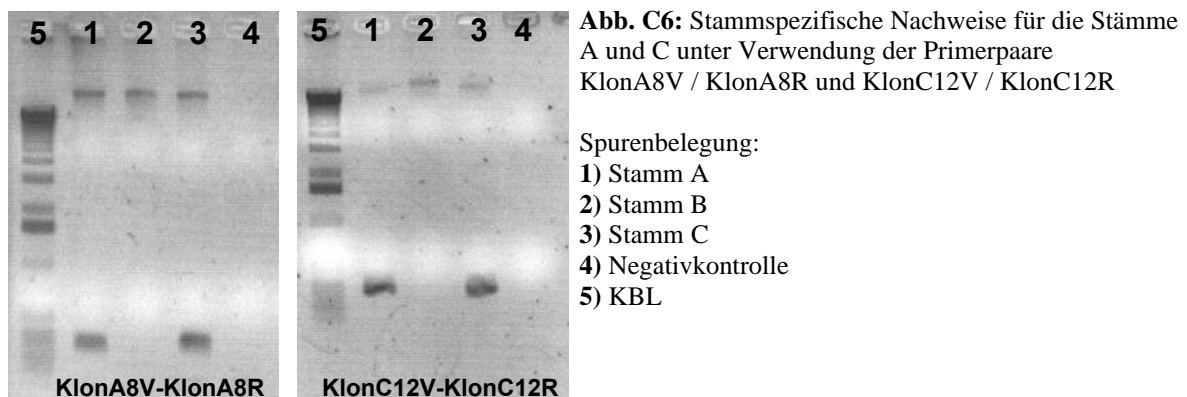
Abb. C5: Stammspezifischer Nachweis für den Stamm B unter Verwendung der Primerpaare KlonB4V / KlonB4Ra und KlonB5V / KlonB5R

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1) Stamm A | 6) Stamm B |
| 2) Stamm B | 7) Stamm C |
| 3) Stamm C | 8) Negativkontrolle |
| 4) Negativkontrolle | 9) KBL |
| 5) Stamm A | |

1.5 In vitro Amplifikationen mit den *Streptomyces* sp. A und *Streptomyces* sp. C spezifischen Primern

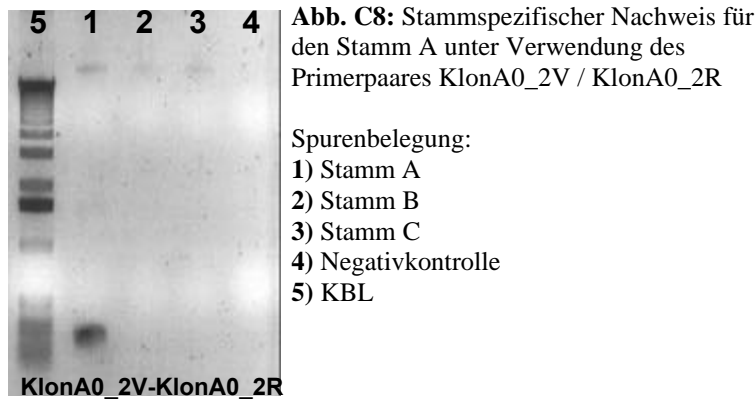
Die Sequenzen der mittels MASH (vgl. C 1.3.2) isolierten Fragmente zeigten, dass die Stämme A und C problemlos von Stamm B differenziert werden können. Es war aber nicht möglich, Primer zu konstruieren, mit denen man zwischen den Stämmen A und C unterscheiden konnte. Die Abb. C6 und Abb. C7 zeigen, dass die DNS der Stämme A und C jeweils ein PCR-Produkt mit den entwickelten Primern ergeben und nicht zwischen den beiden Stämmen unterschieden werden konnte. In Tab. C4 sind die Bedingungen unter denen die Primer getestet wurden angegeben.



1.6 Differenzierung zwischen *Streptomyces* sp. A und *Streptomyces* sp. C

Da mit den zuvor konstruierten Primern (vgl. C 1.5) nicht zwischen Stamm A und Stamm C differenziert werden konnte, wurde eine zweite Ausschlusshybridisierung, mit weniger stringenten Bedingungen durchgeführt. Zur Konstruktion Stamm A spezifischer Primer wurde die DNS von Stamm A nur mit der von Stamm C hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden mit 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % und 35 % Formamid im Hybridisierungspuffer (vgl. B 10.2.4.2) bei 70 °C durchgeführt. Nach Klonierung und Sequenzanalyse der isolierten Fragmente wurden Primer konstruiert und getestet. Diesmal war es möglich, ein für Stamm A

spezifisches Primerpaar zu entwickeln und zu testen. Abb. C8 zeigt, dass die Primer KlonA0_2V-KlonA0_2R spezifisch für den Stamm A sind.



1.7 Spezifität und PCR-Bedingungen für die konstruierten und getesteten *Streptomyces*-spezifischen Primerpaare

Die folgende Tabelle listet alle konstruierten *Streptomyces*-spezifischen Primer und die Bedingungen unter welchen sie getestet wurden sowie die Spezifität der Primerpaare auf.

Primerpaare	5'-Sequenz-3'	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklenzahl	Spezifität
KlonA2V KlonA2R	TAC CTG TCC GTC CGT CGA TAC CAC CAC TTC CTC ATC	56 °C	25	Stämme A und C
KlonA4V KlonAC_23SR	CGT AGC TGA AAT TGT GGC CCA GCT CAC CAA GCA TGT	56 °C	25	Stämme A und C
KlonA8V KlonA8R	TTG AGG TTG TCC TTC GTC CAT GGA CGA GGA GCT GAA	55 °C	25	Stämme A und C
KlonB2V KlonB2R	CGA ATA CGG TGA AGG CTA GAC ATT CCG ACG GTT CAT	55 °C	25	Stamm B
KlonB4V KlonB4R	TGC ATT TAG GTG CAG CGT CCG TTG GGG GTA TGT ACT	55 °C	25	Stamm B
KlonB4V KlonB4Ra	TGC ATT TAG GTG CAG CGT GGG GTA TGT ACT GCA ATG	55 °C	25	Stamm B
KlonB4V KlonAC_23SR	TGC ATT TAG GTG CAG CGT CCA GCT CAC CAA GCA TGT	55 °C	25	Stämme A und C
KlonB5V KlonB5R	ACG TTC TTC GGT GCG GAT TTC AGG ACC ACT ACG ACA	55 °C	25	Stamm B
KlonB7V KlonB7R	TTG ACG GTG TCG ATG CCG TCT ACG TCT TCA ATC CCG	56 °C	25	Stamm B
KlonB12V KlonB12R	TTC GAA ATC GTT GGA CGC ATC GAG CAA TGC GGA CAT	56 °C	25	Stamm B
KlonC12V KlonC12R	ACA CTG GGA ACA GAA GGG AAC CTG CGG CCA AGC GCT	56 °C	25	Stämme A und C
Klon A ₀ _2V Klon A ₀ _2R	TTG TAG GCG TCG AGG GTT ACA ACC TCA CAT CCA GGG	57 °C	30	Stamm A

Tab. C4: Sequenz, Spezifität und PCR Bedingungen der konstruierten *Streptomyces*-spezifischen Primer

2 Konstruktion pathovarspezifischer Oligonukleotidprimer für verschiedene *Xanthomonas campestris* Pathovare

2.1 Mit MASH isolierte pathovarspezifische DNS-Fragmente

Bei den Stämmen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*, *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, „*Xanthomonas* pv. *lobelia*“ und „*Xanthomonas* pv. *isotoma*“ handelt es sich um pflanzenpathogene Organismen, die meistens durch Infektionsstudien identifiziert werden. Diese Nachweise sind zeitaufwendig und nicht eindeutig. Um den Nachweis der einzelnen Stämme zu vereinfachen, sollten pathovarspezifische Primer entwickelt und getestet werden. Zu diesem Zweck wurden mit der Ausschlusshybridisierung in MTP pathovarspezifische DNS-Fragmente angereichert und zur Konstruktion spezifischer Primer verwendet. Die Sequenzen der isolierten DNS-Fragmente mit den Primerbindestellen sind nachfolgend aufgeführt.

2.1.1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* spezifisches DNS-Fragment

Für *X. c.* pv. *campestris* konnte ein spezifisches DNS-Fragment mittels MASH isoliert werden. Für dieses Fragment wurden nach der Sequenzanalyse (vgl. Tab. C5) die Primer Xantho6.8V und Xantho6.8R (grau unterlegt) konstruiert. Eine Datenbankanalyse ergab, dass es sich bei dem isolierten DNS-Fragment um einen Teil der typ IV pre-pilin Leader Peptidase handelt (vgl. Tab. C5).

Zielstamm	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Subtraktoren	<i>X. pv. lobelia</i> , <i>X. c. pv. raphani</i> ; <i>X. h. pv. pelargonii</i>
Sequenz	ACAACCTCTA CATGCCAGCC AAGCCCGCCC TGCTGGGTGC TGC GGTCGGC TATGTCTCGC TCTGGACGGT GTGGTGGCTG TTCAAGCAGC TCACCGCAA GGAAGGGATG GGCCACGGCG ACTTCAAGTT GCTGGCTGCG
Entwickelte Primer	Xantho6.8V Xantho6.8R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	140 bp
Sequenzähnlichkeiten	99 % zur type IV pre-pilin Leader Peptidase von <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Tab. C5: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

2.1.2 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* spezifisches DNS-Fragment

Im Falle von *X. c.* pv. *raphani* konnte ein 272 bp großes DNS-Fragment (vgl. Tab. C6) mittels MASH isoliert werden. Bei diesem Fragment handelt es sich um einen Teil des virB11 Gens.

Die aufgrund der Sequenzdaten dieses DNS-Fragments konstruierten Primer, Xantho4.6bV und Xantho4.6bR, sind im Rahmen der getesteten *Xanthomonas* Stämmen spezifisch für *X. c. pv. raphani* (vgl. Tab. C11).

Zielstamm	<i>Xanthomonas campestris pv. raphani</i>
Subtraktoren	<i>X. pv. lobelia</i> , <i>X. c. pv. campestris</i> ; <i>X. h. pv. pelargonii</i>
Sequenz	GACAGCACGC ATCTCGAATG ACTTCCTGGA TTACAGTACT CAGTGCTGGG AATCTGGaTT ACTGAGACTC GCCTGACGTG ACCGAAATCT GCATCAATCG TCCGGGTGAG CTGTATCTTG AGACCATTCA TGGGTGGCAG CGGGTTGATG TGCCGTCGCT CACTTACGAC CGTGCTCGGC AGTTTTGTAC GGCTGTGCTC AACGAGAGCA ATACCGGGCA ACGTATCACC GACGCCGACC CGGTGGTATC ACTGACTTTT CCGACGGGGC AG
Entwickelte Primer	Xantho4.6bV Xantho4.6bR
Länge des spezifischen PCR-Produkts	272 bp
Sequenzähnlichkeiten	86 % zum virB11 Gen von <i>X. axonopodis pv. citri</i> str. 306 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Tab. C6: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

2.1.3 *Xanthomonas hortorum pv. pelargonii* spezifisches DNS-Fragment

Das für *X. h. pv. pelargonii* isolierte Fragment hat eine Länge von 128 bp. Wie aus der Tab. C7 hervorgeht, ergab eine Datenbankanalyse der Sequenz des isolierten DNS-Fragments keinen Hinweis auf ein bekanntes Gen. Die entwickelten Primer bzw. deren Zielsequenzen sind grau unterlegt.

Zielstamm	<i>Xanthomonas hortorum pv. pelargonii</i>
Subtraktoren	<i>X. pv. lobelia</i> , <i>X. c. pv. campestris</i> ; <i>X. c. pv. raphani</i>
Sequenz	GTACGTTTCGC GGACATAAGC CGCAGAATGT TAAAGACCCG CAGGTTCTGTG TCAAATGCGC CCATTACAC ATGCGCCGGC GCGGCGGCTC GCAGACTCCC TACCCGTCCA CTCACAGCAC GCCATGAT
Entwickelte Primer	Xantho1.7V Xantho1.7R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	128 bp
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Tab. C7: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

2.1.4 *Xanthomonas pv. lobelia* spezifisches DNS-Fragment

Mittels MASH wurde folgendes DNS-Fragment (vgl. Tab. C8) für *X. pv. lobelia* isoliert. Anhand der ermittelten Sequenzdaten wurden die Primer Xantho2.11V und Xantho2.11R entwickelt.

Zielstamm	<i>Xanthomonas pv. lobelia</i>			
Subtraktoren	<i>X. c. pv. campestris</i> , <i>X. c. pv. raphani</i> ; <i>X. h. pv. pelargonii</i>			
Sequenz	TGGTGGTTTC	TATCTTCCGT	AACGGAAAAA	TACCACTGGC
	CTGCAGATGT	TTTTGCATCA	GCGCTGTACC	AAGCGAAGTC
	TGCGCATCGT	GGGGACTAA	CAATGCATGC	AAGCAGACGC
	AACTAAGAGC	AGCTTACAAA	AGGATCTGTG	CTCACCATCA
	GGTGGGCGCG	GCGATACTCG	ATGCGGCATG	GACCACGCGT
	ACACTCTGGT	TTTGAACGCG	CCGTCCACAC	CCACCTGACA
	ACTGCTCGCT	ATGTTTTGTT	AGCCGCTCTT	AGCGTCGAGA
	TGAATTCGGA	TGTTCTGCAG	CCCTCAGACG	CGTGACAGGT
	GAAATCATGA	GCAAGGTATT	CG	
Entwickelte Primer	Xantho2.11V	Xantho2.11R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	325 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			

Tab. C8: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

2.1.5 *Xanthomonas pv. isotoma* spezifisches DNS-Fragment

Nach einer Ausschlußhybridisierung im MTP-Format für *X. pv. isotoma* konnte folgendes DNS-Fragment (vgl. Tab. C.9) angereichert werden. Nach anschließender Sequenzanalyse wurden die Primer Xiso2V und Xiso2R konstruiert. Eine weitere Datenbankanalyse der Sequenz ergab kein Ergebnis d.h. sie konnte keinen Referenzsequenzen zugeordnet werden.

Zielstamm	<i>Xanthomonas pv. isotoma</i>			
Subtraktoren	<i>X. pv. lobelia</i> , <i>X. c. pv. campestris</i> ; <i>X. c. pv. raphani</i> ; <i>X. h. pv. pelargonii</i>			
Sequenz	TGTATGTAGC	CGAGCCTTTC	AGATGTGCGT	GCACATGGGA TATGTGGCGG
	CATCGCTCGC	ACTGACCTGA	GCACGAGCGG	ACATCTTGTC TGGCAGAACA
	TCGCGCGCAA	TACGGCAGTG	GATGCGCGCT	GCCGGTGC GG CGAGCTAGTA
	AGCAGCCAAC	AGAGACAGCA	GTGGCAGAAC	CGCAGCGAGC GGGCGCAGAC
	ACTGACCCGT	AGAGAAGAGC	CCGTAGAGAA	
Entwickelte Primer	Xiso2V	Xiso2R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	325 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			

Tab. C9: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

2.2 In vitro Amplifikationen mit den verschiedenen *Xanthomonas*-Primer

In Tab. C10 sind die entwickelten *Xanthomonas* spezifischen Primer mit ihren Sequenzen und den getesteten PCR Bedingungen aufgeführt. Tab. C11 listet sowohl alle *Xanthomonas* Isolate auf mit denen die Primer getestet wurden als auch die Ergebnisse der verschiedenen in vitro Amplifikationen mit den unterschiedlichen *Xanthomonas*-Primern.

2.2.1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* spezifisches Primerpaar

Der pathovarspezifische Nachweis von *X. c.* pv. *campestris* ist mit dem Primerpaar Xantho6.8V / Xantho6.8R gewährleistet (vgl. Abb. C9). Die DNS der zwei *X. c.* pv. *campestris* Isolate ergeben ein spezifisches PCR-Produkt. Tab. C11 zeigt, dass die in dieser Arbeit verwendeten *X. c.* pv. *campestris* Stämme von allen anderen *Xanthomonas* Isolaten, die von der LBP zur Verfügung gestellt wurden, differenziert werden konnten.

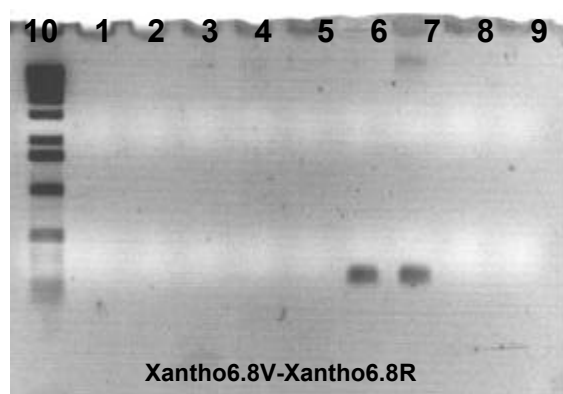


Abb. C9: Stammspezifischer Nachweis für *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* unter Verwendung des Primerpaares Xantho6.8V / Xantho6.8R

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1) <i>X. h.</i> pv. <i>pelargonii</i> | 6) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 2) <i>X.</i> pv. <i>lobelia</i> | 7) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 3) <i>X.</i> sp. <i>lobelia</i> | 8) <i>X.</i> pv. <i>lobelia</i> |
| 4) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 9) Negativkontrolle |
| 5) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 10) KBL |

2.2.2 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* spezifisches Primerpaar

Wie auf Abb. C10 zu erkennen ist, kann *X. c.* pv. *raphani* eindeutig mit dem Primerpaar Xantho4.6bV / Xantho4.6bR von den anderen *Xanthomonas*-Arten unterschieden werden. Sogar die DNS von *X. c.* pv. *campestris*, welcher zur selben Art wie *X. c.* pv. *raphani* gehört, bildet mit den Primern Xantho4.6bV / Xantho4.6bR kein PCR-Produkt.

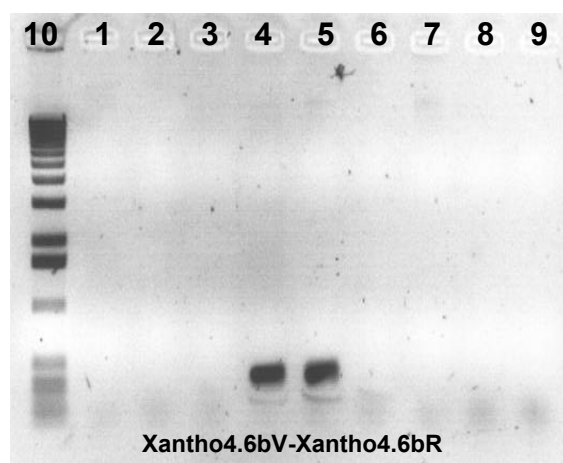


Abb. C10: Stammspezifischer Nachweis für *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* unter Verwendung des Primerpaares Xantho4.6bV / Xantho4.6bR

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1) <i>X. h.</i> pv. <i>pelargonii</i> | 6) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 2) <i>X.</i> pv. <i>lobelia</i> | 7) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 3) <i>X.</i> pv. <i>lobelia</i> | 8) <i>X.</i> pv. <i>lobelia</i> |
| 4) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 9) Negativkontrolle |
| 5) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 10) KBL |

2.2.3 *Xanthomonas hortorum* (campestris) pv. *pelargonii* spezifisches Primerpaar

Das Primerpaar Xantho1.7V / Xantho 1.7R wurde entsprechend der Sequenz des *X. h.* pv. *pelargonii* spezifischen DNS-Fragmentes entwickelt. Wie Abb. C11 zeigt, ist die PCR mit diesem Primerpaar spezifisch für *X. h.* pv. *pelargonii*. Diagnostische PCR wurde sowohl mit isolierter chromosomaler DNS (Spur 1) als auch direkt mit Zellen (Spur 2) durchgeführt. In beiden Fällen ergab sich diesselbe spezifische Bande. Die Isolierung der DNS ist also nicht zwingend für den spezifischen Nachweis, was die Identifizierung vereinfacht und Zeit erspart.

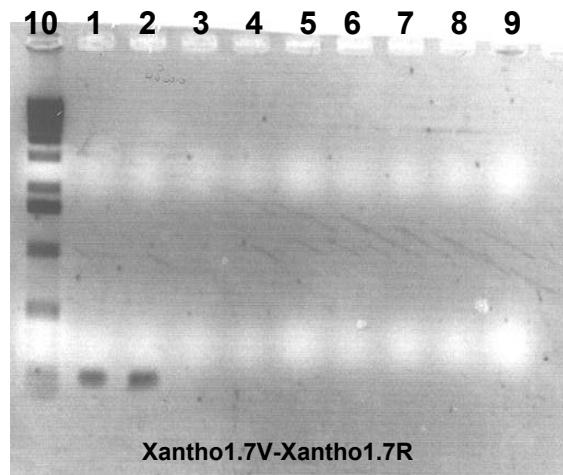


Abb. C11: Stammspezifischer Nachweis für *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* unter Verwendung des Primerpaares Xantho1.7V / Xantho1.7R

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1) <i>X. h.</i> pv. <i>pelargonii</i> | 6) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> |
| 2) <i>X. h.</i> pv. <i>pelargonii</i> | 7) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 3) <i>X. pv. lobelia</i> | 8) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 4) <i>X. pv. lobelia</i> | 9) <i>X. pv. lobelia</i> |
| 5) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 10) KBL |

2.2.4 *Xanthomonas* pv. *lobelia* spezifisches Primerpaar

Mit den Primern Xantho2.11V / Xantho2.11R können die 3 *X. pv. lobelia* Isolate von den anderen *Xanthomonas* Stämmen differenziert werden (vgl. Abb. C12). Wie sich aber nach Einbeziehung weiterer Referenzstämmen herausstellte, kann mit diesem Primerpaar nicht zwischen *X. pv. lobelia* und *X. pv. isotoma* unterschieden werden (vgl. Tab. C11).

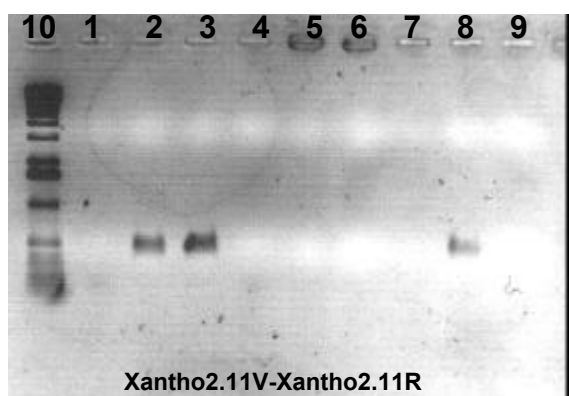


Abb. C12: Stammspezifischer Nachweis für *Xanthomonas campestris* pv. *lobelia* unter Verwendung des Primerpaares Xantho2.11V / Xantho2.11R

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1) <i>X. h.</i> pv. <i>pelargonii</i> | 6) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 2) <i>X. pv. lobelia</i> | 7) <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i> |
| 3) <i>X. pv. lobelia</i> | 8) <i>X. pv. lobelia</i> |
| 4) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 9) Negativkontrolle |
| 5) <i>X. c.</i> pv. <i>raphani</i> | 10) KBL |

2.2.5 Differenzierung zwischen *Xanthomonas* pv. *lobelia* und *Xanthomonas* pv. *isotoma*

Kreuzinfektionen mit diesen Stämmen ergaben identische Ergebnisse (Poschenrieder, pers. Mitteilung). So zeigte die Wirtspflanze von *X. pv. lobelia* auch Symptome wenn sie mit *X. pv.*

isotoma infiziert wurde und umgekehrt. Daher lag die Annahme nahe, dass es sich um ein und denselben Stamm handeln könnte und es sollte versucht werden, ob es möglich wäre zwischen beiden Stämmen durch eine spezifische PCR zu differenzieren. Die für *X. pv. isotoma* konstruierten spezifischen Primer ergaben mit beiden Stämme dieselben Ergebnisse. So konnte mit dem Primerpaar Xiso2V / Xiso2R sowohl mit *Isotoma*-Isolaten als auch mit den *Lobelia*-Isolaten PCR-Produkte generiert werden (vgl. Abb C13). Mit dem Primerpaar Xiso1V / Xiso1R wurde weder mit *X. pv. isotoma* noch mit *X. pv. lobelia* ein Amplifikat gebildet (vgl. Abb. C13). Insgesamt wurden 12 *X. pv. lobelia* Isolate und 10 *X. pv. isotoma* Isolate getestet (vgl. Tab. C11)

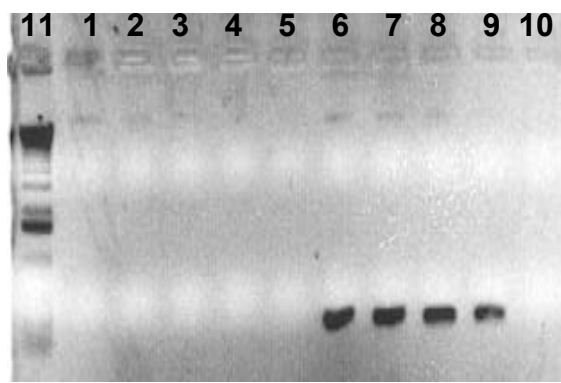


Abb. C13: Testen der Primer Xiso1V / Xiso1R (Spuren 1-5) und Xiso2V / Xiso2R (Spuren 6-10) mit *Xanthomonas pv. lobelia* und *Xanthomonas pv. isotoma*

Spurenbelegung:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1) <i>X. pv. lobelia</i> | 7) <i>X. pv. lobelia</i> |
| 2) <i>X. pv. lobelia</i> | 8) <i>X. pv. isotoma</i> |
| 3) <i>X. pv. isotoma</i> | 9) <i>X. pv. isotoma</i> |
| 4) <i>X. pv. isotoma</i> | 10) Negativkontrolle |
| 5) Negativkontrolle | 11) KBL |
| 6) <i>X. pv. lobelia</i> | |

2.2.6 Gradienten-PCR zur Differenzierung zwischen *X. pv. lobelia* und *X. pv. isotoma*

Mit der Gradienten-PCR (vgl. B 9.4.1) sollte getestet werden, ob sich das Bindeverhalten des Primerpaares Xiso2V / Xiso2R durch schrittweise Erhöhung der Annealing-Temperatur bei *X. pv. lobelia* und *X. pv. isotoma* unterscheidet. Wie Abb. C14 und Abb. C14a zeigen kann auch bei Erhöhung der Stringenz nicht zwischen den zwei Isolaten differenziert werden.

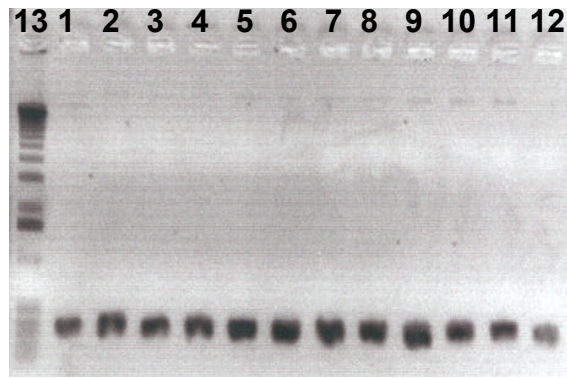


Abb. C14: Gradienten-PCR mit den Primern Xiso2V / Xiso2R mit *Xanthomonas pv. lobelia*

Spurenbelegung:

1) 50 °C	7) 56,5 °C	13) KBL
2) 50,2 °C	8) 58,1 °C	
3) 50,8 °C	9) 59,7 °C	
4) 51,9 °C	10) 61 °C	
5) 53,3 °C	11) 61,9 °C	
6) 54,8 °C	12) 62,5 °C	

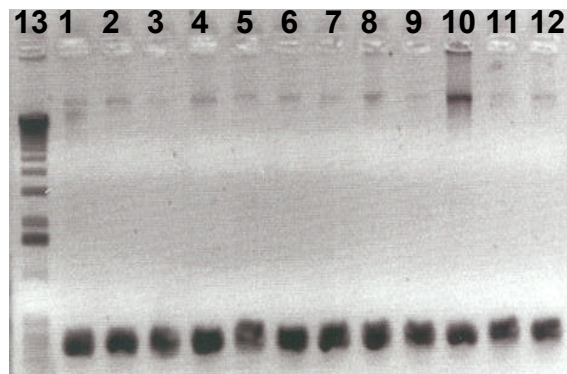


Abb. C14a: Gradienten-PCR mit den Primern Xiso2V / Xiso2R mit *Xanthomonas pv. isotoma*

Spurenbelegung:

1) 50 °C	7) 56,5 °C	13) KBL
2) 50,2 °C	8) 58,1 °C	
3) 50,8 °C	9) 59,7 °C	
4) 51,9 °C	10) 61 °C	
5) 53,3 °C	11) 61,9 °C	
6) 54,8 °C	12) 62,5 °C	

2.2 Spezifität und PCR-Bedingungen für die entwickelten und getesteten *Xanthomonas*-spezifischen Primer

In Tab. C10 sind die für *Xanthomonas* entwickelten Primer mit ihren Sequenzen, Spezifitäten und den evaluierten PCR-Bedingungen aufgeführt.

Primer	5'-Sequenz-3'	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklenzahl	Spezifität
Xantho1.7V Xantho1.7R	GTA CGT TCG CGG ACA TAA ATC ATG GCG TGC TGT GAG T	54 °C	35	<i>X. h. pv. pelargonii</i>
Xantho2.11V Xantho2.11R	TGG TGG TTT CTA TCT TCC CGA ATA CCT TGC TCA TGA	52 °C	30	<i>X. c. pv. lobelia</i> <i>X. c. pv. isotoma</i>
Xantho4.6bV Xantho4.6bR	GAC AGC ACG CAT CTC GAA CTG CCC CGT CGG AAA AGT	56 °C	30	<i>X. c. pv. raphani</i>
Xantho6.8V Xantho6.8R	ACA ACC TCT ACA TGC CAG CGC AGC CAG CAA CTT GAA	59 °C	35	<i>X. c. pv. campestris</i>
Xiso2V Xiso2R	TGT ATG TAG CCG AGC CTT TTC TCT ACG GGC TCT TCT	58 °C	30	<i>X. c. pv. isotoma</i> <i>X. c. pv. lobelia</i>

Tab. C10: Sequenz, Spezifität und PCR Bedingungen der getesteten *Xanthomonas*-spezifischen Primer

Stamm	Xantho6.8V/R	Xantho1.7V/R	Xantho4.6bV/R	Xantho2.11V/R	Xiso2V/R
<i>X. c. pv. campestris</i> LMG 568	PCR+	O	O	O	O
<i>X. c. pv. campestris</i> PD587	PCR+	O	O	O	O
<i>X. c. pv. campestris</i> PD649	PCR+	O	O	O	O
<i>X. h. pv. pelargonii</i> LMG 7314	O	PCR+	O	O	O
<i>X. c. pv. pelargonii</i> LMG 817	O	PCR+	O	O	O
<i>X. c. pv. pelargonii</i> 00/18/2b	O	PCR+	O	O	O
<i>X. c. pv. raphani</i> LMG 860	O	O	PCR+	O	O
<i>X. c. pv. raphani</i> 98/103/3a	O	O	PCR+	O	O
<i>X. c. pv. raphani</i> 99/113/1a	O	O	PCR+	O	O
<i>X. c. pv. raphani</i> GSPB 7/97/2719	O	O	PCR+	O	O
<i>X. pv. lobelia</i> 88/54/4a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/83/3a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 93/82/2b	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/60/1b	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/83/2a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/54/1a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/83/2a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/54/2a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/60/1a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 88/54/3c	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 99/18/1a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. lobelia</i> 99/18/1b	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/134/1a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/134/2a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/134/3a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/175/2a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/175/2b	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/192/1a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/192/2a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/192/2b	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/270/3a	O	O	O	PCR+	PCR+
<i>X. pv. isotoma</i> 01/270/4a	O	O	O	PCR+	PCR+

Tab. C11: PCR Ergebnisse mit den verschiedenen spezifischen Primern (vgl. Tab. C10) mit den unterschiedlichen *Xanthomonas* Isolate
PCR+ = PCR-Produkt in richtiger Größe O = kein PCR Produkt

3 Konstruktion artspezifischer Oligonukleotidprimer für verschiedene *Legionella* Stämme

3.1 Mit MASH isolierte artspezifische Legionellen DNS-Fragmente

Für einige humanpathogene *Legionella*-Arten sollten stammspezifische Primer konstruiert und getestet werden. Die chromosomalen DNS der verschiedenen Legionellen wurden vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie von der Universität Würzburg isoliert. Tab. C4 fasst alle Ergebnisse und PCR-Bedingungen für die verschiedenen *Legionella* Stämme zusammen. Wie bereits für die *Streptomyces* und *Xanthomonas* Stämme wurden einige Ausschlusshybridisierungen durchgeführt, um für die einzelnen *Legionella*-Arten spezifische DNS-Fragmente anzureichern. Die Sequenzen mit den Primerbindestellen sind in den anschließenden Tabellen aufgeführt. Für einzelne Arten, wie *Legionella longbeachae* und *Legionella hackeliae* konnten mehrere artspezifische DNS-Fragmente angereichert werden.

3.1.1 *Legionella pneumophila* Corby spezifisches DNS-Fragment

Die Sequenz des für *Legionella pneumophila* Corby mittels Ausschlußhybridisierung isolierten DNS-Fragmentes ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die entwickelten Primer, legio1.9V / legio1.9R bzw. deren Zielsequenz sind grau unterlegt. Die Länge des spezifischen PCR-Produktes entspricht 259 bp.

Zielstamm	<i>Legionella pneumophila</i> Corby	
Subtraktoren	<i>L. longbeachae</i> ; <i>L. hackeliae</i> , LLAP10	
Sequenz	CCAATAACTT TATTTGTTCA ATTTCTTCTT TAGTTAGCGG TTTCTTCTCC AGCTTCTTGG TTTTATCATT CATTACAGGT CGATTATCTA CCAANCCGCA ACCGACNNGC GTTTTATTGT TCCTGGCTGA TTTTATAGTAT GACTTATTGT TTTGTCCAAT TCGAAATTTT TAGTGGTTTG CATGCGAACA TCCTTTGCCT GCATTTGATC GTCGTGACTG GGTGTTCCCT GGCGAAGGGG CGCGTCCCAN NTGGCGCGG	
Entwickelte Primer	legio1.9V	legio1.9R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	259 bp	
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	

Tab. C12: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

3.1.2 *Legionella longbeachae* spezifische DNS-Fragmente

Für *Legionella longbeachae* konnten 3 DNS-Fragmente mittels MASH isoliert werden. Die Sequenzdaten, die Primer bzw. deren Zielsequenz, die Länge der spezifischen PCR-Produkte sowie die Ergebnisse der BLAST Datenbank-Analyse sind in der Tabelle C13 zusammengefasst.

Zielstamm	<i>Legionella longbeachae</i>	
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. hackeliae</i> ; LLAP10	
Sequenz	TTGGTTTACT ATTGTTTCGTA AACATTTACT GCCTAATGTC ATGCATATTG TGGTGATTAC TTTAGTATTG GATTTTAGCT TTTTAGTCAT GGCTGAAGCA TTACTCTCTT ATAGTAGGGG CAGGCGTCGT CACCAATGAC GATTAGTTGG GGAAATATGA TTAACAGCGC ACGTCTTGAG TTGGCGCGTA ATCCGGTTAT TTGGTGGCCT ATGTTTGCTG CATTTCTTTT TATGTTTTTA TTGGTGCTGG CGATAGTCGT GACTGGGTGT TCCCTGGCGA AGGG	
Entwickelte Primer	legio2.4V	legio2.4R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	196 bp	
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	
Zielstamm	<i>Legionella longbeachae</i>	
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. hackeliae</i> ; LLAP10	
Sequenz	CCTATGTCAT ATATACCTCA GGTTCTACTG GAATGCCTAA TGGGGTGCCA TAACCCACGG TAATTTAGTT CGCCTTTTTTC ATAGCACCAA ACGCNTTNAN AAAATTACAG CAGCAGATGT GTGGACTTTA TTTCAATTCGT ACGCTTTTGA TTTATCAGTG TGGGAACGTG GGGGGGCTTT AGTTTATGGC GGTACTCTAG TCATCGTGCC CCCAGAGACA GCAGTAGATC GTCGTGACTG GGTGTCCCTG GCGAAGGG	
Entwickelte Primer	legio2.7V	legio2.7R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	172 bp	
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	
Zielstamm	<i>Legionella longbeachae</i>	
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. hackeliae</i> ; LLAP10	
Sequenz	ACAGGCAGGG CAAGGACAAG CACATCAGGA ACAGGCACAA ACACAAGCAC ATGAATCAGC CAAAACGGAT GAAAGTGTTG TCGATGCTGA GTTTGAGTAA GTAAAAGACG ATAAGAAGTA ATTGGTTTCT AACGTACTAT ATGATAGCCT GGGTATTCTA TCCTAGTTGA AGCAAAACGT AACTTGAGAT ATGAATGCTC ATTTCTTGGG TTACGTTACT GTTCGTGGCC ATTATGTTAA GAGCAATTTT TTTCCCGT	
Entwickelte Primer	legio2.9V	legio2.9R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	169 bp	
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	

Tab. C13: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

3.1.3 *Legionella hackeliae* spezifische DNS-Fragmente

Anhand der ermittelten Sequenzdaten der entsprechenden DNS-Fragmente, die mittels MASH für *Legionella hackeliae* gewonnen werden konnten, wurden mehrere Primer für diese Art entwickelt (vgl. Tab C14). Eine Datenbankanalyse der Sequenzen ergab für keines der Fragmente ein Resultat.

Zielstamm	<i>Legionella hackeliae</i>			
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. longbeachae</i> ; LLAP10			
Sequenz	GACGATCCTG	CAACAGAGAC	TAATGCTGCG	ACAGATACTA
	ACGCTGGCAA	TAAGTAAAAC	TTATGGAAGA	TGGACTACAA
	GGAGGAAATA	AAATGACACA	TCAAATCGTA	AACGCAGAAG
	ACGTTATTAA	TGTGAAAGTG	CAAAAATTTG	CAAGTTGAGG
	ACTTAGGAAA	AATTGAAGCC	TTGATGCTTG	ATAAGCGTGA
	GGGGCTTGTC	TCTTACGTCG	TATTGTCTTT	TGGTGGCTTC
	TTAGGGATGG	GAGATAAATT	ATTTGCTATG	CCATGGAGCA
	TATTTTCCTA	TGACGATGCG	CAAGATTGTC	GTGACTGGGT
				GTTCCCT
Entwickelte Primer	legio4.2V	legio4.2R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	265 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			
Zielstamm	<i>Legionella hackeliae</i>			
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. longbeachae</i> ; LLAP10			
Sequenz	GACGATCTTT	TTAGGCCTAT	TGGTAATTGG	CTTTATCTAT
	GAGTGGAAAC	AGGGCGCTCT	TGAATGGGAG	TAAGCGTCTT
	TATATTTTAC	AATAGGAATA	ACCATAACGT	TACATTAAC
	CCAGATATTA	TAGAGGCTTG	CTATGGCTGT	TGCTGAATTG
	CAGAAGACTG	GCTTTGTAC	AACCTCAGTG	GAGAACTAG
	TAGGTTGGGC	TCGAAGCGGT	TCAATGTGGC	CCATGACTTT
	CGTTTGGCA	TGTTGCGCCG	TTGAGATGGT	CGTGACTGGG
				TGTTCCCT
Entwickelte Primer	legio4.3V	legio4.3R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	167 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			
Zielstamm	<i>Legionella hackeliae</i>			
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. longbeachae</i> ; LLAP10			
Sequenz	ACGATCTAAG	TGCAATCAAT	AACACACGCT	GACGATTTGC
	GGCAATGGAG	GCTGCCAGGT	TAATTGCAGT	GGTTGTTTTT
	CCACGCCTCC	TTTTTGGTTG	GCAATGGCGA	TGACTTTTGC
	CATGGTTTAT	TCCTTAAGTT	GCATTTTGA	TGATGACGCA
	GCAACGCTCA	CCATCCAGAC	CGGGTACTGA	GTAAGAGTCC
	ACCTGGTAAG	TTGGTTGATG	CTTGCTAATT	CAGTTTCAGG
	ATAGCGCCCT	TTCATGGCAA	GCAAATACCT	TGCTTACCAA
	TGAGATGGTC	GTGACTGGGT	GTTCCCTG	
Entwickelte Primer	legio4.10V	legio4.10R		
Länge des spezifischen PCR-Produkts	200 bp			
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)			

Tab. C14: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

3.1.4 LLAP10 spezifische DNS-Fragmente

Durch Ausschlußhybridisierung konnten für den Stamm LLAP10 2 DNS-Fragmente isoliert werden. Aufgrund der Sequenzdaten wurden zwei Primerpaare entwickelt (vgl. Tab. C15). Eine Datenbankanalyse ergab, dass es sich bei dem Fragment, für das die Primer legio3.4V / legio3.4R konstruiert wurden um ein Teil eines 16S-rRNS Gens handelte (vgl. Tab. C15)

Zielstamm	LLAP10	
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. longbeachae</i> ; <i>L. hackeliae</i>	
Sequenz	AGCGATCCAT TCGCATtGaC aGGACAAATG GATACCCaaC CGCAAtGcAT GGCGCAAGTT TGATTGCTAG TATAGAAAGA AGCATACAAA TAACTTCCAT CTGGACTAAA AGCTACCCCC GTGACGCTCC CATCGGTAAA AGAAGCATCT GTATTAATGG TGCAAGTATC TAATAAGCCA TTGGATTTGA TAGGGCAAAT GGCAATAGAA CCGTTGTTCT CAGATGATGG AGATGCATTA TTGCCAATAT AAGCGA	
Entwickelte Primer	legio3.8V	legio3.8R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	211 bp	
Sequenzähnlichkeiten	-- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	
Zielstamm	LLAP10	
Subtraktoren	<i>L. pneumophila</i> Corby; <i>L. longbeachae</i> ; <i>L. hackeliae</i>	
Sequenz	GCAAAATCCA CTGTATGTCA AGGGTAGGTA AGATTCTTCG CGTTGCATCG AATTAAACCA CATGCTCCAC CGCTTGTGCG GGCCCCCGTC AATTCCTTTG AGTTTTAATC TTGCGACCGT ACTCCCCAGG CGGTCAACTT ATCGCGTTTG CTGCGCCACT AATTATATTC ATATAACCAA CAGCTAGTTG ACATCGTTTA CGGCGTGGAC TACCAGGGTA TCTAATCCTG TTTGCTCCGC ACGCTTTCGT GCCTCAGTGT CAGTATTAGG CCAGGTAGCC GCCTTCGCCA CTGGTGTTC TTCC	
Entwickelte Primer	legio3.4V	legio3.4R
Länge des spezifischen PCR-Produkts	224 bp	
Sequenzähnlichkeiten	99 % zum 16S-rRNS Gen von LLAP10 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	

Tab. C15: Durchgeführte MASH unter Angabe des Zielstammes, der verwendeten Subtraktoren, der Sequenz des isolierten DNS-Fragments, der entwickelten Primer, der Länge des spezifischen PCR-Produkts sowie des Ergebnisses der Datenbankanalyse. Grau unterlegte Bereiche in der Sequenz dienten zur Konstruktion der spezifischen Primer

3.2 In vitro Amplifikationen mit den verschiedenen *Legionella*-spezifischen Primer

Die entwickelten Primer wurden unter Einbeziehung von Vertretern der verschiedenen *Legionella*-Arten auf ihre Spezifität hin getestet. Die Spezifität der Primer legio1.9V / legio1.9R, legio2.4V / legio2.4R, legio2.7V / legio2.7R sowie legio2.9V / legio2.9R wurden außerdem in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für Legionellen (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden) überprüft. Tabelle C 17 fasst die Ergebnisse zusammen.

3.2.1 *Legionella pneumophila* Corby spezifisches Primerpaar

Legionella pneumophila Corby kann mit dem Primerpaar legio1.9V / legio1.9R von den anderen drei *Legionella*-Arten unterschieden werden. Wie auf dem Gelbild zu erkennen ist, (vgl. Abb. C15) erhielt man nur mit der DNS von *Legionella pneumophila* Corby ein PCR-Produkt. Wie aus Tabelle C17 hervorgeht, ergeben alle im Konsiliarlaboratorium für Legionellen (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden) getesteten *Legionella pneumophila* Stämme ein positives Signal. Das generierte Amplifikat entspricht der Länge des spezifischen PCR-Produktes. Die Stämme *L. geestiana*, *L. jordanis*, *L. santicrucis* und *L. wadsworthii* ergaben zwar ebenfalls ein positives Ergebnis, aber die Größe des Amplifikates entsprach nicht der aus den Sequenzdaten ermittelten Länge des spezifischen PCR-Produktes (vgl. Tab C 12).

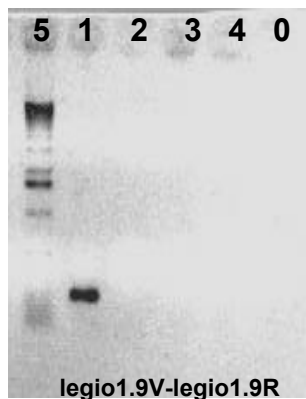


Abb. C15: Artspezifischer Nachweis für *Legionella pneumophila* Corby unter Verwendung des Primerpaares legio1.9V / legio 1.9R

Spurenbelegung:

- | | |
|----------------------------------------|--------------------------------|
| 0) Negativkontrolle | 3) LLAP10 |
| 1) <i>Legionella pneumophila</i> Corby | 4) <i>Legionella hackeliae</i> |
| 2) <i>Legionella longbeachae</i> | 5) KBL |

3.2.2 *Legionella longbeachae* spezifische Primerpaare

Sowohl mit den Primern legio2.4V / legio2.4R als auch mit legio2.7V / legio2.7R kann *Legionella longbeachae* spezifisch nachgewiesen werden. Das Gelbild (vgl. Abb. C16) zeigt, dass nur mit der DNS von *Legionella longbeachae* spezifische PCR-Produkte erhalten wurden. Desweiteren wurden außer diesen beiden Primerpaaren auch noch ein drittes *Legionella longbeachae* spezifisches Primerpaar, legio2.9V / legio2.9R (vgl. Tab. C13) in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für Legionellen (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden) getestet. Die drei Primerpaare wurden an mehr als 65 *Legionella* Stämmen getestet. Nur mit der DNS aller *Legionella longbeachae* Stämmen konnte die „spezifischen“ Amplifikate generiert werden. Alle anderen in vitro Amplifikationen ergaben ein negatives Resultat (vgl. Tab C17).

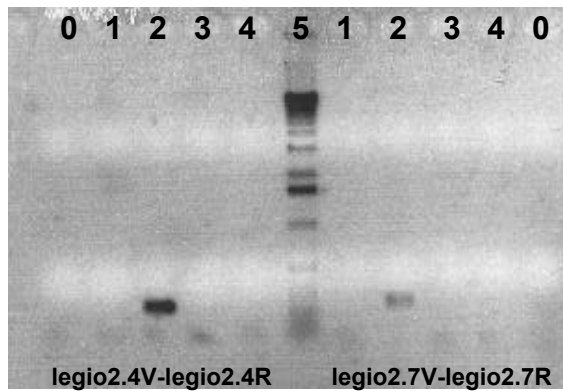


Abb. C16: Artspezifischer Nachweis für *Legionella longbeachae* unter Verwendung der Primerpaare legio2.4V / legio 2.4R bzw. legio2.7V/legio2.7R

Spurenbelegung:

- | | |
|----------------------------------------|--------------------------------|
| 0) Negativkontrolle | 3) LLAP10 |
| 1) <i>Legionella pneumophila</i> Corby | 4) <i>Legionella hackeliae</i> |
| 2) <i>Legionella longbeachae</i> | 5) KBL |

3.2.3 *Legionella hackeliae* spezifische Primerpaare

Die Ausschlusshybridisierung für *Legionella hackeliae* ergab zwei spezifische DNS-Fragmente, die sich für die Primerkonstruktion als nützlich erwiesen. Abb. C17 zeigt, dass sowohl mit dem Paar legio4.10V / legio4.10R als auch mit legio4.3V / legio4.3R ein für *L. hackeliae* spezifisches PCR-Produkt generiert wurden.

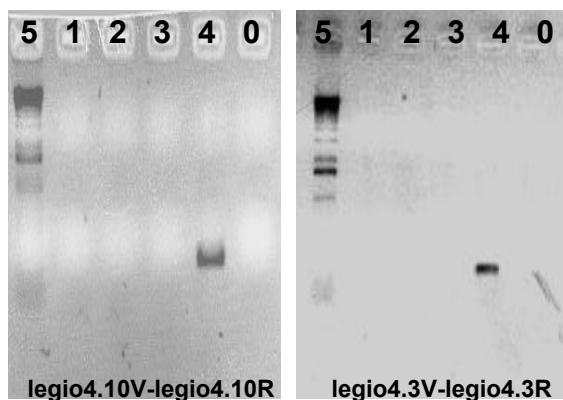


Abb. C17: Artspezifischer Nachweis für *Legionella hackeliae* unter Verwendung der Primerpaare legio4.10V / legio 4.10R bzw. legio4.3V/legio4.3R

Spurenbelegung:

- | | |
|----------------------------------------|--------------------------------|
| 0) Negativkontrolle | 3) LLAP10 |
| 1) <i>Legionella pneumophila</i> Corby | 4) <i>Legionella hackeliae</i> |
| 2) <i>Legionella longbeachae</i> | 5) KBL |

3.2.4 *Legionella* LLAP 10 spezifisches Primerpaar

Die, ausgehend von den ermittelten Sequenzdaten konstruierten Primer legio3.8V / legio3.8R (vgl. Tab C15) ergaben nur mit der DNS von LLAP10 ein spezifisches PCR-Produkt (vgl. Abb. C18). Bei den übrigen *Legionella*-Arten ergibt sich mit diesem Primerpaar kein PCR-Produkt.

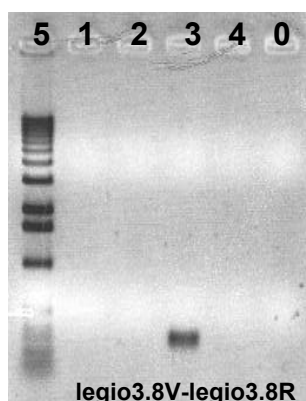
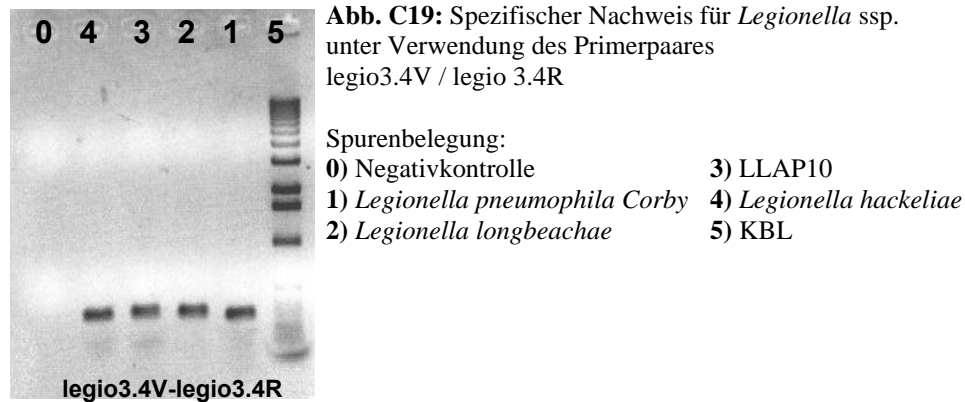


Abb. C18: Artspezifischer Nachweis für *Legionella* LLAP 10 unter Verwendung des Primerpaares legio3.8V / legio 3.8R

Spurenbelegung:

- | | |
|----------------------------------------|--------------------------------|
| 0) Negativkontrolle | 3) LLAP10 |
| 1) <i>Legionella pneumophila</i> Corby | 4) <i>Legionella hackeliae</i> |
| 2) <i>Legionella longbeachae</i> | 5) KBL |

Da sich die Zielsequenzen vom Primerpaar legio3.4V / legio 3.4R auf dem 16S-rRNS-Gen befinden (vgl. Tab C15) und es sich bei diesem Gen um ein konserviertes Gen handelt, wurde mit der DNS von allen 4 *Legionella*-Arten ein PCR-Produkt gebildet (vgl. Abb C19).



3.3 Spezifität und PCR-Bedingungen für die entwickelten und getesteten *Legionella*-spezifischen Primer

Folgende Tabelle beinhaltet die Sequenzen der *Legionella*-spezifischen Primer, führt die gewählten PCR-Bedingungen auf und zeigt die Spezifität der einzelnen Primerpaare auf.

Primer	5'-Sequenz-3'	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklenzahl	Spezifität
legio1.9V legio1.9R	CTT CTC CAG CTT CTT GGT AAT GCA GGC AAA GGA TGT	50 °C	25	<i>L. pneumophila</i>
legio2.4V legio2.4R	CGT AAA CAT TTA CTG CCT GCA AAC ATA GGC CAC CAA	50 °C	25	<i>L. longbeachae</i>
legio2.7V legio2.7R	CCC ACG GTA ATT TAG TTC GCC T ACT GCT GTC TCT GGG GGC	50 °C	25	<i>L. longbeachae</i>
legio2.9V legio2.9R	AAA GTG TTG TCG ATG CTG TTA ACA TAA TGG CCA CGA	50 °C	25	<i>L. longbeachae</i>
legio3.4V legio3.4R	TTC ACT GTA TGT CAA GGG CAG GAT TAG ATA CCC TGG	50 °C	25	<i>Legionella</i>
legio3.8V legio3.8R	CAG GAC AAA TGG ATA CCC CCA TCA TCT GAG AAC AAC	50 °C	25	LLAP10
legio4.2V legio4.2R	ACT AAT GCT GCG ACA GAT ATA TGC TCC ATG GCA TAG	50 °C	25	<i>L. hackeliae</i>
legio4.3V legio4.3R	GAA TGG GAG TAA GCG TCT CAC ATT GAA CCG CTT CGA	50 °C	25	<i>L. hackeliae</i>
legio4.10V legio4.10R	GAG GCT GCC AGG TTA ATT GCG CTA TCC TGA AAC TGA	50 °C	25	<i>L. hackeliae</i>

Tab. C16: Sequenz, Spezifität und PCR Bedingungen der getesteten *Legionella*-spezifischen Primer

Stamm	legio1.9 V/R	legio2.4 V/R	legio2.7 V/R	legio2.9 V/R	Stamm	legio1.9 V/R	legio2.4 V/R	legio2.7 V/R	legio2.9 V/R
<i>L.adelaidensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.longbeachae</i> DK 59		PCR+	PCR+	PCR+
<i>L.anisa</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.maceachernii</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.birminghamensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.micdadei</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.bozemanii</i> Pat.Stamm Coj	0	0	0	0	<i>L.micdadei longgoilhill</i>	0	0	0	0
<i>L.bozemanii</i> sg1 ATCC	0	0	0	0	<i>L.moravica</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.bozemanii</i> sg2 ATCC	0	0	0	0	<i>L.nautarum</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.brunensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.parisiensis</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.cherrii</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.quinlivanii</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.dumoffii</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.rubrilucens</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.erythra</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.sainthelensis</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.faifieldensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.santicrucis</i> ATCC	Pu+	0	0	0
<i>L.geestiana</i> ATCC	Pu+	0	0	0	<i>L.shakespaerii</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.gormanis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>L.spritensis</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.haeckeliae</i> sg1 ATCC	0	0	0	0	<i>L.steigerwalthii</i> ATCC	0	0	0	0
<i>L.haeckeliae</i> sg2 ATCC	0	0	0	0	<i>L.wadsworthii</i> ATCC	Pu+	0	0	0
<i>L.jamestowniensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>Lp1 Allentown</i>	PCR+	0		
<i>L.jordanis</i> ATCC	Pu+	0	0	0	<i>Lp1 Bellingham</i>	PCR+	0		
<i>L.lansingensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>Lp1 Benidorm</i>	PCR+	0		
<i>L.londinensis</i> ATCC	0	0	0	0	<i>Lp1 Camperdown</i>	PCR+	0		
<i>L.longbeachae</i> sg1 ATCC	0	PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp1 France</i>	PCR+	0		
<i>L.longbeachae</i> sg2 ATCC	0	PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp1 Knoxville</i>	PCR+	0		
<i>L.longbeachae</i> Australia 1		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp1 Olda</i>	PCR+	0		
<i>L.longbeachae</i> Australia 2		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp1 Oxford</i>	PCR+	0		
<i>L.longbeachae</i> Australia 3		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp1 Philadelphia-1</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Australia 5		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp10 ATCC</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Australia 6		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp11 ATCC</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Australia 8		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp12 ATCC</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Australia 10		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp13 ATCC</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Australia 12		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp14 ATCC</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> 4942		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp15 ATCC</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> France 3		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp2 Togus</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> France 4		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp3 Bloomington</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Italy 23		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp4 Los Angeles</i>	PCR+	0	0	0
<i>L.longbeachae</i> Scottl 12		PCR+	PCR+	PCR+	<i>Lp4 Portland</i>	PCR+	0	0	0

Stamm	legio1.9 V/R	legio2.4 V/R	legio2.7 V/R	legio2.9 V/R	Stamm	legio1.9 V/R	legio2.4 V/R	legio2.7 V/R	legio2.9 V/R
<i>Lp5 Cambridge</i>	PCR+	O	O	O	<i>Lp7 Chicago-8</i>	PCR+	O	O	O
<i>Lp5 Dallas</i>	PCR+	O	O	O	<i>Lp8 ATCC</i>	PCR+	O	O	O
<i>Lp6 Chicago-2</i>	PCR+	O	O	O	<i>Lp9 ATCC</i>	PCR+	O	O	O

Tab. C17: Ergebnisse der PCR/ Sequenzierung mit *L. pneumophila*- (legio1.9V/legio1.9R) und *L. longbeachae*- (legio2.4V/legio2.4R, legio2.7V/legio2.7R legio2.9V/legio2.9R) spezifischen Primern
Lp = *L. pneumophila*
O = kein PCR Produkt
Pu+ = PCR-produkt in falscher Größe
PCR+ = PCR-produkt in richtiger Größe, richtige Sequenz

4. „Spezifisches DNS-Fischen“ in Mikrotiterplatten und Identifizierung der isolierten DNS-Fragmente

Da die mittels MASH isolierten Fragmente meistens nicht größer als 200 bp sind und diese Fragmente oft nicht genügend Information tragen, um eine sinnvolle Datenbankanalyse zu gewährleisten, wurde ein Verfahren entwickelt, das es ermöglichen soll, die Sequenzdaten über den Bereich der kurzen Fragmente hinaus zu erhalten. Mit dem Verfahren des „spezifischen DNS-Fischens“ (vgl. B 14.2) konnte für *X. c. pv. raphani*, *X. c. pv. campestris*, *X. h. pv. pelargonii*, *X. pv. lobelia*, *L. pneumophila* Corby und LLAP10 größere DNS-Fragmente isoliert und sequenziert werden (vgl. G 1).

4.1 Vergleichende Sequenzanalyse von drei virB11-Varianten

Für *X. c. pv. raphani* konnte das virB11 Gen isoliert werden. In der BLAST Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sind virB11 Gensequenzen von *X. c. pv. campestris* und *X. axonopodis* pv. *citri* hinterlegt. Nachfolgend sind die drei Sequenzen vergleichend aufgeführt. *X. c. pv. raphani* weist eine Sequenzähnlichkeit von 84 % zu *X. a. pv. citri* und von nur 80 % zu *X. c. pv. campestris* auf. Die Sequenzunterschiede sind grau bzw. die Übereinstimmungen mit einem Stern unterlegt.

```

Xac  -----CTAGCCGCCGCGCAGGGTGCGAAGAGGATCGAAATCGATACCCGTGATGAAGC
Xcr  TTACCCCTCAACCGCCGCGCAAGGTTCTCAGAGGATCGAAGTCGATGCCCGTGATGAACC
Xcc  -----TCAGCCGCCACGCAGTGTTCCTTGCCGGATCGAAGTCGATCCAGTAATAAAGC
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

```

Xac  GCCGTCCAGCGTGCCTTGATGTGAACCACGATGTCGATGGTCATTCTCAACAGACGTT
Xcr  GCGCGCCGCGTGTGCCTTGATGTGAACCACGATGTCGATCGTCATTTCGACAGCAAACGCT
Xcc  GCGCGCCAGCATGCCTTGATGTGAACCACGATATCGATGGTCATGCGCAGCAGCCGCT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Xac  TGATCACCTCGAACTCCAGACCGGAGCCCTCATTGGAGGCCTTACCATCAACGCAAGCT
Xcr  TGATCACTTCGAACTCCAGACCGGAGCCCTTCGTTGGATGCCTTACCATCAAGGCCAACT
Xcc  TGATAACCTCGAACTCCAGACCGGAACTTCATTGGAGGCCTTACCATGAGCGCGAGCT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Xac  GGTCCCAGGTCTGCTCAACACTTCCGGCATGGCAACTGGTGATGGAGCCAGGATGGCCCG
Xcr  GGTCCCAGGTCTGCTCGACGCTACCGGCGTGGCAACTGGTGATGGAACCCGGATGTCCCG
Xcc  GGTCCCAGGTCTGTTCCACGCTGCCTGCGTGGCAGCTGGTGATTGAACCAAGGATGGCCCG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Xac  ACGCGCAGTTACGAATGAAGTAGAACGACTCATCGCCGCGCAACTCGGCAAGGATGATGC
Xcr  ATGCGCAGTTACGGATGAAGTAGAACGACTCATCACCACGCAACTCGGCCAGGATGATGC
Xcc  ATGCACAATTGCGGATGAAATAGAACGATTTCGTCACCACGCAACTCAGCAAGGATGATCC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```
Xac  GGTCTGGCTTCATACGCGAGGCAGGCCTCCATGCAGCTCTTAGCAGTCACGTTGCTGGCGC
Xcr  GATCCGGTTTTATGCGCAGGCATGCCTCCATGCAACTCTTGGCAGTCACATTGCTGGCGC
Xcc  GATCAGGCTTCATGCGCAGGCAGGCCTCCATGCAACTCTTAGCGGTCACATTACTCGCAC
* * * * *
Xac  TTTGACCGCCCTTGAATAAAGCAGGTGCACAGCGTTTCGGCTGACTAATGAATAACTCCC
Xcr  TCTGTCCACCCTTCGAATACAACAGGTGCACGGAATTGGGCTGACTGATGAACAGCTCAC
Xcc  TCTGCCCCCTTTTCGAGTACAACAGATGCACCGAATTCGGCTGGCTGATGAATAGCTCGC
* * * * *
Xac  TGGCGTCCTCAATCGTCACCAGGCGCTCTTCGTTTCGGAATGTGGTTGACCAGCGCCTTCA
Xcr  GCGCGTCCTCGATGGTGACAAGACGTTCTTCGTTGGGGATGTGATTGACAAGTGCCCTTCA
Xcc  GGGCGTCCTCGATGGTAACCAGGCGTTCTTCGTTTCGGAATGTGGTTGACAAGAGCCTTCA
* * * * *
Xac  TGAAGGTGCTTTTGGCCGTACCTGTGCCCCGGCAACAACGACATTTTCTTGTAAGCA
Xcr  TGAAGGTGGTCTTGGCCGTGCCTGTTGCCCCAGCCACGACTACATTCTTCTGTACAGCA
Xcc  TGAAAGTAGTCTTGCCACTACCAGTGCACCGGCCACCACTACATTCTTCTTGTAAGTA
* * * * *
Xac  CGCACTTCTTGAAAACTCTGCGTAATCGCGCTTTCGGCGCAGCTCAAGCAGTTCTGGT
Xcr  CGCACTTTTGAAGAACTCGGCATAGTCACGTTTACGGCGCAATTCCAGCAACTCCTGGT
Xcc  CCGACTTCTTGAAGAATTCGAGTACTGCTTGCTACGACGCAACTCAAGCAGTTTCGCGGT
* * * * *
Xac  CGTGATCGCTGACATCCGCCGATTGCTCAAGCACTTCGTGCAAGAAACCGTCGTGCTTGT
Xcr  CATGGTCGCTGACATCGGCCGACTGTTCCAGGACCTCGTGAAGAAACCGTCATGTTTAT
Xcc  CTTGTTGCTGACATCCGCGACTTGTCAAGCACCTCGTGAAGAAACCGTCGTGCTGTTGT
* * * * *
Xac  ACTGCTCAAGCGACTTTGTGTGCTTGAAGGAAGTCGGATCGTGATGGACACCTTGCCCG
Xcr  ACTGCTCCAGCGACTTCGTATGCTTGAAGGAACCGATCGTGATGGATACTTGCCCG
Xcc  ACTGCTCGAGCGTCTTGGTATGTTTGGACGGCAAGCGAATCGTGATCGAGACCTTCCCG
* * * * *
Xac  CATCGCAGGCAGGAGGCATCACGAAGTGCACGTTGCCCGGTCGGAAACGTTAGCGATA
Xcr  CGTGCATGCCGGCGGCATCACGAAGTGTGCGCGCTGCCCGTCCGAAAGTCAGTGATA
Xcc  CATCGCACGGGGCGGAATTACGAAGTGTGCGCGTTGGCCAGTGGGAAACGTTAATGAGA
* * * * *
Xac  CGACAGGGTCGGCATCGGTGATGCGTTGCCCGGTGTTGCTCTCATTGACGACCGCCGTAC
Xcr  CCACCGGGTCGGCGTTCGGTGATACGTTGCCCGGTATTGCTCTCGTTGACGACAGCCGTAC
Xcc  CCACCGGATCGGCATCGGTAATGCGCTGACCAAGTATTGCTCTCGTTGACGACTGCCGTG
* * * * *
Xac  AGAACTGCCGAGCGCGGTTCGTAGGTGAGGGATGGCACGTCGACTCGCTGCCATCCATGGA
Xcr  AAAACTGCCGAGCACGGTCGTAAAGTGAGCGACGGCACATCAACCCGCTGCCACCCATGAA
Xcc  AGAACTGTGGGGCGGATCAAAGGTGAGCGACGGTACCTCCATGCGCTGCCAGCCGTTGA
* * * * *
Xac  TCGTCTCCAGGTACAGCTCACAGGACGATTGATGCAAATTTCCGTCACGTCAGGCGAAT
Xcr  TGGTCTCAAGATACAGCTCACCCGGACGATTGATGCAATTTCCGTCACGTCAGGCGAGT
Xcc  TCGTTTCAAATAACAACCTCGCCAGGACGATTGATGCAAATTTCCGTCACGTCAGGCGAAT
* * * * *
Xac  TCAGATAGTCCAGAATCCCAGCACGGAGTACTGGTAATCCAGAAAGTCATTGGAAATAC
Xcr  TCAGGTAATCCAGGATCCCAGCACTGAGTACTGGTAATCCAGGAAAGTCATTGAGATGC
Xcc  TCAGATAATCCAGGATCCCAGTACGGAGTACTGATAATCCAGGAAATCATTCGAGATCC
* * * * *
```



```

Xcc  CTGGGTGCTGCGGTCGGCTATGTCTCGCTCTGGACGGTGTGGTGGCTGTTCAAGCAGCTC
Xac  CTGGGCGCGGCGGTCGGCTATGTCTCGCTATGGACGGTGTGGTGGTGTGTTCAAGCAGCTC
      ***** ** *****
Xcc  ACCGGCAAGGAAGGGATGGGCCACGGCGACTTCAAGTTGCTGGCTGCGCTGGGGGCGTGG
Xac  ACCGGCAAGGAAGGCATGGGCCACGGCGACTTCAAGTTGCTGGCCGCGCTTGGCGCGTGG
      ***** ** *****
Xcc  TCGGGGTTGAAGGGCATTCTGCCGATCATCCTGATCTCCTCGCTGGTCGGCGCCGTGCTC
Xac  TCGGGGTTGAAGGCATCCTGCCGATCATCCTGATCTCCTCGCTCGTCGGCGCCATCCTC
      ***** ** *****
Xcc  GGTTTCGATCTGGCTGTTTCGCCAAGGGGCGCGACCGGCCACGCCGATCCCCTTCGGACCT
Xac  GGCTTCGATCTGGCTGGTGGCCAAGGGCCGCGACCGGCCACCCCATCCCCTTCGGCCCC
      ** ***** * ***** ** *****
Xcc  TATCTGGCCATCGCCGGCTGGGTAGTGTTCCTTCTGGGGTAACGACCTGGTGGATGGCTAC
Xac  TACCTGGCCATTGCTGGCTGGGTGGTGTTCCTTTGGGGCAACGACCTGGTGGACGGCTAC
      ** ***** ** ***** ***** ***** *****
Xcc  CTGCGTTTTCGCAGGCCTGCGTTGA
Xac  CTGCACTTCGCAGGCCTGCGTTGA
      **** *****

```

Xcc: *X. campestris* pv. *campestris*

Xac: *X. axonopodis* pv. *citri*

5 Entwicklung einer Screeningmethode im MTP-Format

Um die aufwendige vergleichende Genomsequenzierung zu umgehen, wurde versucht eine Methode zu entwickeln, mit der man gezielt nach „spezifischen“ Genen bzw. deren Varianten suchen kann.

5.1 Prinzip der molekularen Screeningmethode

Ähnlich der Methode des „spezifischen DNS Fischens“, wurden hier bekannte, spezifische DNS-Fragmente (zwischen 200 bp-600 bp) anstelle spezifischer Oligonukleotid-Sonden in MTP immobilisiert (vgl. B 14.2.2). Abb. C20 zeigt eine schematische Darstellung des Verfahrens, die im wesentlichen mit dem Prinzip der Methode des „spezifischen DNS Fischens“ übereinstimmt (vgl. B 14.2).

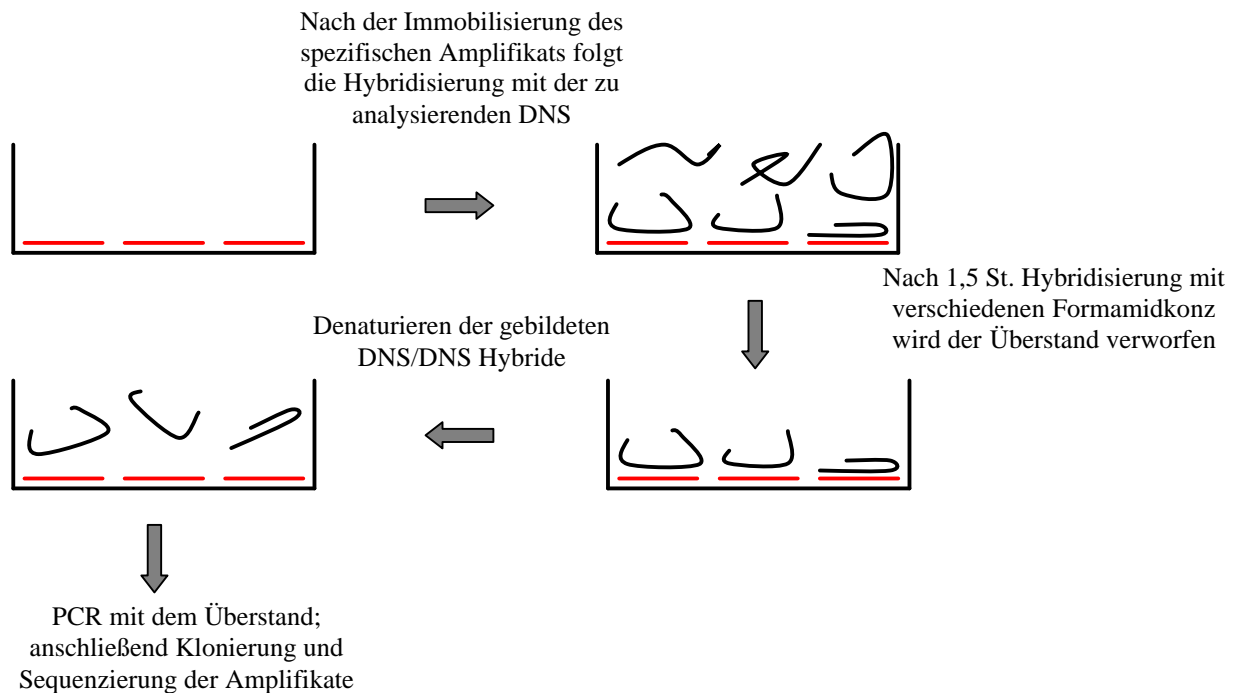


Abb. C20: Schematische Darstellung der molekularen Screeningmethode im MTP-Format

5.2 Isolierung und Analyse der unterschiedlichen *Paenibacillus polymyxa* Spacer

Um das unter C 5.1 beschriebene Verfahren zu testen, wurde versucht, die unterschiedlichen *Pb. polymyxa* rRNS-Operone mit dieser Methode zu isolieren.

Wie Abb. C20 zeigt, wurde ein PCR-Produkt in der MTP immobilisiert, um die unterschiedlichen Spacer bzw. rRNS-Operone zu isolieren. Das PCR-Produkt wurde mit dem Primerpaar 632V (vgl. Tab. B3) und 118R (vgl. Tab. B4) hergestellt. Es beinhaltet den 3'-terminalen Bereich der 16S-rDNS, den Spacer und den 5'-terminalen Bereich der 23S-rDNS wie auf der Abb. C21 zu erkennen ist. Die Größe des Amplifikats beträgt ca. 600 bp.

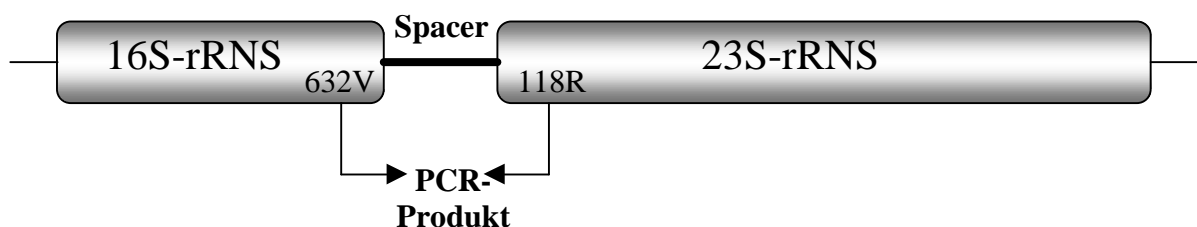


Abb. C21: Lage des Bereiches der amplifiziert und in der MTP immobilisiert wurde, um die einzelnen rRNS-Operone zu isolieren

Nach der Immobilisierung der Amplifikate (vgl. B 14.2.2) erfolgte die Hybridisierung (vgl. B 14.2.2) mit unterschiedlichen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer in den verschiedenen Kavitäten der MTP. Nach 1,5 stündiger Hybridisierung wurde der Hybridisierungsüberstand verworfen. Die gebildeten DNS/DNS Hybride wurden anschließend denaturiert. Nach Amplifikation mit den Primern 632V (vgl. Tab. B3) und 118R (vgl. Tab. B4) der denaturierten Einzelstränge erfolgte deren Klonierung und Sequenzierung.

5.2.1 Sequenzanalyse der isolierten Spacer-DNS

Nach der Klonierung in den TOPO-TA Cloningvektor (vgl. B 9.3) wurden die Plasmide isoliert und mit den Primern M13V und, oder M13R (vgl. Tab B7) sequenziert. Es konnten mehrere Varianten von Spacern isoliert werden. Spacer 1 und 2 unterscheiden sich deutlich in ihrer Sequenz von allen anderen. Die Spacer 3,4,5,6 und 7 sind ähnliche Varianten. Diese unterscheiden sich nur in einzelnen Basen(vgl. Abb. C22).

	16S-rRNS						
	←						
Sp. 1	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCCTGCA	A-TGGAAACAT	TCAAATATGA	AGCGTAACGT	
Sp. 2	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCGGGAG	AGCGGAAACAT	TCAAATATGA	AGCATAAGCT	
Sp. 3	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCCTGCA	A-TGGAAACAT	TCAAATCAGC	AGGTGTATAT	
Sp. 4	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCCTGCA	A-CGGAAACAT	TCAAATCAGC	AGGTGTATAT	
Sp. 5	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCCTGCA	A-TGGAAACAT	TCAAATCAGT	AGGTGTATCT	
Sp. 6	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCCTGCA	A-CGGAAACAT	TCAAATCAGC	AGGTGTATAT	
Sp. 7	CCTCCTTTCT	ATGGAGAATC	GTTTCCTGCA	A-CGGAAACAT	TCAAATCAGC	AGGTGTATAT	
Sp. 1	TCAATAATTC	ATCATTCCAT	TTGTTCAAGT	<u>TTGATGGAAC</u>	<u>TTGTAAGGGG</u>	CCATAGCTCA	
Sp. 2	TCA-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Sp. 3	ACCTGCGACC	GGATATTCAA	TTCAGTTCAT	CACATTCGTG	TGAATGAAAT	GGATATCCTG	
Sp. 4	ACCTGCGACC	GGATATTCAA	TTCGGTTCAT	CACGTTTCGTG	TGAATGAAAT	GGATATCCTG	
Sp. 5	<u>ACCTGCGACC</u>	GGATATTCAA	TTCGGTTCAT	CACATTCGTG	TGAATGAAAT	GGATATCCTG	
Sp. 6	ACCTGCGACC	GGATATTCAA	TTCGGTTCAT	<u>CACGTTTCGTG</u>	<u>TGAATGAAAT</u>	GGATATCCTG	
Sp. 7	ACCTGCGACC	GGATATTCAA	TTCGGTTCAT	CACGTTTCGTG	TGAATGAAAT	GGATATCCTG	
Sp. 1	GCTGGGAGAG	CGCCTGCCTT	GCACGCAGGA	GGTCAGCGGT	TCGATCCCGC	TTGGCTCCAC	
Sp. 2	AACTTAC--A	CTCGTTGCTC	AGTTTTGAGA	GTTCAAAGCTC	TCAAAAAGGT	ATATCAATTT	
Sp. 3	AACTTACTCA	CTCGTTGCTC	AGTTTTGAGA	GTTCAAAGCTC	TCAAGTTTCG	ACGAATGTTT	
Sp. 4	AACTTACTCA	CTCGTTGCTC	AGTTTTGAGA	GTTCAAAGCTC	TCAAGTTTCG	ACGAATGTTT	
Sp. 5	AACTTACTCA	CTCGTTGCTC	AGTTTTGAGA	GTTCAAAGCTC	TCAAGTTTCG	ACGAATGTTT	
Sp. 6	AACTTACTCA	CTCGTTGCTC	AGTTTTGAGA	GTTCAAAGCTC	TCAAGTTTCG	ACGAATGTTT	
Sp. 7	AACTTACTCA	CTCGTTGCTC	AGTTTTGAGA	GTTCAAAGCTC	TCAAGTTTCG	ACGAATGTTT	

Sp. 1	CAATTACAAT	TTCATCTATA	ACCGTTTGGG	GATCATTAAC	CTTCAGGAG	TTGATTGATA
Sp. 2	CCAACACTTA	CTTGTAGTCA	<u>GGTCAGTGGG</u>	AATGAGATATG	CTATTTATC	CGGCCTTAAA
Sp. 3	CATTCACACA	T <u>CGTGTGGAA</u>	CCGAAATATT	CATC <u>GGGTTTC</u>	GCTTCGACG	AAGCGAAT--
Sp. 4	CATTCACACA	T <u>CGTGTGGAA</u>	CCGAAATATT	CATC <u>AGGCTTC</u>	GCTTCGACG	AAGCGAAT--
Sp. 5	CATTCACACA	T <u>GGTGTGGAA</u>	CCGAAATATT	CATC <u>GGGTTTC</u>	GCTTCGACG	AAGCGAAT--
Sp. 6	CATTCACACA	T <u>CGTGTGGAA</u>	CCGAAATATT	CATC <u>AGGCTTC</u>	GCTTCGACG	AAGCGAAT--
Sp. 7	CATTCACACA	T <u>CGTGTGGAA</u>	CCGAAATATT	CATC <u>AGGCTTC</u>	GCTTCGACG	AAGCGAAT--

Sp. 1	ATCACACAGC	TTTGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	----	AAATTGCGTT	TTAGA
Sp. 2	ACCGGAAAAA	CGTGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	AACG	AAATTGCGTT	TTAGA
Sp. 3	-----	--TGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	----	AAATTGCGTT	TTAGA
Sp. 4	-----	--TGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	----	AAATTGCGTT	TTAGA
Sp. 5	-----	--TGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	----	AAATTGCGTT	TTAGA
Sp. 6	-----	--TGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	----	AAATTGCGTT	TTAGA
Sp. 7	-----	--TGCACCTT	GAAA <u>ACTGGA</u>	TACCGAAACG	----	AAATTGCGTT	TTAGA

Sp. 1	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	AGTGAAATAA	AGGTAGCAGA	TAAGGGAAGA
Sp. 2	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	A-----	-----	-----
Sp. 3	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	AGTGAAGTAA	<u>AGGTAGC</u>	-----
Sp. 4	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	AGTGAAATAA	AGGTAGC	-----TGC
Sp. 5	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	AGTGAAATAA	AGGTAGC	-----TGC
Sp. 6	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	AGTGAAATAA	AGGTAGC	-----TGC
Sp. 7	ATATTCCTTT	AAGCTGATCT	TGTGTAAACA	AGTGAAATAA	AGGTAGC	-----TGC

Sp. 1	TATTTTGCTT	TTGGCAAAAA	TCATTCTTTA	TTGAAACATC	GACATTTTCT	TTCTCTGAAA
Sp. 2	-----	-----	-----GA	AAACTTAAAG	TAGCGAATCG	TATTTACATT
Sp. 3	-----	-----	-----	---ATATATC	<u>GACATTTTCT</u>	TTCTCTGAAA
Sp. 4	CTTGAATTTT	ATTCACACGT	GAGT <u>GTTGAA</u>	CCGAAATTCA	AAGCAAATCG	TATTTACAAT
Sp. 5	CTTGAATTTT	ATTCACACGT	GAGT <u>GTTGAA</u>	CCGAAATTCA	AAGCAAATCG	TATTTACGAT
Sp. 6	CTTGAATTTT	ATTCACACGT	GAGT <u>GTTGAA</u>	CCGAAATTCA	AAGCAAATCG	TATTTACAAT
Sp. 7	CTTGAATTTT	ATTCACACGT	<u>GAGT</u> GTTGAA	CCGAAATTCA	AAGCAAATCG	TATTTACAAT

Sp. 1	GAGAAGTCTA	GGTTAA
Sp. 2	GTAAATACTA	GGTTAA
Sp. 3	GAAAAGTCTA	GGTTAA
Sp. 4	GTAGATACTA	GGTTAA
Sp. 5	GTAAATACTA	GGTTAA
Sp. 6	GTAGATACTA	GGTTAA
Sp. 7	GTAGATACTA	GGTTAA

23S-rRNS

Abb. C22: Sequenzen der isolierten *Pb. polymyxa* 16S- 23S-rDNS Spacer
 Farblich unterlegt: Sequenzunterschiede der Spacer 3,4,5,6 und 7
 Grau unterlegt: konservierte Bereiche aller sieben Spacer
 Unterstrichen: operonspezifische Primerbindestellen

5.2.2 Suche nach t-RNS-Genen in den Spacersequenzen

Alle Spacersequenzen wurden einem tRNS Scan (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/>) unterzogen. Es konnte aber nur für Spacer 1 ein tRNS-Gen gefunden werden (vgl. Abb. C23).

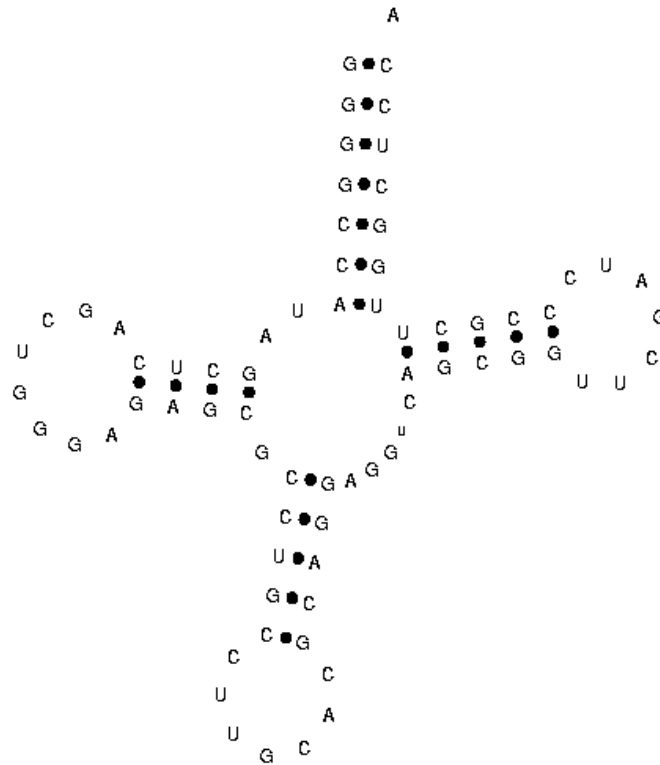


Abb. C23: Sekundärstrukturmodell der in Spacer 1 gefunden Alanin-tRNS

5.2.3 Konstruktion operonspezifischer Primer ausgehend von den unterschiedlichen Spacersequenzen

Wie auf Abb. C22 zu erkennen ist, befinden sich in den einzelnen Spacern, mehrere Stellen, die als Zielregionen für operonspezifische Primer dienen könnten. Diese Stellen wurden dann auch dazu genutzt. Lediglich für den Spacer 4 konnte keine spezifische Basenzusammensetzung gefunden werden. Wie aus Abb. C22 hervorgeht, stimmen die variablen Bereiche vom Spacer 4 immer mit einem der anderen Spacer überein. Tab. C18 listet die konstruierten operonspezifischen Primer auf.

Primer	5'-Sequenz-3'	Spezifität	Bindungsposition im Spacer
Paenop1R	CCC TTA CAA GTT CCA TCA	Spacer 1	74. Base
Paenop1.1R	TTT CAA GGT GCA AAG CTG	Spacer 1	119. Base
Paenop2.1R	ATG TCG ATA TAT GC	Spacer 3	316. Base
Paenop3aR	GCA GGT ACA TAC ACC TAC	Spacer 5	42. Base

Paenop3bR	TTC ATT CAC ACG AAC GCG	Spacer 6	84. Base
Paenop3cR	GAA TTT CGG TTC AAC GCT	Spacer 7	346. Base
Paenop5R	TCA TTC CCA CTG ACC TGA	Spacer 2	133. Base

Tab. C18: Operonspezifische *Pb. polymyxa* Primer mit ihrer Sequenz, Spezifität und Bindungsposition

5.2.4 PCR mit den entwickelten operonspezifischen Primern

Um zu testen, ob die spezifischen Rückwärtsprimer binden, wurden sie alle mit dem Universalprimer 616Valt (vgl. Tab. B3) getestet. Abb. C24 zeigt, dass mit allen Primern ein PCR-Produkt gebildet werden konnte und die Amplifikate der erwarteten Größen entsprechen.

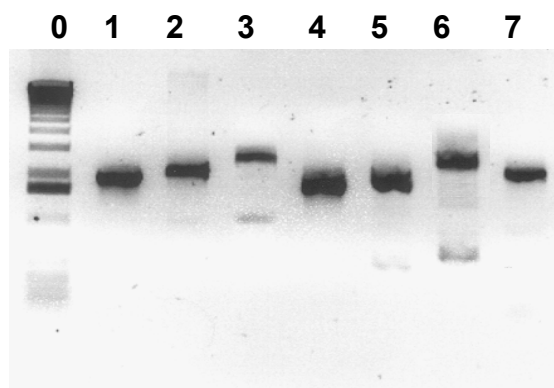


Abb. C24: In vitro Amplifikation verschiedener *Pb. polymyxa* Operone unter Verwendung des Primers 616Valt mit den unterschiedlichen operon-spezifischen Rückwärtsprimern

Spurenbelegung:

- | | |
|---------------|--------------|
| 0) KBL | 5) Paenop3bR |
| 1) Paenop1R | 6) Paenop3cR |
| 2) Paenop1.1R | 7) Paenop5R |
| 3) Paenop2.1R | |
| 4) Paenop3aR | |

5.2.5 16S-rRNS Sequenzanalyse

Zur Überprüfung ob die operon-spezifischen Primer auch tatsächlich spezifisch binden wurde die unter C 5.2.4 erhaltenen Amplifikate sequenziert. Es konnten vier verschiedene 16S-rRNS Varianten identifiziert werden (vgl. G 2).

5.2.6 Konstruktion verschiedener 16S-rRNS operonspezifischer Primer

Die bekannten Sequenzheterogenitäten der 16S-rRNS (Nübel et al. 1996) konnten eindeutig identifiziert werden und somit wurde angenommen, dass die auf den Spacern konstruierten Primer operonspezifisch binden. Es wurden nun 16S-rRNS Vorwärtsprimer konstruiert unter Verwendung der gefundenen Sequenzheterogenitäten. Tab. C19 listet diese Primer auf.

Primer	Position [E. coli (Brosius et al., 1981)]	5'-Sequenz-3'
Paeni16S_1V	1248	ACA ACG GGA AGC GAA ATC
Paeni16S_2V	1248	ACA ACG GGA AGC GAA GCC
Paeni16S_3V	1261	AAG CCG CGA GGC G
Paeni16S_4V	1255	GAA GCG AAG GAG CGA TCT

Paeni16S_5V	1255	GAA GCG AAG GAG CGA GGU
-------------	------	-------------------------

Tab. C19: Operonspezifische *Pb. polymyxa* 16S-rRNS Primer

5.2.7 Operonspezifische *in vitro* Amplifikationen mit verschiedenen Primerkombinationen

Die Abbildungen C11.1-C11.4 zeigen mit welchen Primerkombinationen Amplifikate generiert werden konnten. Es wurden für die verschiedenen PCR-Reaktionen die unterschiedlichen 16S-rRNS Vorwärtsprimer mit den einzelnen spacerspezifischen Rückwärtsprimern kombiniert. In Tabelle C20 sind die Ergebnisse, die mit den jeweiligen Primerkombinationen erhalten wurden, zusammengefasst.

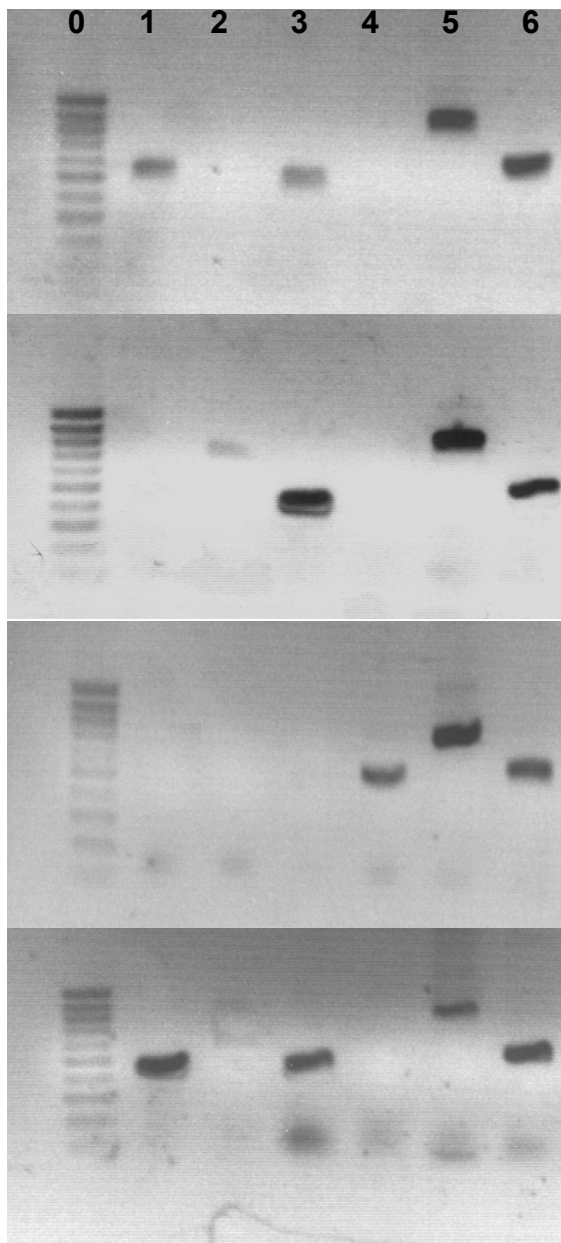


Abb. C11.1: Operonspezifischer Nachweis für *Pb. polymyxa* mit dem Vorwärtsprimer **Paeni16S_1V** und verschiedenen operonspezifischen Rückwärtsprimern

Abb. C11.2: Operonspezifischer Nachweis für *Pb. polymyxa* mit dem Vorwärtsprimer **Paeni16S_2V** und verschiedenen operonspezifischen Rückwärtsprimern

Abb. C11.3: Operonspezifischer Nachweis für *Pb. polymyxa* mit dem Vorwärtsprimer **Paeni16S_4V** und verschiedenen operonspezifischen Rückwärtsprimern

Abb. C11.4: Operonspezifischer Nachweis für *Pb. polymyxa* mit dem Vorwärtsprimer **Paeni16S_5V** und verschiedenen operonspezifischen Rückwärtsprimern

Spurenbelegung:

- | | |
|----------------------------|----------------------|
| 0) 50 bp DNS Leiter | 4) Paenop 3bR |
| 1) Paenop 1R | 5) Paenop 3cR |
| 2) Paenop 2.1R | 6) Paenop 5R |
| 3) Paenop 3aR | |

5.3 Zusammenfassung der verschiedenen Primerkombinationen

Tab. C20 fasst, zur besseren Übersicht, die Ergebnisse der verschiedenen operonspezifischen PCR's zusammen. So wurden alle operonspezifische 16S-rRNS Vorwärtsprimer mit allen spacerspezifischen Rückwärtsprimern und umgekehrt getestet. Wie zu erkennen ist, wurde nur mit dem Primer Paeni16S_3V kein Amplifikat generiert. Alle anderen Kombinationen ergaben ein oder mehrere PCR-Produkte.

	Paeni16S_1V	Paeni16S_2V	Paeni16S_3V	Paeni16S_4V	Paeni16S_5V
Paenop1R	+	-	-	-	+
Paenop2.1R	-	+	-	-	-
Paenop3aR	+	+	-	-	+
Paenop3bR	-	-	-	+	-
Paenop3cR	+	+	-	+	+
Paenop5R	+	+	-	+	+

Tab. C20: Ergebnisse der unterschiedlichen Primerkombinationen zur in vitro Amplifikation der 16S-rRNS-Operone von *Pb. polymyxa*
 +: Amplifikat wurde generiert
 -: kein Amplifikat wurde generiert

D. Diskussion

1 Konstruktion stammspezifischer Primer mittels MASH für diverse Bakterienstämme

Mit Hilfe der Mikrotiterplatten Ausschlussybridisierung wurden für unterschiedliche Bakteriengruppen stammspezifische Primer konstruiert.

Nach der Anreicherung potentiell spezifischer DNS-Fragmente wurden diese in einen Vektor kloniert (vgl. B 9.3) und einer Sequenzanalyse (vgl. B 11) unterzogen. Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit bereits bekannten Sequenzen, die in Datenbanken hinterlegt sind, verglichen (vgl. C 1.3; C 2.1 und C 3.1). Somit konnte in manchen Fällen nicht nur die Funktion des DNS-Bereichs (Strukturgen, ORF, oder nichtcodierend) bestimmt, sondern variable Bereiche des Fragments identifiziert werden. Dies erleichterte eine zielgerichtete Konstruktion von spezifischen Primern für diagnostische PCR-Systeme. Waren keine ähnlichen Sequenzen in den Datenbanken vorhanden, wurden die Primersequenzen zufällig gewählt, d.h. in den terminalen Bereichen des Fragments mit möglichst identischem GC-Gehalt (vgl. D 1.2).

In allen Fällen wurden die konstruierten Primerpaare auf ihre Spezifität überprüft. Wurde in einer PCR die DNS des Zielstammes amplifiziert und dabei ein Fragment der vorausberechneten Größe gebildet, und konnten nach einer PCR mit der DNS der in der Ausschlussybridisierung verwendeten Substrakturen und anderer Referenzstämme keine PCR-Produkte beobachtet werden, so wurden die für die PCR eingesetzten Primer als „spezifisch im Rahmen der getesteten Referenzstämme“ bezeichnet.

Es ist zu beachten, dass die spezifische Identifizierung bzw. Differenzierung eines Stammes durch die Bildung eines PCR-Produktes mit der richtigen, aus den Sequenzdaten des isolierten Fragmentes ermittelten, Größe definiert und gewährleistet ist.

1.1 Einstellung der Hybridisierungsbedingungen

Je nach Wahl der Hybridisierungsbedingungen kann man die Ausbeute an spezifischen DNS-Fragmenten beeinflussen. Wie bei allen Hybridisierungsverfahren ist die Schmelztemperatur der wichtigste Parameter. Die Schmelztemperatur (T_m) ist abhängig vom GC-Gehalt der DNS sowie beeinflussbar durch die Kationen- und Formamidkonzentration des verwendeten Hybridisierungspuffers. Sie kann nach Howley et al. (1979) wie folgt berechnet werden:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \log M + 0,41 \times \% \text{ GC} - 0,72 \times \% \text{ Formamid}$$

M: Molkonzentration der monovalenten Kationen im Puffer

Die Hybridisierungsstringenz wird letztendlich durch die gewählte Formamidkonzentration und der verwendeten Hybridisierungstemperatur bestimmt. Diese wird meist bei 25 °C unter der berechneten T_m als optimal angesehen. Egal, ob bei einer MASH oder bei der Methode des spezifischen DNS-Fischens, die Hybridisierungstemperatur wurde immer so niedrig wie möglich gewählt und blieb konstant. Die Stringenz wurde einzig und alleine über die Formamidkonzentration eingestellt. Durch den Gebrauch von Mikrotiterplatten können bei konstanter Hybridisierungstemperatur verschiedene Formamidkonzentrationen in den unterschiedlichen Kavitäten eingesetzt werden. So führt eine Erhöhung der Stringenz dazu, dass immer mehr Fragmente mit geringeren Unterschieden nicht mehr miteinander hybridisieren. Dies bedingt eine Steigerung der Anzahl der sogenannten spezifischen Fragmente im Überstand. Eine Erniedrigung der Stringenz hat das Gegenteil zur Folge. Es bilden sich immer mehr Hybride und es bleiben nur noch die spezifischen Fragmente im Überstand übrig, die die größten Unterschiede zu der immobilisierten DNS aufweisen. Die Stringenz lässt sich aber nicht beliebig senken, da die Ziel-DNS unter zu unstringenten Bedingungen schon in Lösung miteinander hybridisieren könnte und so nicht mehr an die immobilisierte Substrat-DNS binden kann.

In dieser Arbeit wurde immer als niedrigste Hybridisierungstemperatur $T_m - 25 \text{ °C}$ gewählt. Ausgehend von dieser Temperatur wurde dann die Stringenz durch Formamid langsam schrittweise erhöht. Die niedrigste Stringenz bei der Fragmente detektiert worden sind, wurde zur weitere Analyse verwendet. Es wurde angenommen, dass hier die spezifischen Fragmenten mit den größten Unterschieden zur immobilisierten DNS zu finden sind und je größer die Unterschiede, umso einfacher ist es stammspezifische Primer zu konstruieren, vor allem wenn man keine Referenzsequenzen hat.

Wie wichtig das Einstellen der Hybridisierungsbedingungen ist, zeigte sich bei Anwendung der Methode des „spezifischen DNS-Fischens“ als die unterschiedlichen Spacer von *Paenibacillus polymyxa* isoliert werden sollten (vgl. C 5). So konnte Spacer 1- und Spacer 2-DNS schon bei relativ niedriger Formamidkonzentration isoliert werden. Die entsprechenden Sequenzen weisen die größten Unterschiede zu den anderen Spacern auf. Erst bei höheren Formamidkonzentrationen konnten dann auch die restlichen 5 isoliert und sequenziert werden. Genauso muss man auch mit der Stringenz „spielen“, will man unterschiedliche Varianten eines Genes finden. Je höher die Stringenz desto geringer werden die Unterschiede der DNS sein, die an die immobilisierte bindet.

1.2 Kriterien für die Konstruktion stammspezifischer Primer und deren Anwendung

Da für die meisten mit MASH isolierten spezifischen DNS-Fragmente keine Referenzsequenzen in den Gendatenbanken gefunden wurden, konnten die stammspezifischen Primer nicht zielgerichtet konstruiert werden. Das heißt, man konnte etwaige Unterschiede nicht bewusst ausnutzen, um die Spezifität zu gewährleisten. Erst durch Austesten der Primer mit PCR bzw. Gradienten-PCR konnte die Spezifität gewährleistet werden. Dann sind sie aber immer nur im Rahmen der getesteten Stämme bzw. der bei der MASH verwendeten Subtraktor-Stämme spezifisch. Außerdem kann ein PCR-Nachweis stammspezifisch sein, auch wenn DNS von anderen Stämmen ebenfalls amplifiziert wird. In solchen Fällen gewährleistet die richtige, aus den Sequenzdaten des isolierten spezifischen Fragments, bestimmte Größe des gebildeten PCR-Produkts die Identifizierung.

Da die isolierten DNS-Fragmente in der Regel nicht größer als ca. 200 bp sind, wurden zur Konstruktion der Primer die terminalen Bereiche der isolierten Fragmente als Primersequenz ausgesucht. Des Weiteren muss der GC-Gehalt der gewählten Oligonukleotide beachtet werden, da stammspezifische PCR-Reaktionen oft unter sehr stringenten Bedingungen durchgeführt werden müssen, um eine Differenzierung zu gewährleisten. Deshalb sollten beide verwendeten Primer einen möglichst ähnlichen oder sogar identischen Schmelzpunkt haben. Die in dieser Arbeit entwickelten Primer haben in der Regel eine Länge von 18 Basen und einen GC-Gehalt um die 50 %.

Da in einer stammspezifischen PCR die Annealingtemperatur so eingestellt wird, dass die Anlagerung der Primer gerade noch möglich ist, wurde die maximale und damit für eine spezifische PCR optimale Bindungstemperatur stets mittels einer Gradienten-PCR mit der

DNS des Zielorganismus bestimmt. Diese Temperatur kann bis zu 10 °C über der nach Suggs et al. (1981) berechneten Schmelztemperatur des Oligonukleotid-Hybrids liegen.

2 Konstruktion stammspezifischer *Streptomyces*-Primer

Streptomyceten sind filamentöse Bakterien aus der Familie der Gram-positiven GC reichen Aktinomyceten. Sie sind vor allem in Böden weitverbreitet. Ähnlich wie Pilze zeigen sie auf festen Oberflächen eine komplexe Zelldifferenzierung. Nach dem Auskeimen der Sporen wächst zunächst ein stark verzweigtes Substratmycel heran. An dessen Oberfläche bildet sich bei Nährstoffmangel ein hydrophobes Luftmycel. Der Zellzyklus schließt sich, indem am Luftmycel Sporen abgeschnürt werden. Die ökologische Bedeutung der Streptomyceten liegt vor allem in der Kompostierung organischer Abfälle. Für diese Aufgabe steht ihnen eine Vielzahl extrazellulärer hydrolytischer Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen, Chitinasen Amylasen, Proteasen usw. zur Verfügung, die auch von biotechnologischem Interesse sind. Interessanter noch ist ihre Fähigkeit, eine nahezu unübersehbare Fülle an Sekundärmetaboliten zu bilden. Darunter fallen vor allem Antibiotika. Von etwa 6000 bekannten Antibiotika werden 4000 allein von Streptomyceten produziert wie etwa Erythromycin, Streptomycin, Tetrazyklin oder Vankomycin. Neben den Antibiotika werden eine Vielzahl weiterer Wirksubstanzen wie Cytotoxine, Immunsuppressiva, antivirale Stoffe, Fungizide, Herbizide usw. produziert. Wegen dieser Fähigkeiten spielen die Streptomyceten eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie (Baltz, 1998). Um dieses riesige Potenzial an Fähigkeiten unterzubringen, besitzen die Streptomyceten eine ungewöhnliche Genomstruktur. Sie besitzen ein lineares, etwa 8 Mb großes Chromosom mit etwa 7000 Genen. Damit haben sie sogar mehr Gene als *Sacharomyces cerevisiae* (circa 6000 Gene) (Goffeau et al., 1996).

Auf Grund ihrer Bedeutung für die Industrie, ist eine schnelle, einfache und zuverlässige Identifizierung bzw. Differenzierung der einzelnen *Streptomyces*-Arten und ihrer Mutanten sehr wichtig. So wurde versucht, ob es mit der Ausschlusshybridisierung in MTP möglich ist, auch für Streptomyceten stammspezifische Primer zu entwickeln. Dies wurde anhand von 3 Stämmen untersucht.

Bei den drei verwendeten Streptomyceten handelte es sich um Stämme einer nicht beschriebenen Art. Mit Hilfe dieser Stämme sollte ausgetestet werden wie hoch die Auflösung

der MASH bei nah verwandten Vertretern einer Gruppe mit einem hohen GC-Gehalt ist. Wie aus den Abb. C4 und Abb. C5 hervorgeht, war es kein Problem, für *Streptomyces* sp. B stamm- bzw. artspezifische Primer zu konstruieren. Die Zielregionen der Primer KlonB4V / KlonB4R bzw. KlonB4Ra befinden sich auf der 23S-rRNS. Diese Primer sind für die 23S-rRNS von *Streptomyces* sp. B spezifisch. Dies zeigt, dass es kein Problem war mittels MASH ein DNS-Fragment spezifisch, innerhalb der getesteten Stämme, für die Art *Streptomyces* sp. B zu isolieren. Es konnte aber auch ein 23S-rRNS Fragment spezifisch für die beiden Streptomyceten A und C isoliert werden. Mit den anhand der Sequenzdaten dieses Fragments konstruierten Primer KlonA4V / KlonAC23SR (vgl. Abb. C7) erhält man nur mit der DNS der Stämme A und C ein spezifisches Amplifikat. Wie die Abb. C6 und Abb. C7 zeigen gelang es jedoch nicht, zwischen *Streptomyces* sp. A und *Streptomyces* sp. C mit den bis dahin konstruierten Primern zu unterscheiden. Aus diesen Gründen wurde eine zweite MASH durchgeführt, in der nur die zwei Stämme A und C verwendet wurden, um ein eventuell spezifisches Fragment für einen der beiden Stämme zu isolieren. Durch das Weglassen von Stamm B, der weniger verwandt zu Stamm A und Stamm C zu sein scheint, bei der Ausschlussybridisierung wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, spezifische Fragmente für einen der beiden anderen Stämme zu erhalten.

Bei dieser MASH gelang es, ein Fragment spezifisch für *Streptomyces* sp. A anzureichern (vgl. C.1.4.1). Die Sequenzdaten dieses DNS-Fragments ergaben in keiner Datenbank eine Verwandtschaft zu einem bekannten Gen. Es konnte aber mit Hilfe der Sequenz ein Primerpaar, KlonA0_2V / KlonA0_2R, entwickelt werden, das eine Differenzierung zwischen *Streptomyces* sp. A und *Streptomyces* sp. C ermöglichte (vgl. Abb. C8). *Streptomyces* sp. B bildete mit diesem Primerpaar dagegen kein Amplifikat. Es konnte also mit der Ausschlussybridisierung ein *Streptomyces* sp. A spezifisches DNS-Fragment isoliert werden. Ein hoher GC-Gehalt scheint also kein Problem darzustellen, um mit diesem Verfahren spezifische Fragmente anzureichern.

3 Konstruktion pathovarspezifischer *Xanthomonas*-Primer

Die Gattung *Xanthomonas* beinhaltet entweder pflanzenpathogene Organismen oder solche die mit Pflanzen assoziiert sind. Die meisten Xanthomonaden bilden gelbliche, schleimige, glatte Kolonien. Das Exopolysaccharid Xanthan, verantwortlich für das Erscheinungsbild der Kolonien, ist typisch für diese Gruppe. Die Xanthomonaden sind bewegliche, gram-negative Stäbchen, die eine polare Geißel besitzen. Die Fettsäuren 11:0 iso, 11:0 iso 3OH und 13:0 iso 3OH sind charakteristisch für diese Gattung und ein sicheres Kriterium, um sie von anderen Bakteriengattungen zu differenzieren.

Die Gattung der Xanthomonaden ist in 20 Arten, welche eine Vielzahl von unterschiedlichen Pathovaren beinhaltet, unterteilt (Vauterin et al. 1995). Vor dieser Unterteilung war die Taxonomie der Xanthomonaden durch ein einzelnes phänotypisches Merkmal bestimmt, nämlich das der Wirtsspezifität. Das Pathovar wurde nach der Pflanze, von welcher die Erstisolierung erfolgte benannt.

Bis heute ist daher noch immer die Identifizierung der Xanthomonaden mittels Infektionsstudien eine der gebräuchlichsten Methoden. Außerdem können viele Pathovaren (über 66; Vauterin et al., 1995) noch immer keiner der 20 Arten zugeteilt und nur durch Infektionsversuche der entsprechenden Wirtspflanzen identifiziert werden.

Obschon die einzelnen Pathovaren meistens einen bestimmten Wirt infizieren, gibt es auch Pathovaren, die ein etwas breiteres Wirtsspektrum besitzen. Dies erschwert die Identifizierung der einzelnen Stämme erheblich. Außerdem ist die Differenzierung der einzelnen Pathovaren durch die gängigen Infektionsstudien zeitaufwendig und letztendlich nicht immer eindeutig.

Deshalb wurde versucht, für eine Auswahl von verschiedenen *Xanthomonas*-Arten und Stämmen pathovar-spezifische Primer zu konstruieren. Die Stämme kamen aus dem Bestand der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, kurz LBP (Freising, D).

3.1 Konstruktion *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* spezifischer Primer

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Gattung *Xanthomonas* um pflanzenpathogene Mikroorganismen, die beträchtlichem ökologischen und wirtschaftlichen Schaden anrichten können. Pflanzenpathogene Bakterien werden in zwei Gruppen unterteilt: tumorbildende und nekrotische Erreger (Alfano und Collmer, 2001). Tumorbildende Pathogene, wie der Name

bereits andeutet, verursachen Gewebewucherungen, wobei Organismen die nekrotisch wirken, das Absterben der Pflanze hervorrufen.

Schwarzfäulnis von Kreuzblütern, wie z. B. bei Kohl, verursacht durch *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson wird als eine der weltweit am häufigsten auftretenden Krankheiten bei Kreuzblütern betrachtet (Williams, 1980). Am schlimmsten betroffen ist die Pflanze *Brassica oleracea*. Die Kontrolle der Krankheit ist schwierig und es wird versucht, sie durch den Gebrauch von gesundem Pflanzenmaterial und die Eliminierung jeglicher Kontaminationsquellen zu unterbinden. Der Krankheitserreger ist durch das Saatgut übertragbar (Walker und Tisdale, 1920; Williams, 1980; Schaad, 1982). Sichere und zuverlässige Untersuchungen des Saatguts sind unabdingbar, um Präventivmaßnahmen zu ergreifen und den Samen vom Erreger zu befreien. Zu diesem Zwecke wurde bereits eine *X. c.* pv. *campestris* spezifische Sonde entwickelt, um den Organismus mittels Southernhybridisierung nachzuweisen (Shih et al., 2000).

Noch immer ist aber die Kultivierung des Erregers auf Selektiv-Medien die gebräuchlichste Methode, um *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Pflanzen-, Samen- und Bodenproben zu detektieren (Chun und Alvarez, 1983; Franken 1992; Fukui et al., 1994, Schaad und White, 1974a; Schaad und Donaldson, 1980). Das reicht aber nicht aus, um den Erreger eindeutig zu identifizieren. Eindeutige Erkenntnisse erhält man nur durch zeitaufwendige Infektionsversuche. Es wurde daher versucht, mittels Ausschlußhybridisierung in Mikrotiterplatten spezifische DNS-Fragmente für *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, zu isolieren und daraus spezifische Primer zu entwickeln, um *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nachzuweisen.

Wie die Tabelle C11 zeigt, gaben nur die DNS der drei *X. c.* pv. *campestris* Isolate LMG 568, PD587, und PD649 mit dem für dieses Pathovar spezifischem Primerpaar Xantho6.8V / Xantho6.8R ein Amplifikat. Bei allen anderen *Xanthomonas* Isolaten konnte kein PCR-Produkt generiert werden. Mit diesem neuentwickelten Primerpaar lässt sich *X. c.* pv. *campestris* eindeutig von den anderen getesteten *Xanthomonas*-Pathovaren unterscheiden. Die spezifische in vitro Amplifikation ist daher ein geeignetes Werkzeug, die zeitaufwendigen Infektionsversuche zu umgehen.

3.2 Konstruktion *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* spezifischer Primer

Die Symptome an Rucola, hervorgerufen durch *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*, erinnern stark an die des Falschen Mehltaus, was zu Diagnoseschwierigkeiten in der Praxis führt. Diese Probleme können nun durch Anwendung diagnostischer PCR vermieden werden. *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* kann mit dem Primerpaar Xantho4.6bV / Xantho4.6bR schnell und pathovar-spezifisch identifiziert werden (vgl. Abb. C10). Die zwei *X. campestris* Pathovare können ohne Probleme mit den entwickelten Primern, Xantho6.8V / Xantho6.8R und Xantho4.6bV / Xantho4.6R voneinander unterschieden werden (vgl. Tab. C11). Es ist also möglich, pathovar-spezifische Fragmente für *Xanthomonas* Stämme einer Art zu isolieren und zu deren Differenzierung zu verwenden. Das vereinfacht deren Nachweis bzw. Detektion um ein Vielfaches.

3.3 Konstruktion *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* spezifischer Primer

Bakterielle Krankheitserreger haben im Gartenbau sowie in der Landwirtschaft eine über die Jahre betrachtet zunehmende Bedeutung errungen. Im Zierpflanzenbau ist hier *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, der Erreger der Pelargonienwelke zu erwähnen. Bis 1995 gehörte dieses Pathovar noch der Art *X. campestris* an, wurde aber dann aufgrund DNS/DNS Hybridisierungen von Vauterin et al. (1995) einer eignen Art, nämlich *X. hortorum* zugeordnet. Es existieren RAPD-Primer, um dieses Pathovar zu identifizieren (Manulis et al., 1994).

Das in dieser Arbeit entwickelte Primerpaar Xantho1.7V / Xantho1.7R ermöglicht durch in vitro Amplifikation eine schnelle Identifizierung dieses Pathovars durch das Generieren einer spezifischen Bande bestimmter Größe. Von den getesteten *Xanthomonas* Isolaten wurde nur bei den *X. h. pelargonii* Pathovaren ein spezifisches PCR-Produkt gebildet (vgl. Tab. C11). Wie Abb. C 11 zeigt war es ebenfalls kein Problem, ein Amplifikat direkt aus den Zellen zu gewinnen. Durch diese Möglichkeit kann auf die DNS Isolierung verzichtet und Zeit gespart werden.

3.4 Konstruktion *Xanthomonas* pv. *lobelia* spezifischer Primer

Bei *Xanthomonas* pv. *lobeliae* handelt es sich um einen *Xanthomonas* Stamm der von *Lobelia erinus* *Richardii* isoliert wurde. Bei Befall zeigen die Blätter, beginnend an den Blattadern, eine Aufhellung und Vergilbung der gesamten Blattspreite. Teilweise ist dies im Anfangsstadium verbunden mit violetter Verfärbung entlang der Blattadern. Ausgangspunkt

der Symptome sind häufig die Blattstiele. Die Ausbreitung erfolgt zunächst entlang der Mittelrippe. Ausgehend vom Blattrand treten außerdem keilförmige Nekrosen der Interkostalfelder auf. Die Blätter werden nekrotisch und sterben dann völlig ab.

Der Pathovar wurde von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP) isoliert und charakterisiert. Zur Identifizierung der Bakterienisolate wurden die üblichen Standardmethoden (Schaad, 1980) von der LBP angewandt. Es wurden Pathogenitätstest sowie Reisolierungsversuche durchgeführt. Einen Vergleich der Kultureigenschaften und der physiologischen Leistungen der Bakterienisolate mit den Daten aus der Literatur (Bradbury, 1986) zeigte, dass der untersuchte Erreger der Art *Xanthomonas campestris* angehören soll. Diese Diagnose konnte ebenfalls durch Fettsäure-Analysen bestätigt werden. So wiesen sämtliche Isolate ein für *Xanthomonas campestris* typisches Fettsäure-Muster auf (Poschenrieder, pers. Mitteilung).

Da es über diese Bakteriose und den Erreger in der Literatur keinerlei Hinweise zu finden gibt, und aufgrund der zahlreichen Pathovars von *Xanthomonas*, musste noch geklärt werden, ob es sich bei dem Erreger um ein bekanntes oder ein neues Pathovar handelt. Zu diesem Zweck wurde versucht, mit MASH ein pathovarspezifisches Primerpaar zu entwickeln, mit dem anschließend durch PCR getestet werden kann, welche Pathovare ein PCR-Produkt bilden und welche nicht. Wie Tab. C 11 zeigt konnte aber nicht zwischen *X. pv. lobelia* und *X. pv. isotoma* differenziert werden. Daher wurde in einem nächsten Schritt versucht, für *X. pv. isotoma* pathovarspezifische Primer zu entwickeln.

3.5 Konstruktion *Xanthomonas pv. isotoma* spezifischer Primer

Isotoma axillaris, auch als *Laurentia axillaris* bekannt, ist eine Zierpflanzenart aus der Familie der *Campanulaceae*. Die Kultur von *Isotoma* ist jedoch seit Mai 2001 durch das akute Auftreten einer bisher unbekannt Krankheit gefährdet (Poschenrieder, pers. Mitteilung). Zahlreiche Pflanzen zeigten an Blättern und Sprossen Welke- und Nekrosesymptome. Bisweilen wurden auch Schleimabsonderungen festgestellt. Auf den Blütenblättern waren zusammenfließende, gelb-grüne Flecken mit weißen Höfen sichtbar. Schließlich starben einzelne Blütenblätter von der Blattspitze her ab. Die Kelchblätter verfärbten sich schwarz und allmählich verdorrte die gesamte Blüte. Es ging so weit, dass es im Juli 2001 zum totalen Zusammenbruch des ganzen Bestandes kam.

Die LBP konnte aus dem kranken Pflanzenmaterial regelmäßig und reichlich sehr einheitliche Bakterienisolate gewinnen. Diese konnten aufgrund ihrer phänotypischen und physiologischen Eigenschaften der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet werden. Eine endgültige Bestimmung der Bakterienisolate durch gaschromatographische Analyse der zellulären Fettsäuremethylester (FAME)-Profile mit dem Microbial Identification System (MIS, Microbial ID Inc., Newark, USA) war bislang nicht möglich, da es sich hier um eine *Xanthomonas*-Art handelt, die nicht in der „Vergleichsbibliothek“ TSBA 40 (Version 4.10 1998) für aerobe Bakterien vorhanden ist (Poschenrieder, pers. Mitteilung). Auf jeden Fall erwiesen sich einige Bakterienisolate als hochvirulent (Poschenrieder, pers. Mitteilung): drei Wochen nach der Inokulation waren die Versuchspflanzen völlig abgestorben.

Da dieser Erreger das erstmal von *Isotoma* isoliert worden ist und er noch keinem Pathovar zugeordnet werden konnte, wurde ebenfalls versucht pathovar-spezifische Primer zu konstruieren. Es konnte aber nicht, wie bereits mit dem für *X. pv. lobelia* spezifischen Primern, zwischen *Xanthomonas pv. lobelia* und *Xanthomonas pv. isotoma* differenziert werden.

3.6 Differenzierung zwischen *Xanthomonas pv. lobelia* und *Xanthomonas pv. isotoma*

Bei den beiden Stämmen *Xanthomonas pv. lobelia* und *Xanthomonas pv. isotoma* kam der Verdacht auf, dass es sich um ein und denselben Stamm handeln könnte. Infektionsversuche, durchgeführt von der LBP, ergaben, dass der von der Lobelie isolierte *Xanthomonas* Stamm ebenfalls die *Isotoma* Pflanze befällt. Da, wie bereits erwähnt, *Isotoma axillaris* der Familie der *Campanulaceae* angehört und *Lobelia erinus Richardii* zur Familie der *Lobeliaceae* und beide Familie nahe zueinander verwandt sind, lag der Schluss nahe, dass es sich um denselben Stamm handeln könnte.

Mit MASH sollte versucht werden, ob es möglich ist, zwischen den zwei Isolaten zu differenzieren oder ob die Annahme, dass es sich um denselben Stamm handelt, bestehen bleibt. Alle Primer, die konstruiert wurden, um zwischen den zwei Organismen zu unterscheiden, ergaben dasselbe Resultat. Entweder zeigten sowohl alle *Xanthomonas pv. lobelia* wie auch alle *Xanthomonas pv. isotoma* ein positives oder ein negatives Signal (vgl. Abb. C 13). Es wurden mehrere *Lobelia*- und *Isotoma*-Isolate von verschiedenen Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und getestet. Die DNS dieser Isolate ergaben immer dasselbe Resultat. Es konnte nicht zwischen den beiden Isolaten differenziert werden (vgl. Tab.C3). Eine Gradienten-PCR (vgl. Abb. C14, C14a) brachte ebenfalls keinen Unterschied

hervor. So zeigten alle entwickelten pathovar-spezifischen Primerpaare, sei es für *Xanthomonas* pv. *lobelia* oder für *Xanthomonas* pv. *isotoma*, immer dasselbe Verhalten. Entweder zeigten alle *Lobelia*- und *Isotoma*-Stämme ein positives Ergebnis oder aber alle ein negatives. Es konnte also kein spezifisches DNS-Fragment isoliert werden, das diagnostische Regionen zur Konstruktion pathovarspezifischer Primer für eines der beiden Isolate enthielt. Die Annahme, dass es sich bei den zwei Organismen um denselben Stamm handelt, konnte nicht widerlegt werden. Das heißt aber noch nicht, dass es sich wirklich um ein und denselben Stamm handelt. Es konnte lediglich kein pathovarspezifisches DNS-Fragment mit MASH isoliert werden, was eine Unterscheidung hätte zulassen können.

4 Konstruktion artspezifischer *Legionella*-Primer

Die Familie der Legionellaceen besteht aus nur einer einzigen Gattung: *Legionella*. Zur Gattung *Legionella* gehören mindestens 42 Arten (Adeleke et al., 2001; Riffard et al., 1998). Einige *Legionella*-Arten werden in sogenannte Serotypen unterteilt. Für *Legionella pneumophila* existieren bis zu 15 Serotypen. Die anderen *Legionella*-Arten beinhalten bislang nie mehr als zwei Serotypen.

Legionella pneumophila wurde erstmals 1976 bei einem Legionelloseausbruch in Philadelphia isoliert. Bei Legionellosen handelt es sich um Krankheiten, die durch *Legionella*-Arten verursacht werden. Es werden zwei Arten von Legionellosen bei Menschen beobachtet: die Legionärskrankheit und das Pontiac-Fieber. Bei dem Ausbruch in Philadelphia spricht man von der Legionärskrankheit. Hier trat in einem Hotel, wo ein Veteranentreffen von ehemaligen US Soldaten stattfand, eine schlimme Pneumonie auf, für die Legionellen verantwortlich waren (Fraser et al., 1977). In einer Reihe von Studien wird berichtet, dass 1-13 % aller Pneumonien durch *Legionella* verursacht werden (Brome 1983). Die Zahl der Erkrankungen verursacht durch diese Erreger ist, durch die schwierige Unterscheidung dieser Krankheit von anderen Pneumonien und Influenza-Erkrankungen, wahrscheinlich noch um einiges größer. Zahlreiche Fälle bleiben unerkannt. 15-20% der Erkrankten sterben an dieser Form der Lungenentzündung.

Das Pontiac-Fieber ist bei weitem nicht so schlimm. Es wurde noch kein Todesfall beobachtet. Im Gegensatz zur Legionärskrankheit handelt es sich hier um keine Pneumonie. Die Infektion ist selbst-limitierend und klingt nach 48 Stunden ab.

Das natürlich Vorkommen der Legionellen, wenn auch nur in geringen Mengen, ist in Flüssen und Seen. Speziell aquatische Biofilme sind die hauptsächliche ökologische Nische der *Legionella*-Arten. Sowohl eine erhöhte Wassertemperatur, anorganische und organische Bestandteile des Wasser als auch das Vorkommen von Protozoen spielen eine Schlüsselrolle fürs Wachstum und bei der Ausbreitung der Legionellen (Fliermanns et al., 1981). Die Erfüllung dieser Bedingungen erklärt möglicherweise das erhöhte Vorkommen von Legionellen in künstlichen Wasserkreisläufen. Die größte Anzahl von Legionellen konnte aus 30-40 °C warmen Wasserproben isoliert werden (Schulze-Röbbbecke et al., 1987). Legionellen werden durch das Einatmen kontaminierter Aerosole, welche aus Klimaanlage, Springbrunnen, Kühltürmen, Duschköpfen usw. stammen können, übertragen (Atlas, 1999).

Wie bereits erwähnt, spielt das Vorkommen bestimmter Protozoen sowohl in natürlichen auch als in künstlichen Umgebungen eine ausschlaggebende Rolle für das Wachstum der Legionellen (Fields, 1996). So wurden meisten *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, und *Naegleria* Protozoen aus *Legionella* kontaminiertem Wasser isoliert. Andere Protozoen Arten wie *Saccamoeba*, *Vexillifera* und *Platyamoeba* wurden ebenfalls in Zusammenhang mit Legionellen gebracht. *Tetrahymena pyriformis* scheint eine wichtige Rolle für *Legionella longbeachae* zu spielen. *Legionella longbeachae* konnte auch aus Bodenproben isoliert werden (Fields, 1996; Steele und McLennan, 1996). Da einige klinisch relevante pathogene Stämme wie z.B. *Listeria*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Chlamydia* usw. mit Protozoen assoziiert werden, wird angenommen, dass letztere eine wichtige Rolle für pathogene Organismen als Reservoir spielen (Steinert et al., 1998; Brown und Barker, 1999; Fritsche et al., 1999; Landers et al., 2000). Sie bieten den Legionellen nicht nur Nährstoffe, sondern auch Schutz vor schlechten Umweltbedingungen. So schützen besonders die Cysten von *Acanthamoeba* die Bakterien vor hohen Temperaturen, Desinfektionsmitteln und Austrocknung (Barker et al., 1992; Kilvington und Price, 1990).

Durch unterschiedliche Versuche konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen zwischen Legionellen und Protozoen zum Infektionsprozess beitragen (Brieland et al., 1997). Inwiefern aber die Interaktion einer bestimmten Legionellenart mit einem spezifischen Protozoen-Wirt Auswirkungen auf die Virulenz bzw. den Verlauf der Krankheit haben, konnte noch nicht geklärt werden. Mit dem spezifischen „DNS-Fischen“ könnte man, vorausgesetzt man weiß welche Gene verantwortlich für den Infektionsprozess der Protozoen sind, in allen Legionellenarten nach diesen Genen bzw. Varianten dieser Gene screenen.

Auf Grund der nicht eindeutigen Diagnose von Legionellose und der Tatsache, dass die Isolierung und zuverlässige Kultivierung von Legionellen auf Selektivmedien mühsam ist, überdies Legionellen sogenannte „viable but not culturable“ Zellen bilden können, die erst nach Aufnahme von Protozoen wieder in einen kultivierbaren Zustand übergehen (Hussong et al., 1987; Paszko-Kolva et al., 1992, Steinert et al., 1997) ist es notwendig, einfache und eindeutige Nachweise auf molekularer Ebene zu entwickeln. Es gibt Studien bei denen die unterschiedlichen *Legionella*-Arten mittels RAPD (Lo Presti et al., 1998) oder auf Grund der unterschiedlichen Längen der 16S-23S rDNS Spacer (ISR-PCR) (Riffard et al., 1998) differenziert werden. Bei diese beiden Methoden werden Bandenmuster generiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Sowohl die Reproduzierbarkeit als auch die eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse sind nicht eindeutig und unterscheiden sich von Labor zu Labor. Eine schnelle und sichere Detektion von *Legionella pneumophila* ist mit FISH (fluorescence in situ hybridization) mit einer spezifischen gegen die 16S-rRNS gerichteten Sonde möglich (Grimm et al., 1998). Die Auflösung der 16S-rDNS ist aber nicht immer hoch genug, um die unterschiedlichen Arten zu differenzieren. So wurden in dieser Arbeit mittels Ausschlußhybridisierung art-spezifische Primer für *Legionella pneumophila*, *Legionella longbeachae*, *Legionella hackeliae* und LLAP 10 entwickelt. So kann mit einer einfachen PCR ein eindeutiges Ergebnis produziert und reproduziert werden.

4.1 Konstruktion *Legionella pneumophila* Corby spezifischer Primer

1996 im August und Dezember gab es in einem Gewerbegebiet in Corby, Northamptonshire zwei Ausbrüche der Legionärskrankheit. Beide Male konnten *Legionella pneumophila* serogroup 1 diagnostiziert werden. Es wurde aus verschiedenen Räumlichkeiten vom entsprechenden Gelände sowie Proben aus Klimaanlage entnommen aus denen *Legionella pneumophila* isoliert werden konnte.

Die für *Legionella pneumophila* Corby spezifischen Primer wurden im Konsiliarlaboratorium für Legionellen (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden) auf ihre Spezifität getestet. Wie Tab. C17 zeigt, erfasst das Primerpaar legio1.9V / legio1.9R alle 25 getesteten *Legionella pneumophila* Stämme. Das spezifische PCR-Produkt hat die richtige Fragmentgröße sowie die richtige Sequenz. Die DNS der Stämme *L. geestiana*, *L. jamestownensis*, *L. santacrucis* und *L. wadsworthii* ergeben auch ein Amplifikat. Sie können trotzdem von den *L. pneumophila* Stämmen problemlos differenziert werden, da die Größe des Amplifikates nicht der Länge des spezifischen PCR-Produkts entspricht (vgl. Tab. C12).

Somit erwies sich die Oligonukleotide legio1.9V / legio1.9R als ein zuverlässiges Primerpaar zur Differenzierung der *L. pneumophila* Stämmen.

4.2 Konstruktion *Legionella longbeachae* spezifischer Primer

1980 wurden erstmals die zwei einzigen Serovare von *Legionella longbeachae* beschrieben (Bibb et al., 1981; McKinney et al., 1981). Die zwei Serovare können durch „direct fluorescent antibody staining“ unterschieden werden. 10%-15% der durch Legionellen, aber nicht durch *Legionella pneumophila*, verursachten Pneumonien werden durch *Legionella longbeachae* serogroup 1 verursacht.

In Australien traten die meisten und schlimmsten Lungenentzündungen verursacht durch *Legionella longbeachae* auf (Cameron et al., 1991). Es traten aber auch Infektionen mit *Legionella longbeachae* in Ländern wie Neuseeland, Schweden, Deutschland; Japan, Dänemark, Kanada und den Niederlanden auf (Cameron et al., 1991; Koide et al, 1999; van't Hullenaar, 1996).

Obschon *Legionella longbeachae* aus Wasser isoliert werden konnte, ist das jedoch nicht die bevorzugte ökologische Nische des Organismus. *Legionella longbeachae* konnte in Australien hauptsächlich aus kommerziell erhältlicher Blumentopferde isoliert werden, wo das Bakterium lange überleben kann (Steele et al, 1990).

Es ist genau so wenig über die Virulenz von *Legionella longbeachae* bekannt (Neumeister et al., 1997; O'Connell et al., 1996) wie über die Faktoren die zur Pathogenität beitragen. Die Symptome ähneln denen von *Legionella pneumophila* serogroup 1 und der Krankheitsverlauf ist ähnlich schlimm (Doyle et al., 1998). Um *L. longbeachae* von *L. pneumophila* und anderen *Legionella* Arten zu unterscheiden, wurden mehrere *L. longbeachae* spezifischen Primer entwickelt (vgl. Tab. C13). Die Primer legio 2.4V / legio2.4R, legio2.7V / legio2.7R und legio2.9V / legio2.9R wurden in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für Legionellen (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden) getestet. Die drei Primerpaare erwiesen sich als *Legionella longbeachae* spezifisch (vgl. Tab. C17). So wurde nur mit der DNS der 16 getesteten *Legionella longbeachae* Stämmen das spezifische Amplifikat generiert. So scheinen die mittels MASH isolierten DNS-Fragmente (vgl. Tab C.13) spezifisch für *L. longbeachae* zu sein. Mit den drei entwickelten Primerpaare kann *Legionella longbeachae* ohne weiteres problemlos von mehr als 50 *Legionella* Stämmen differenziert werden und somit sicher identifiziert werden.

4.3 Konstruktion *Legionella hackeliae* spezifischer Primer

Wie bereits erwähnt besteht die Gattung *Legionella* aus 42 Arten. Neunzehn Arten wurden als humanpathogen eingestuft, die entweder die Legionärskrankheit oder das Pontiac-Fieber auslösen. Zu diesen pathogenen Arten gehört ebenfalls *Legionella hackeliae*. *Legionella hackeliae* ist ebenfalls in zwei Serovare, 1 und 2, unterteilt. *Legionella hackelia* wurde erstmals 1981 bei einer bronchialen Biopsie bei einem Patienten mit Lungenentzündung von Meredith Hackel isoliert. So bekam die Art auch den Namen ihres Entdeckers (Brenner et al., 1985).

Anhand der Sequenzdaten der für *Legionella hackeliae* isolierten DNS-Fragmente (vgl. Tab C14) wurden drei Primerpaare konstruiert. Die Primer legio4.3V / legio4.3R und legio4.10V / legio4.10R erwiesen sich als spezifisch (vgl. Abb. C17).

4.4 Konstruktion LLAP 10 spezifischer Primer

Ein obligat intrazellulärer bakterieller Parasit wurde aus einigen freilebenden Amöben, die sowohl im Boden als auch im Wasser vorkommen können isoliert. Der Parasit infiziert den Wirt durch Phagozytose und überlebt in den Phagosomen. Er ist gegen die bakteriolytischen Enzyme des Wirts resistent. Nach dem die Parasiten das Phagosom in Zytoplasma verlassen haben, verursachen sie die Lyse der Wirtszelle. 1991 wurde das Bakterium der Gattung *Sarcobium* und genauer der Art *Sarcobium lyticum* zugeteilt (Drozanski, 1991) Aber bereits ein Jahr später wurde durch vergleichende 16S-rRNS Sequenzanalyse gezeigt, dass *Sarcobium lyticum* am nächsten zu anderen *Legionella*-Arten verwandt ist, die auch aus Amöben isoliert wurden (Springer et al., 1992). 1993 kreierte Rowbotham den Namen „*Legionella*-like amoebal pathogens“ abgekürzt LLAP und nannte so alle Bakterien, die *Legionella* ähnliche Infektionen bei Amöben hervorrufen, aber nicht auf Medien kultiviert werden können (Rowbotham, 1993). Diese Tatsache macht es umso wichtiger, mit anderen molekularbiologischen Methoden diese Bakterien nachzuweisen. Zu diesem Zwecke wurden für LLAP 10 ein stammspezifisches Primerpaar entwickelt, umso unabhängig von Kultivierungsmethoden diesen Organismus spezifisch nachzuweisen (vgl. C 3.2.4).

5 Gezielte Isolierung und Identifizierung von Genen

Gene, verantwortlich für die Pathogenität bzw. Virulenz von Mikroorganismen können zusammen in sogenannten Pathogenitätinseln lokalisiert sein (Hacker und Kaper, 2000; Perna et al, 1998). Diese Bereiche können einen etwas geringeren GC-Gehalt haben als der durchschnittliche GC-Gehalt der gesamten chromosomalen DNS. Solche Regionen, mit unterschiedlichem GC-Gehalt im Genom sind oft mit genetisch mobilen Elementen assoziiert und somit auch für Prozesse wie den horizontalen Gentransfer geeignet (Eisen, 2000; Koonin et al., 2001; Ochman et al, 2000). Durch horizontalen Gentransfer können Gene, verantwortlich für eine spezifische ökologische Adaption oder für neue Fähigkeiten, wie z.B. Pathogenität bzw. Wechselwirkungen zwischen Wirt und Organismus, transferiert werden (Jackson et al., 1999; Nishi et al., 2000; Sullivan et al., 1998). Auf Grund des geringeren GC-Gehalts sollte es möglich sein, mit Ausschlussybridisierung solche Gene anzureichern.

Hat man nun ein Gen identifiziert, kann man mittels der Methode des spezifischen DNS-Fischens (vgl. B 14.2) andere Organismen nach Präsenz dieses Gens bzw. Varianten von diesem Gen untersuchen. Somit kann man die zeitaufwendige vergleichende Genomsequenzierung umgehen. Es sollte mit diesem Verfahren versucht werden, für die *Xanthomonaden* und *Legionellen* Gene anzureichern, die eventuell eine Rolle bei den Wechselwirkungen Bakterium-Wirt spielen.

Bei vielen *Xanthomonas* Arten können die Stämme bzw. Pathovaren nur aufgrund ihrer Wirtspflanze eindeutig identifiziert werden. Diese Wirtsspezifität setzt auf molekularer Ebene Unterschiede in bestimmten Genen voraus. An Stelle, von aufwendigen Genomsequenzierungen an verschiedenen Pathovaren und der Suche nach pathovar-spezifischen Unterschieden, wird mittels MASH versucht, Genfragmente, die verantwortlich für diese Wirtsspezifität sind, zu isolieren und zu identifizieren. Anschließend kann man mit diesen Genen oder Fragmenten dieser Gene nach Varianten in anderen Organismen, die entweder zur selben Art gehören oder denselben Wirt befallen, screenen. Ebenfalls sind die Wechselwirkungen zwischen *Legionella* und deren Wirtsprotozoen bzw. den Makrophagen noch nicht ganz geklärt. Vielleicht können also mit dieser Methode neue Gene, die wichtig für dieses Verhalten sind, identifiziert werden.

5.1 Methoden zur gezielten Isolierung und Identifizierung von Genenfragmenten

Mit MASH kann man spezifische Fragmente für die entsprechenden Stämme isolieren und anreichern. Diese Fragmente, gut geeignet zur Konstruktion stammspezifischer Primer, sind aber in der Regel zu klein, ca. 150-200 bp, um eine sinnvolle Datenbankanalyse durchführen zu können. Somit ist meistens die Annotation der isolierten DNS-Fragmente nicht möglich. Man kann keine Aussagen darüber treffen, zu welchem spezifischen Gen oder Pathogenitätsfaktor dieses Fragment gehört. Es wäre also interessant, größere Fragmente ca. 1000 bp und mehr zu isolieren, auf denen sich das kleinere mittels MASH gefundene, spezifische Fragment befindet. So würde man längere Sequenzen erhalten, was eine genauere, sinnvolle Datenbankanalyse ermöglicht.

Es wurden zwei Methoden entwickelt bzw. getestet, um das Ziel größere Fragmente zu isolieren und somit mehr Informationen zu erhalten. Bei der ersten Methode, random and limited PCR (RL-PCR), handelt es sich um eine abgewandelte Form einer Standard PCR die in unserem Labor entwickelt wurde (Richter und Ludwig, unveröffentlicht). Die zweite Methode ist eine Kombination aus reverser Hybridisierung und MASH und wird in Mikrotiterplatten durchgeführt. Ausgangspunkt bei beiden Methoden sind die zuvor konstruierten, spezifischen Primer.

5.1.1 RL-PCR

Die RL-PCR stellt eine abgewandelte Form einer Standard-PCR (vgl. B.9.2) dar. Der auffälligste Unterschied ist, dass bei der RL-PCR nur ein Primer zum Einsatz kommt. Abb. B2 zeigt eine schematische Darstellung einer RL-PCR. Die ersten 30 Zyklen finden unter sehr stringenten Bedingungen statt, so dass der Primer nur an die Zielsequenz bindet und somit die Polymerase unerschiedlich lange Einzelstränge synthetisieren kann. Anschließend folgt ein unstringenter Zyklus, wobei der Primer die Möglichkeit hat, unspezifisch an die zuvor synthetisierten Einzelstränge zu binden und diese dann komplementiert werden können. Nach diesem Zyklus kann der eingesetzte Primer dann sowohl als Vorwärts- wie auch als Rückwärtsprimer fungieren. Die letzten 30 Zyklen finden dann unter Standard-Bedingungen statt.

Wie auf dem Gelbild von Abb. B2 zu erkennen ist erhält man mehrere unterschiedlich lange Fragmente pro PCR-Reaktion. Das erklärt sich daraus, dass die Polymerase während den ersten 30 Zyklen unterschiedlich lange Einzelstränge synthetisiert. Die einzelnen Stränge

unterscheiden sich bloß in ihrer Länge. Wie man aus dem Gelbild noch entnehmen kann haben die verschiedenen Fragmente eine Länge von mindestens ca. 1000 bp. Diese PCR-Produkte können nun zum Sequenzieren verwendet werden.

Ein Vorteil der RL-PCR ist, dass man die PCR sowohl mit einem Vorwärts- als auch mit dem Rückwärtsprimer durchführen kann, um so einen großen Bereich der genomischen DNS zu beiden Seiten des bekannten (mittels MASH isolierten) Fragmentes amplifizieren und sequenzieren zu können.

5.1.2 Spezifisches DNS-Fischen

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination aus reverser Hybridisierung (Behr et al., 2000) und MASH. Wiederum kommen hier die zuvor mittels MASH konstruierten spezifischen Primer zum Einsatz. Diese werden wie bei einer reversen Hybridisierung (Behr et al., 2000) in der Mikrotiterplatte (MTP) immobilisiert.

Um nun größere Fragmente als mit der üblichen MASH-Methode zu isolieren, wird die genomische DNS mit einem Restriktionsenzym verdaut, welches die DNS nicht häufig schneidet. Während bei der MASH das Enzym SAU 3A verwendet wurde (Restriktionsstelle von 4 Basen), wurde nun mit Bam HI geschnitten (Restriktionsstelle von 6 Nukleotiden). Die so verdaute DNA wurde dann mit den Adaptoren ligiert (vgl. B 8.2), anschließend amplifiziert (vgl. B 9.2) und mit den in der MTP immobilisierten spezifischen Sonden hybridisiert. Abb. B1 zeigt eine schematische Darstellung der entwickelten Methode.

Nach der Hybridisierung erfolgen die stringenten Waschschrte, wobei die Stringenz durch verschiedene Formamidkonzentrationen eingestellt wurde. Es sollten nach den Waschschrten nur noch die Fragmente an die immobilisierten Sonden gebunden sein, welche die genaue Zielsequenz bzw. das zuvor mittels MASH isolierte spezifische Fragment, auf dem sich die Zielsequenz befindet, tragen. Anschließend erfolgen ein Denaturierungsschritt und eine PCR mit dem entnommenen Überstand. Das Gelbild in Abb. B3 zeigt, dass eine Bande mit einem entsprechenden DNS-Fragment angereichert werden konnte. Diese wurden anschließend sequenziert.

Die Sequenzierung ergab bei beiden Methoden dasselbe Resultat. Mit der RL-PCR erhält man einen noch größeren Bereich zum Sequenzieren als mit dem spezifischen DNS-Fischen. Die

erhaltenen Fragmente waren in allen Fällen aber bei beiden Methoden groß genug, um Sequenzen zu erhalten, die eine sinnvolle Datenbankanalyse ermöglichen. Die spezifischen Primer, die auf den mittels MASH isolierten Fragmenten konstruiert wurden, werden sowohl als spezifische PCR-Primer wie auch als Sequenzier-Primer, als spezifische Sonden und als RL-PCR-Primer eingesetzt. So kann man, ausgehend von dem mit MASH isolierten spezifischem Fragment, einen größeren Bereich um dieses DNS-Fragment erhalten und analysieren und so unter Umständen spezifische Gene wie zum Beispiel Pathogenitätsfaktoren finden und die Primer nicht nur zur Identifizierung des entsprechenden Stammes nutzen.

5.2 Gene von *Xanthomonas campestris* Stämmen

Bei *Xanthomonas* treten auf der chromosomalen DNS Bereiche mit unterschiedlichem GC-Gehalt auf. So weisen bestimmte Regionen nur einen GC-Gehalt von 41 % auf, während der durchschnittliche GC-Gehalt von *Xanthomonas* bei 64 % liegt (Van Sluys et al., 2002). Das Typ IV Sekretionssystem, welches eine nicht unerhebliche Rolle bei der Pathogenität spielt, kommt z.B. in Regionen mit niedrigerem GC-Gehalt vor. Auf grund des niedrigeren GC-Gehalts sollte es möglich sein, solche Bereiche mit MASH, unter Benutzung verschiedener Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer, zu isolieren und zu identifizieren.

So konnte z.B. ein Genfragment von *X. c. pv. raphani* mit einem GC-Gehalt von ca. 54% isoliert werden, welches dem virB Operon angehört (vgl. G 2). Bei *X. c. pv. campestris* konnte ein anderes Genfragment, welches der Typ 4 prepilin Leaderpeptidase entspricht angereichert werden (vgl. G 3).

5.2.1 VirB Operon

Wie bereits erwähnt wurde mittels MASH ein DNS-Fragment, welches dem virB Operon angehört, isoliert. Das virB Operon ist ein Sekretionssystem vom Typ IV. Sekretionssysteme spielen eine wichtige Rolle bei Wechselwirkungen zwischen Wirt und Erreger. Sie ermöglichen z. B. den Transport bakterieller Proteine zur Wirtszelle. Es gibt 5 verschiedene Sekretionssysteme (Typ I-V) welche auf Grund ihrer Proteine eingeordnet werden (Finlay und Falkow, 1997; Harper und Silhavy, 2001; Lee und Schneewind 2001).

So sind die Typ I Sekretionssysteme zuständig für den Export von Toxinen wie Hämolysin, Cyclolysin und Rhizobiocin. Charakteristisch für diesen Typ von Sekretionssystem sind die ABC (ATP-binding-casette) Proteine. Sekretionssysteme vom Typ II kommen allgemein in

gram-negativen Bakterien vor. Sie sind für den extrazellulären Export einer Vielfalt von Proteinen wie z.B. extrazelluläre Enzyme, Proteasen, Toxine und Virulenzfaktoren verantwortlich. Im Falle von *Xanthomonas* spielt das Typ III Transportsystem die vielleicht wichtigste Rolle in Bezug auf die Pathogenität (Alfano und Collmer, 1997). Die Hauptfunktion des Typ III Sekretionssystems ist es, Effektorproteine durch die bakterielle Cytoplasmamembran in die pflanzliche Wirtszelle zu transportieren (Lindgren 1997). Das virB Operon wurde erstmals bei *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben und war ausschlaggebend fürs Verständnis von Struktur und Funktion des Typ IV Sekretionssystems (Dessaux et al., 1998; Kado, 2000; Zupan et al., 2000). Dieses System übernimmt den Transport von Makromolekülen in die Wirtszelle. Das Typ V Sekretionssystem beinhaltet Gene für oberflächenassoziierte Adhäsine. Hierbei handelt es sich um Autotransporter welche für die Adhäsion an Epithelzellen wichtig sind (Henderson et al, 1998).

Das virB Operon besteht aus 11 Genen (virB1-11). Alle diese Gene, mit Ausnahme von virB1, sind absolut notwendig für die Virulenz von *Agrobacterium tumefaciens* (Berger und Christie, 1994). Das Ausschalten von virB1 hatte eine attenuierte Virulenz zur Folge während das Inaktivieren der anderen Gene den Infektionsprozess gänzlich zum Erliegen bringt. Das virB Operon von *Xanthomonas* ähnelt in der Struktur denen von *Bordetella pertussis* (Weiss et al., 1993) und *Brucella suis* (O'Callaghan et al., 1999). Bei *B. pertussis* und *B. suis* handelt es sich ebenfalls um ein Sekretionssysteme vom Typ IV, welche eine wichtige Funktion bei der Virulenz haben. So ist das Operon z.B. im Falle von *B. pertussis* für die Sekretion des Pertussistoxin verantwortlich. Da das virB Operon und seine homologen Operone sowohl bei *A. tumefaciens* als auch bei anderen pathogenen Mikroorganismen eine wichtige Rolle für die Virulenz bzw. die Pathogenität haben, darf angenommen werden, dass das auch bei den pflanzenpathogenen Xanthomonaden der Fall ist.

Das mit der MASH für *X. c. pv. raphani* isolierte DNS-Fragment ist ein Teil des virB 11 Gens. Bei virB 11 handelt es sich um eine ATPase die wahrscheinlich eine Rolle bei der Biogenese von Typ IV Sekretionssystemen spielt (Yeo et al, 2000). virB11 ATPasen könne aber auch noch andere Funktionen haben: sie können Bestandteile von Typ II Sekretionssystemen sein; andere virB11 ATPasen spielen beim Zusammenbau von Fimbrien bzw. Pili eine Rolle; wiederum andere bei DNS-Aufnahmemechanismen und schließlich wird angenommen, dass einige bei der Beweglichkeit von Bakterien eine Funktion erfüllen. Auf Grund dieser verschiedenen Funktionen, ist es nicht verwunderlich, dass die virB11 Familie die größte von

allen *virB* Familien ist. Es wurden bereits 89 homologe Sequenzen identifiziert (Thien und Milton, 2001). So wurden *virB11* Homologe sowohl in einigen gram-positiven Bakterien als auch bei Archaeabakterien gefunden. Das *virB11* Gen ist das einzige aus dem *virB* Operon, das in einem breiten Spektrum von prokaryotischen Taxa vorkommt. (Thien und Milton, 2001).

Die für *X. c. pv. raphani* erhaltene Sequenz wurde mit anderen *Xanthomonas virB11* Sequenzen verglichen (vgl. Abb. C 4.1). So wies das *VirB11* Gen von *X. c. pv. raphani* mit dem von *X. axonopodis pv. citri* nur eine Identität von 84 % und mit dem von *X. c. pv. campestris* sogar nur von 80 % auf (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Auf Grund dieser Resultate und dem ubiquitären Vorkommen scheint das *virB11* Gen sich gut zu eignen, um sowohl die einzelnen *Xanthomonas*-Arten als auch die Pathovaren der einzelnen Arten zu differenzieren, wie z. B. *X. pv. lobelia* von *X. pv. isotoma*. Es wäre auch interessant zu erforschen, inwiefern das *VirB* Operon eine Rolle bei der Wirtsspezifität der *Xanthomonaden* spielt, da es bereits innerhalb *Xanthomonas* so große Unterschiede bei den *virB11* Genen gibt. Auf jeden Fall konnte das Vorhandensein des *virB 11* Gens bei den in dieser Arbeit verwendeten *Xanthomonas* Isolaten durch Hybridisierung mit Polynukleotid Sonden nachgewiesen werden (Zwirglmaier, 2003).

5.2.2 Typ IV pre-pilin Leader Peptidase

Die Rolle von Fimbrien oder Pili beim Infektionsprozess wurde bereits für Organismen wie *E. coli*, *H. pylori*, *H. influenza* und *B. pertussis* unter anderem ausführlich beschrieben (Fernandez et al., 2000). Inwiefern diese Oberflächenstrukturen eine wichtige Rolle bei der Virulenz von pflanzenpathogenen Organismen spielen, ist noch nicht geklärt (Romantschuk, 1992). Der einzige pflanzenpathogene Mikroorganismus, für den gezeigt werden konnte, dass die Bindung an pflanzliche Oberflächenrezeptoren wichtig für die Virulenz ist, ist bei *Agrobacterium tumefaciens* (Denny, 1995; Sheng et al., 1996). Für *Xanthomonas campestris pv. hyacinthi* konnten Typ IV Fimbrien isoliert werden und nachgewiesen werden, die an die Stomata von Hyacinth-Blättern binden (van Dorn et al., 1994). Es wird angenommen, dass diese Fimbrien eine Rolle beim Eintritt des Bakteriums in die Wirtspflanze spielen könnten. Im Falle von *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* und *Pseudomonas syringae pv. tomato* sind die Typ IV Pili eher für die Zell-zu-Zell Aggregation zuständig und zum Schutz vor Stresssituationen vorhanden, als dass sie notwendig für die Adhäsion an die Wirtspflanze oder deren Kolonisation wären (Ojanen-Reuhs et al., 1997; Romantschuk, 1992).

Für *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* konnte mit der Methode des spezifischen DNS-Fischens die Typ IV pre-pilin Leader Peptidase isoliert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Typ IV pre-pilin Leader Peptidase von *Xanthomonas* sowohl notwendig für die Proteinsekretion als auch für die Biogenese der Typ IV Pili ist (Hu et al., 1995). Da diese Pili für verschiedene human- und tierpathogene Organismen wichtige Virulenzfaktoren sind und eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an die Wirtsepithelzellen spielen (Strom et al., 1993), ist es durchaus interessant zu klären, was für eine Rolle diese Pili bei Bakterium-Pflanze-Wechselwirkungen spielen und inwiefern sie beim Infektionsprozess ausschlaggebend sind.

5.3 Gene von *Legionella*-Arten

Für *Legionella pneumophila* Corby konnte ein Gen, das ähnlich zum *fliF* Gen von *Pseudomonas aeruginosa* ist, isoliert und identifiziert werden. Das *fliF* Genprodukt, der MS-Ring, ist in die Zytoplasmamembran eingebettet (Macnab, 1992). Eine *Pseudomonas aeruginosa* Mutante, defekt in diesem Gen, zeigt einen gleichzeitigen Verlust von Motilität und Fähigkeit zur Adhäsion an Schleimhäute (Arora et al., 1996).

Die Rolle der Motilität beim Infektionsprozess oder beim Überleben von Legionellen in ihrer aquatischen Umgebung ist noch nicht geklärt (Rowbotham, 1986). So sind die Mikroorganismen in der protozoologischen Wirtszelle nicht beweglich, während sie aber bei einem späteren Infektionsstadium und bei der Zellyse ihr Flagellum ausbilden und sehr beweglich sind (Byrne et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein vom Flagellum bei *Legionella pneumophila* eine wichtige Rolle im frühen Infektionsstadium von eukaryotischen Wirtszellen spielt (Dietrich et al., 2001). So erleichtert das Flagellum den ersten Kontakt des Mikroorganismus mit der Wirtszelle und löst, auf noch ungeklärte Weise, den Aufnahmeprozess in die Wirtszelle aus. Es ist allgemein bekannt, dass Oberflächenstrukturen wie z. B. Pili, Lipopolysaccharide oder Flagellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenität bzw. beim Überleben von Mikroorganismen in ihrer Umgebung spielen. Es wurde bereits für mehrere Bakterienstämme gezeigt, dass Einschränkungen in ihrer Beweglichkeit Auswirkungen auf die Virulenz hatten. So waren z. B. der Infektionsmechanismus gestört oder das Anheften an die Wirtszelle kam erst gar nicht zustande (Chesnokova et al., 1997; Feldmann et al., 1998; Ott et al., 1991). Welche Rolle das Flagellum für die Virulenz von *Legionella pneumophila* spielt, ist aber immer noch nicht eindeutig geklärt. So spielt das Flagellum bei der Infektion von Meerschweinchen durch

Legionellen keine Rolle (Elliot et al., 1982). Es wird daher angenommen, dass die *Legionella* Virulenzfaktoren unter Umständen mit der Expression der Flagellen-Genen coreguliert sind (Bosshardt et al., 1997).

Pseudomonas aeruginosa benötigt weder Flagellin (*fliC*) noch den Sigma Faktor (*fliA*) (notwendig für die Transkription von Flagellin), um immer noch adhäsiv zu sein (Simpson et al., 1992). Sind sie aber defekt im *fliF* Gen, können diese Pseudomonaden weder an Schleimhäute binden noch sind sie beweglich. Das *fliF* Genprodukt ist eine Plattform in der Zellmembran, die für den Aufbau des Geißelapparates benötigt wird (Kubori et al., 1992).

Wie von Arora (1996) gezeigt wurde, ist *fliF* bei *Pseudomonas aeruginosa* sowohl für den Aufbau der Geißel als auch für die Fähigkeit an Schleimhäute zu binden von Nöten. Es wäre daher durchaus interessant zu klären, welche Rolle das bei *Legionella pneumophila* gefundene *fliF* Homolog beim Infektionsprozess spielt. Vor allem, da noch nicht eindeutig geklärt ist, welche Rolle die Oberflächenstrukturen von *Legionella pneumophila* bei der Infektion spielen.

Für den Organismus LLAP10 konnte ebenfalls ein größeres DNS-Fragment angereichert werden (vgl. G1). Eine Datenbankanalyse blieb aber trotzdem ergebnislos. Die Sequenz konnte lediglich als *Legionella*-DNS identifiziert werden, aber keinem bestimmten Gen zugeordnet werden.

6 Screenen nach spezifischen Genfragmenten

Durch eine bestimmte Auswahl von Stämmen, deren DNS man bei einer MASH gegeneinander hybridisiert, können bestimmte stammspezifische DNS-Fragmente isoliert werden. Dadurch, dass man z. B. Stämme einer Art benutzt von denen einer, im Gegensatz zu den restlichen, pathogen ist oder eine andere spezifische Eigenschaft besitzt, kann man dieses Gen mittels MASH finden und isolieren. Mit den, anhand der Sequenzdaten der mittels MASH isolierten Fragmenten konstruierten Primern hat man dann einen spezifischen Nachweis für diesen einen Stamm. Falls es sich nun bei diesem Fragment um eine bestimmte Eigenschaft wie z. B. Wirtsspezifität, Pathogenitätsfaktor usw. handelt, kann man nun mit dem spezifischen PCR-Produkt nach diesem Gen oder Varianten davon screenen, indem man das Amplifikat in einer Mikrotiterplatte immobilisiert (vgl. C20). Da man unterschiedliche Formamidkonzentrationen verwenden kann, kann man nach Varianten dieses Gens bei anderen Stämmen, die entweder dieselbe Eigenschaft haben, oder dieselbe Nische bewohnen,

suchen und so erkennen, ob dieses Gen eventuell notwendig für bestimmte Verhalten ist. Dadurch kann man die zeitaufwendige vergleichende Genomsequenzierung umgehen und so relativ schnell wichtige Gene isolieren und untersuchen.

6.1 Detektion der Multiple rRNS-Operone von *Paenibacillus polymyxa*

Um die Screeningmethode zu testen, sollte versucht werden, ob es möglich ist, die unterschiedlichen rRNS Operone von *Paenibacillus polymyxa* zu isolieren. *Paenibacillus polymyxa* besitzt 13 rRNS Operone. Da die unterschiedlichen 16S- bzw. 23S-rRNS Gene wahrscheinlich zu geringe Unterschiede aufweisen, um die verschiedenen Varianten mittels „Fischen“ isolieren zu können, wurde versucht, mittels der Spacer zwischen 16S- und 23S-rRNS Genen die unterschiedlichen Operone anzureichern.

Bei verschiedenen Vertretern der *Bacteria* sind multiple rRNS-Operone weit verbreitet. Sogar bei phylogenetisch eng verwandten Organismen schwankt die Zahl der rRNS-Operone (Schmidt, 1998) Bei verschiedenen *Paenibacillus*-Arten variiert beispielsweise die Anzahl zwischen 8 bei *Paenibacillus alvei* bis mindestens 13 bei *Paenibacillus polymyxa* (Engel, 1999). Die Anzahl der rRNS-Operone scheint nicht nur aus der Evolutionsgeschichte des Organismus zu resultieren, sonst wäre eine starke Übereinstimmung zwischen Phylogenie und Zahl der rRNS-Genkopien zu erwarten. Die unterschiedliche Anzahl ribosomaler RNS-Operone nah verwandter Organismen wie z. B. bei der Gattung *Paenibacillus* stützen die These, dass die Anzahl der rRNS-Operone eines Organismus sich wohl eher als Anpassung an Umweltbedingungen entwickelt hat als durch phylogenetische Konservierung (Schmidt, 1998).

Mit steigender Anzahl an ribosomaler RNS-Operonen pro Genom wird die Bestimmung der genauen Kopienzahl jedoch erschwert. Die Kopien sind nicht gleichmäßig über das Chromosom verteilt, sondern befinden sich in der Regel in der Nähe des Anfangspunkts der Replikation (Kogoma, 1998). Je mehr Genkopien nahe beisammen sind, desto schwieriger wird es, diese zum Beispiel mittels Restriktionsenzymen so zu schneiden, dass man von allen Kopien unterschiedlich lange Fragmente erhält, die man anschließend effizient mittels Gelelektrophorese auftrennen kann. So kommt es vor, dass es bei manchen Restriktionsenzymen zur Bildung von Fragmenten kommt, auf denen mehrere Kopien ribosomaler RNS-Operone liegen. In dem Fall erweist sich dann die Bestimmung der genauen Anzahl der Kopien im Genom als schwierig.

Eine Möglichkeit zur Detektion von Sequenzheterogenitäten beruht auf dem Ausnutzen ihrer unterschiedlichen Schmelzeigenschaften. Sie bilden z. B. die Grundlage der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE). So konnten mit dieser Methode für *Paenibacillus polymyxa* 13 rRNS Operone nachgewiesen werden (Engel, 1999). Das Prinzip der DGGE beruht darauf, dass die Schmelzeigenschaften doppelsträngiger DNS-Moleküle von deren Sequenz bestimmt werden. So weicht schon das Schmelzverhalten von kurzen Amplifikaten, die sich nur in einer Base unterscheiden leicht voneinander ab. Der Übergang von doppel- zu einzelsträngiger DNS kann in einer Polyacrylamidgelelektrophorese verfolgt werden, da durch das Aufschmelzen des Doppelstrangs die Wanderungsgeschwindigkeit des Moleküls im Gel reduziert wird. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass nur die Untersuchung kurzer Fragmente möglich ist. So kann man immer nur Fragmente der 16S- bzw. 23S-rRNS untersuchen. Findet man dann unterschiedliche Sequenzen ist es schwierig sie einander zuzuordnen, d. h. welcher Unterschied auf der 16S-rRNS gehört zu welchem auf der 23S-rRNS derselben Transkriptionseinheit.

In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass innerhalb der Spacer zwischen 16S- und 23S-rDNS die meisten Variationen auftreten sollten, da die rRNS Gene doch relativ konserviert sind und sich bereits auf Artebenen kaum noch unterscheiden. Deshalb wurde mit dem Primerpaar 632V und 118R die Spacerregion amplifiziert. Davon ausgehend, dass diese Primerbindestellen konserviert sind und es ja ca. 13 rRNS Operone für *Paenibacillus polymyxa* gibt, kann angenommen werden, dass ein Gemisch aller Spacer amplifiziert wird. Ob jetzt jede Variante amplifiziert wird ist nicht ausschlaggebend. Das PCR-Mischprodukt wird in der Mikrotiterplatte immobilisiert und mit der chromosomalen DNS, die wie bei einer MASH präpariert wurde (vgl. B 10.2) hybridisiert. Um möglichst große DNS-Fragmente zu erhalten, wurde die DNS mit BamHI verdaut. Durch Variation der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer kann das Bindeverhalten der verschiedenen Hybride beeinflusst werden und so die einzelnen Spacer-Varianten isoliert werden.

Wie bei der DGGE macht man sich die unterschiedlichen Schmelzeigenschaften der gebildeten Hybride in der MTP zu nutze. So wird davon ausgegangen, dass bei relativ unstringenten Bedingungen die immobilisierte DNS mit der zugegebenen DNS Hybride bildet und nur die Varianten im Überstand bleiben, die keine komplementäre Sequenz zum hybridisieren finden. Deshalb können auch Varianten erfasst werden, bei denen der Spacer z. B. nicht in der MTP immobilisiert wäre, wenn er zuvor nicht amplifiziert worden wäre. Durch

schrittweises Erhöhen der Formamidkonzentration bzw. der Stringenz schmelzen die Hybride nicht perfekt komplementärer DNS-Stränge nach und nach auf und können dem Überstand entnommen und analysiert werden.

Mit diesem Verfahren konnten für *Paenibacillus polymyxa* 7 unterschiedliche Spacer Varianten isoliert werden (vgl. Abb C22). Spacer 1 und 2 unterscheiden sich eindeutig in ihrer Sequenz von den restlichen fünf. Spacer 2 ist der kürzeste von allen sieben. Er ist nur ca. 290 Basenpaare lang während alle anderen sechs mindestens 374 Basen lang sind. Spacer 1 ist mit 398 Basen sogar der längste. Die Sequenzen aller sieben isolierten Spacer wurden einem tRNS Scan unterzogen (www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/). Es konnte nur für Spacer 1 eine tRNS detektiert werden (vgl. Abb. C23). Die Spacer 3, 4, 5, 6 und 7 haben untereinander die größte Sequenzähnlichkeiten. In Abb. C 22 wurden die Basen in denen sich die Spacer unterscheiden farblich hervorgehoben. Diese Unterschiede wurden auch zur Konstruktion Operon-spezifischer Primer genutzt. Lediglich für die Spacer Variante 4 konnte kein spezifischer Primer entwickelt werden, da keine für diesen Spacer spezifische Sequenz gefunden werden konnte (vgl Abb.C22). In den variablen Bereichen stimmte Spacer 4 immer mit irgendeinem der restlichen sechs überein. Für die restlichen sechs war es aber kein Problem „Spacer-spezifische“ Primer zu konstruieren.

6.1.1 In vitro Amplifikation und Sequenzanalyse der 16S-rRNS Genvarianten

Zur Überprüfung, ob die operon-spezifischen Primer auch tatsächlich spezifisch binden, wurde die 16S-rDNS mit ihnen amplifiziert und anschließend sequenziert (vgl. G 2). Einige der bekannten Sequenz- Heterogenitäten der 16S-rRNS (Nübel et al., 1996) konnten eindeutig identifiziert werden (vgl. Abb D1), was die Operonspezifität bestätigte.

	1246		1275
PAENI16S_1V	GUACAACGGG	<u>AAGCGAA</u> AUC	GCGAGGUGGA
PAENI16S_3V	GUACAACGGG	<u>AAGCGAA</u> GCC	GCGAGGCGGA
PAENI16S_4V	GUACAACGGG	<u>AAGCGAA</u> GGA	GCGAUCUGGA
PAENI16S_2V	GUACAACGGG	<u>AAGCGAA</u> GCC	GCGAGGUGGA
PAENI16S_5V	GUACAACGGG	<u>AAGCGAA</u> GGA	GCGAGGUGGA

Abb. D1: 16S-rRNS Varianten bei *Pb. polymyxa*. Die konstruierten 16S-rRNS Primer sind unterstrichen. Die variablen Stellen sind rot markiert.

Anhand der erhaltenen Sequenzen wurden die Primer Paeni16S_1V-Paeni16S_4V konstruiert. Lediglich der Primer Paeni16S_5V wurde für eine *Paenibacillus polymyxa* 16S-rRNS Sequenz, die aus der ARB Datenbank (Ludwig and Strunk, 1996) stammt, konstruiert. Mit

Hilfe dieser variablen Stelle wurden nun spezifische 16S Vorwärtsprimer konstruiert (unterstrichene Basen).

In einem nächsten Schritt wurden die operon-spezifischen Primer, mit Zielsequenz in den Spacern, mit den spezifischen 16S-rRNS Primervarianten getestet. Es wurden alle Primerkombinationen getestet. Abb. C11 zeigt mit welchen Primerkombinationen PCR-Produkte generiert werden konnten. Die Ergebnisse wurden, zur besseren Übersicht noch einmal in Tab. C20 zusammengefasst.

Der Rückwärtsprimer Paenop1R ergab mit dem Primer Paeni16S1_V und Paeni16S_5V ein PCR-Produkt. D. h., der Spacer 1, für den der Primer Paenop1R konstruiert wurde, ist mit zwei verschiedenen 16S-rRNS Genen assoziiert. Die Primer Paenop2.1R und Paenop3bR bildeten jeweils nur mit Paeni16S_2V bzw. Paeni16S_4V ein Amplifikat. Spacer 3 und Spacer 6 sind somit wahrscheinlich nur mit jeweils einem 16S-rRNS Gen assoziiert. Im Gegensatz dazu scheint aber das 16S-rRNS Gen für das der Primer Paeni16S_2V konstruiert wurde, nicht nur mit Spacer 3 sondern auch noch mit den Spacern 5, 7 und 2 assoziiert zu sein. D. h. diese Variante bzw. dieses Operon könnte viermal vorhanden zu sein. Mit dem Primer Paeni16S_3V konnte kein PCR-Produkt gebildet werden. Die Zielregion hat sich als ungeeignet erwiesen. Es konnte mit keinem Rückwärtsprimer ein Amplifikat gebildet werden. Der Primer Paeni16S_2V erfasst die Variante, für der Primer Paeni16S_3V konstruiert wurde ebenfalls. Man kann bloß nicht zwischen beiden Varianten unterscheiden.

Wertet man alle Ergebnisse (vgl. Tab C20) aus, kann man zu dem Schluss kommen, dass bis zu sechzehn 16S-rRNS Operone vorhanden sind. Inwiefern man ausgehend von den unterschiedlichen Primerkombinationen auf die endgültige Anzahl der rRNS Operone schließen kann, sei noch dahin gestellt. Dafür braucht es noch weiterer Untersuchungen, auch mit den variablen Bereichen der 23S-rRNS, um zu testen, ob diese Annahme bestätigt werden kann. Auf jeden Fall, konnte mit der entwickelten Methode 7 unterschiedliche Spacer, wovon sich sechs zur Konstruktion von spezifischen Primern eigneten, isoliert werden und anhand der verschiedenen PCRs gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Spacer mit mehreren 16S-rRNS Genen assoziiert sein können und umgekehrt.

6.2 Anwendung der entwickelten Screeningmethode auf andere Gene

Will man mit dem entwickelten Verfahren nach anderen, nicht konservierten Genen screenen, immobilisiert man das mittels MASH isolierte DNS-Fragment nach in vitro Amplifikation mit

den dafür spezifischen Primern, in einer MTP. Die zu analysierende DNS wird, wie bei der Methode des spezifischen DNS-Fischens, verdaut, ligiert und amplifiziert (vgl. B 10.2).

Nach der Hybridisierung verwirft man dann den Überstand und analysiert nach einem anschließenden Denaturierungsschritt das, was an die immobilisierte DNS gebunden hat. Hierbei kann man ebenfalls durch Ändern der Stringenz verschiedene Varianten des Gens isolieren und anschließend sequenzieren. Bei einer niedrigeren Stringenz können Hybride gebildet werden, die größere Unterschiede zur immobilisierten DNS aufweisen als bei einer höheren Stringenz.

Im Falle von *Paenibacillus* konnte man sowohl den Überstand nach der Hybridisierung analysieren als auch die an die in der MTP immobilisierte DNS gebundene DNS. Der Vorteil bei *Pb. polymyxa* war, dass um die immobilisierten Spacer-DNS bekannte konservierte Gene liegen. Falls eine Spacer-Variante nicht mit der immobilisierte DNS hybridisieren konnte und somit im Überstand blieb, da z. B. zu große Sequenzunterschiede vorhanden waren, konnte sie trotzdem, dadurch, dass der Überstand mit einem konservierten 16S-rRNS Vorwärtsprimer und einem konservierten 23S-rRNS Rückwärtsprimer amplifiziert wurde, detektiert werden.

Versucht man aber unbekannte Gene bzw. Varianten von diesen Genen zu isolieren, muss man den Überstand verwerfen und nur das was an die immobilisierte DNS gebunden hat analysieren. Da man bei unbekannt Genen auf die Linker zur Amplifikation angewiesen ist muss der Überstand verworfen werden, da sonst die gesamte DNS, die für die Hybridisierung verwendet wurde, amplifiziert würde, da alle DNS-Fragmente, außer der immobilisierten DNS, mit demselben Adaptor bzw. Linker verknüpft sind (vgl. B. 10.2). Nach Denaturierung der gebildeten Hybride in der MTP können die so isolierten Fragmente, nachdem sie kloniert (vgl. B 9.3) und sequenziert (vgl. B 11) wurden, analysiert werden.

E. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war in erster Linie die Konstruktion art- bzw. stammspezifischer Primer zur Differenzierung einzelner *Streptomyces*-, *Xanthomonas*- und *Legionella*- Arten bzw.-Stämme. Durch die erfolgreiche Konstruktion von PCR-Systemen zur Differenzierung und Detektion nah verwandter Stämme, wurden Werkzeuge zur Verfügung gestellt, mit deren Hilfe man die entsprechenden Bakterien schnell und sicher identifizieren kann. Vor allem die Differenzierung der verschiedenen *Xanthomonas* Pathovaren konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Primer entscheidend vereinfacht werden. Damit erübrigen sich die zeitaufwendigen und nicht immer eindeutigen Infektionsstudien.

Zudem wurden für wichtige Legionellen (*Legionella pneumophila* Corby, *L. longbeachae*, *L. hackeliae* und LLAP10) Primer für deren Nachweis entwickelt und getestet. Dies ist von Bedeutung, da bis heute fast ausschließlich nur für *L. pneumophila* Serogruppe 1 diagnostische Nachweisverfahren existieren. Bei *L. longbeachae* und *L. hackeliae* handelt es sich ebenfalls um humanpathogene Organismen die Pneumonien verursachen. Sowohl das Primerpaare legio1.9V / legio1.9R, spezifisch für *L. pneumophila* Corby als auch die Primerpaare legio2.4V / legio2.4R, legio2.7V / legio2.7R und legio2.9V / legio2.9R, spezifisch für *L. longbeachae* wurden an mehr als 60 *Legionella* Stämmen getestet (vgl. Tab C17). Mit Hilfe dieser Primerpaare können diese beiden *Legionella*-Arten zuverlässig von den übrigen 30 unterschieden werden. Somit sind diese Primer wertvolle Werkzeuge für die schnelle Identifizierung und Differenzierung der zwei Verursacher der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila* und *Legionella longbeachae*.

Darüber hinaus wurde ein Methode, ausgehend von der Technik des MASH-Verfahrens, entwickelt, mit deren Hilfe es möglich sein sollte, bestimmte Gene wie z.B. Pathogenitätsfaktoren zu isolieren. So konnten mittels der Technik des „spezifischen DNS-Fischens“ im Mikrotiterplattenformat Gene isoliert werden, welche eine Rolle bei der Pathogenität bzw. der Virulenz der entsprechenden Organismen spielen. Im Falle von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* und *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* wurde ein Teil der Typ IV pre-pilin Leader Peptidase bzw. des virB11 Gens isoliert. Beide Gene gehören Operonen an, welche eine wichtige Rolle bei der Pathogenität spielen. Im Falle von

Legionella pneumophila wurde ein größeres Fragment, ähnlich dem *fliF* Gen von *Pseudomonas aeruginosa* isoliert. Dieses Gen spielt eine nicht unerhebliche Rolle bei der Kolonisation von Schleimhäuten. Es ist also ohne weiters möglich, mit dieser Technik Pathogenitätsfaktoren zu isolieren und anzureichern.

Ausgehend von dem Verfahren des „spezifischen Fischens“ wurde eine molekulare Screeningmethode im Mikrotiterplattenformat zur gezielten Isolierung bestimmter Gene entwickelt und erfolgreich getestet. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, nach Genen und deren Varianten in verschiedensten Mikroorganismen zu suchen und sie zu isolieren. Am Beispiel von *Pb. polymyxa* konnte gezeigt werden, dass es kein Problem war mit dieser Technik nach verschiedenen 16S-rRNS-Operonen zu screenen. Mit diesem Verfahren kann man gezielt nach Stoffwechsel-, Pathogenitäts-, Antibiotikaresistenz- oder sonstigen Genen suchen, ohne dass andere aufwendige Verfahren bis hin zur vergleichende Genomsequenzierung notwendig sind.

F. Literatur

Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshaver, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., Weyant, R.S., Birtles, R.J., Raoult, D., Halablab, M.A. (2001) *Legionella drozanskii* pv. nov., *Legionella rowbathamii* pv. nov. and *Legionella fallonii* pv. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1151-1160

Alfano, J.R., Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* 179: 5655-62

Alfano, J.R., Collmer, A. (2001) Mechanisms of bacterial pathogenesis in plants: familiar foes in a foreign kingdom. In: *Principles of Bacterial Pathogenesis* pp. 179-226. San Diego: Academic

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402

Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169

Aoki, S., Hirakata, Y., Mlyazaki, Y., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Tomono, K., Yamada, Y., Tashir, T., Kohno, S., Kamihira, S. (2003) Detection of *Legionella* DNA by PCR whole-blood samples in a mouse model. *Journal of Medical Microbiology* 52: 325-329

Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R. (1996) Cloning and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* *fliF*, necessary for flagellar assembly and bacterial adherence to mucin. *Infect. Immun.* 64: 2130-2136

Atlas, R.M. (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease, pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.* 4: 283-293

Baltz, R.H., (1998) Genetic manipulation of antibiotic producing *Streptomyces*. Trends in Microbiology 6: 76-83

Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gisbert, P. (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2420-2425

Behr, T., Koob, C., Schedl, M., Mehlen, A., Meier, H., Knopp, D., Frahm, E., Obst, U., Schleifer, K.-H., Niessner, R., Ludwig, W. (2000) A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. System. Appl. Microbiol. 23: 563-572

Berger, B.R., Christie, P.J. (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. J. Bacteriol. 176: 3646-3660

Bibb, W.F., Sorg, R.J., Thomason, B.M., Hicklin, M.D., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Wulf; M.R. (1981) Recognition of a second serogroup of *Legionella longbeachae*. J. Clin. Microbiol. 14: 674-677

Bjourson, A.J., Cooper, J.E. (1988) Isolation of *Rhizobium loti* strain-specific DNA sequences by subtraction hybridisation. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2852-2855

Bosshardt, S.C., Benson, R.F., Fields, B.S. (1997) Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. Microb. Pthog. 23: 107-112

Bradbury, J.F. (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. C.A.B. International, Farnham Royal, Slough, UK.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Gorman, G.W., Wilkinson, H.W., Bibb, W.F., Hackel, M., Tyndall, R.L., Campbell, J., Feeley, J.C., Thacker, W.L., Skaliy, P., Martin, W.T., Brake, B.J., Fields, B.S., McEachern, H.V., Corcoran, L.K. (1985) Ten new species of *Legionella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35 : 50-59

Brieland, J.K., Fantone, J.C., Remick, D.G. LeGendre, M., McClain, M., Engleberg, N.C. (1997) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun.* 65: 5330-5333

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., Noller, H.F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA Operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148: 107-127

Brown, R., Barker, J. (1999) Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends. Microbiol.* 7: 46-50

Byrne, B., Swanson, M.S. (1998) Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66: 3029-3034

Cameron, S., Roder, D., Walzer, C., Feldheim, J. (1991) Epidemiological characteristics of *Legionella* infection in South Australia: implications for disease control. *Aust. N. Z. Med.:* 21: 65-70

Chesnokova, O., Coutinho, J.B., Khan, I.H., Mikhail, M.S., Kado, C.I. (1997) Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. *Mol. Microbiol.* 23: 579-590

Chun, W.W.C., Alvarez, A.M. (1983) A starch-methionine medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from plant debris in soil. *Plant. Dis.* 67: 632-635

Clark, J.M., and R.L. Switzer (1977) *Experimental Biochemistry*. 2nd ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco

Cloud, J.L., Carrol, K.C., Pixton, P., Erali, M., Hillyard, D.R. (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1709-1712

Denny, T.P. (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 173-197

Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K., Murphy, Pj. (1998) Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. In: Rhizobiaceae ed. H.P. Spaino, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas. Dordrecht, Netherlands: Kluwer

Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B., Hacker, J., Steinert, M. (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* 69: 2116-2122

Doyle, R.M., Steele, T.W., McLennan, A.M., Parkinson, I.H., Manning, P.A., Heuzenroeder, M.W. (1998) Sequence analysis of the *mip* gene of soilborne pathogen *Legionella longbeachae*. *Infect. Immun.* 66: 1492-1499

Drozanski, W. (1991) *Sarcobium lyticum* gen. nov. sp. nov., an obligat intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 : 82-87

Ehrlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J. (1991) Recent advantages in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1650

Eisen, J.A. (2000) Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 606-611

Elliot, J.A., Johnson W. (1982) Virulence conversion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by passage in guinea pigs and embryonated eggs. *Infect. Immun.* 35: 943-947

Engel, M. (1999) Untersuchungen zur Sequenzheterogenität multipler rRNS-Operone bei Vertretern verschiedener Entwicklungslinien der *Bacteria*. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München

Fang, G.D., Yu, V.L., Vickers, R.M. (1989) Disease due to the Legionellaceae (other than *L. pneumophila*); historical, microbiological, clinical and epidemiologic review. *Medicine* 68: 116-132

Feldmann, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A. (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66: 43-51

Fernandez, L.A., Berenguer, J. (2000) Secretion and assembly of regular surface structures in gram-negatives bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 21-44

Fields, B. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 4: 286-290

Finlay, B.B., Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136-69

Fliermanns, C.B., Chery, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., Pope, D.H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 9-16

Franken, A.A.J.M (1992) Comparison of immunofluorescence microscopy and dilution-plating for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds. *Neth. J. Plant Pathol.* 98: 169-178

Fraser, D.W., Tsai, T.F., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrer, R.G., Harris, J. Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade J.E., Shepard, C.C., Brachman, P.S., the Field Investigation Team (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic pneumonia. *New England Journal of Medicine* 297: 1189-1197

Friss-Moller, A., Rechnitzer, C., Blak, F. (1986) Prevalence of Legionnaires' disease in pneumonia patients admitted to Danish department of infectious diseases. *Scan. J. Infect. Dis.* 18: 321-328

Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R.K., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999) In situ detection of novel bacteria endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 206-212

Fukui, R., Arias, R., Alvarez, R. (1994) Efficacy of four semiselective media for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from tropical soils. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 534-540

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-567

Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Hacker, J., Brand, B.C. (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila*: Construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2686-2690

Hacker, J., Kaper, J.B., (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-79

Harris, A., Laly, M., Albrecht, M. (1998) *Legionella bozemanii* pneumonia in 3 patients with AIDS. *CID* 27: 97-99

Harper, J.R., Silhavy T.J., (2001) Germ warfare: the mechanism of virulence factor delivery. In: *Principles of Bacterial Pathogenesis* pp. 43-74. San Diego: Academic

Helbig, J.H., Engelstadter, T., Maiwald, M., Uldum, S.A., Witzleb, P.C., Luck, P.C. (1999) Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 716-722

Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Cataro, J.P. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 6: 370-378

Hirakata, Y., Hagiwara, S., Kawaguchi, K., Ishii, Y., Sugiyama, Y., Kitamura, S. (1996) Two coincidental isolated cases of Legionnaires' disease diagnosed by PCR and cured by combination therapy with clarithromycin and rifampicin. *J. Infect. Chemother.* 2: 187-193

Holmes, D.S., Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197

Howley, P.M., Israel, M.F., Law, M.F., Martin, M.A. (1979) A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. *J. Biol. Chem.* 254: 4876-4883

Hu, N.T., Lee, P.F., Chen, C. (1995) The type IV pre-pilin leader peptidase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is functional without conserved cysteine residues. *Molecular Microbiology* 18: 769-777

Hussong, D., Colwell, R.R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R.M., Burge, W.D. (1987) Viable *Legionella pneumophila* not culturable by culture on agar medium. *Bio/Technology* 5: 947-950

Jackson, R.W., Athanassopoulos, E. Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., et al. (1999) Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10875-80

Jaulhac, B., Reyrolle, M., Sodahlon, Y.K., Jarraud, S., Kubina, M., Monteil, H., Piemont, Y., Etienne, J. (1998) Comparison of sample preparation methods for detection of *Legionella pneumophila* in culture-positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2120-2122

Kado, C.I. (2000) The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 643-48

Klivington, S., Price, J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 519-525

Kogoma; T. (1998) Origins of Chromosome Replication. In: *Bacterial Genomes*; De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M., eds. pp 67-77; International Thompson Publishing, Chapman & Hall

Koide, M., Saito, A., Okazaki, M., Umeda, B., Benson, R.F. (1999) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting soils in Japan. *Clin. Infect. Dis.* 29: 943-944

Kong, L.R., Tazeng, D. D., Yang, C.H., (2001) Generation of PCR-based DNA fragments for specific detection of *Streptomyces saraceticus* N45. Proceedings of the National Science Council, Republic of China part B 2: 119-127

Koonin, E.V., Makarova, K.S., Aravind, L. (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. Annu. Rev. Microbiol. 55: 709-742

Kubori, T., Shimamoto, S., Yamaguchi, K. N., Aizawa, S.-I. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 226: 433-446

Landers, P., Kerr, K.G., Rowbothan, T.J., Tipper, J.L., Keig, P.M., Ingham, E., Denton, M. (2000) Survival and Growth of *Burkholderia cepacia* within free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 121-123

Lee, T.C., Vickers, R.M., Yu, V.L., Wagener, M.M. (1993) Growth of 28 Legionella species on selective culture media; a comparative study. J. Clin. Microbiol. 31: 2764-2768

Lee, V.T., Schneewind, O. (2001) Protein secretion and the bacterial infections. Genes Dev. 15: 1725-52

Lindgren, P.B. (1997) The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 129-52

Lo Presti, F., Riffard, S., Vandenesch, F., Etienn, J. (1998) Identification of *Legionella* species by random amplified polymorphic DNA profiles. J. Clin. Microbiol. 36: 3193-3197

Lo Presti, F., Riffard, S., Jarraud, S., Le Gallou, F., Richet, H., Vandenesch, F., Etienn, J. (2000) Isolation of *Legionella oakridgensis* from two patients with pleural effusion living in the same geographical area. J. Clin. Microbiol. 38: 3128-3130

Ludwig, W. and O. Strunk (1996) ARB: a software environment for sequence data. <http://www.arb-home.de>

- Macnab, R.M. (1992)** Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26: 131-158)
- Maiwald, M., Schill, M., Stockinger, C., Hlbig, J.H., Luck, P.C., Witzleb, W., Sonntag, H.-G. (1995)** Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 25-33
- Malkawi, H.I., Saadoun, I., Momani, F., Meqdam, M.M.M. (1999)** Use of RAPD-PCR to detect genetic diversity of soil *Streptomyces* isolates. *New Microbiologica* 22: 53-58
- Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A., Gabriel, D.W. (1994)** Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4094-4099
- Marrie, T.J., Durant, H., Yates, L. (1989)** Community acquired pneumonia requiring hospitalization ; a 5 year perspective study. *Rev. Infect. Dis.* 11: 586-599
- Martin, P., Dary, A., Decaris, B. (2000)** Identification and typing of *Streptomyces* strains: evaluation of interspecific, intraspecific and inraclonal differences by RAPD fingerprinting. *Res. Microbiol.* 151: 853-864
- McKinney, R.M., Porschen, R.K., Edelstein, P.H., Bisset, M.J., Harris, P.P., Bondell, S.P., Steigerwalt, A.G., Weaver, R.E., Ein, M.E., Lindquist, D.S., Kops, R.S., Brenner, D.J. (1981)** *Legionella longbeachae* species nova, another etiological agent of human pneumonia. *Ann. Intern. Med.* 94: 739-741
- Murray, V. (1989)** Improved double-stranded DNA-sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17: 8889
- Neumeister, B., Schöniger, S., Faigle, M., Eichner, M., Deitz K. (1997)** Multiplication of different *Legionella* species in Mac 6 cells and in *Acanthamoebae castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1219-1224

Nikiforov, T.T., and Y.-H. Rogers (1995) The Use of 96-Well Polystyrene Plates for DNA Hybridization-Based Assays: An Evaluation of Different Approaches to Oligonucleotide Immobilization. *Anal. Biochem.* 227: 201-209

Nishi, A., Tominaga, K., Furukawa, K. (2000) A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J. Bacteriol.* 182: 1949-55

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178: 5636-5643

O'Callaghan, D., Cazevielle, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., et al. (1999) A homologue of *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33: 1210-1220

O'Connell, W.A., Dhand, L., Cianciotto N.P. (1996) Infection of macrophage-like cells by *Legionella* species that have not been associated with disease. *Infect. Immun.* 64: 4381-4384

Ochmann, H., Lawrence J.G., Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304

Ojanen-Rheus, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K. et al. (1997) Characterization of the fimA gene encoding bundle forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 179: 1280-1290

Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R., Hacker, J. (1991) Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1955-1961

Paszko-Kolva, C., Shahamat M., Colwell, R.R. (1992) Long term survival of *Legionella pneumophila* serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. *FMS Microbiol. Ecol.* 102: 45-55

Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai G., Elliott, S., Donnenberg, M.S. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66: 3810-17

Plouffe, J.F., File, T.M., Breiman; R.F., Hackmann, B.A., Salstron, S.J., Marston, B.J., Fields, B.S. and the Community based Pneumonia Incidence Study Group (1995) Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. *CID* 20: 1291-1296

Reeve, M.A., and C.W. Fuller (1995) A novel thermostable polymerase for DNA sequencing. *Nature* 376: 796-797

Riffard, S., Presti, F.L., Normand, P., Forey, F., Reyrolle, M., Vandenesch, J.E., Vandenesch, F. (1998) Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis

Roberts, M.A. and Crawford, D.L. (2000) Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2555-2564

Romantschuck, M. (1992) Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 225-243

Rowbotham, T. J. (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.* 22: 678-689

Rowbotham, T. J. (1993) *Legionella*-like amoebal pathogens. In *Legionella, Current Status and Emerging Perspectives*, pp. 137-140. Edited by Barbare, J.M., Breiman, R.F., Dufour, A.P. Washington, DC: American Society for Mikrobiologie

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491

Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

Schaad, N.W. (1980) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. In: American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.

Schaad, N.W. (1982) Detection of seedborne bacterial plant pathogens. Plant. Dis. 66: 249-252

Schmidt, T.M. (1998) Multiplicity of ribosomal RNS operons in prokaryotic genomes. In: Bacterial Genomes; De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M., eds. pp 221-229; International Thompson Publishing, Chapman & Hall

Schulze-Röbbecke, R., Rödder, M. Exner, M. (1987) Vermehrungs- und Abtötungs-temperaturen natürlich vorkommender Legionellen. Zent. Bl. Bakteriolog. Hyg. B. 184: 495-500

Sheng, J., Citovsky, V. (1996) Agrobacterium-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. Plant Cell 8: 1699-1710

Shih, H.D., Lin, Y.C., Huang, H.C., Tzeng, K.C., Hsu, S.H. (2000) A DNA probe for identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal organism of black rot of crucifers in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 113-120

Simpson, D.A., Ramphal, R., Lory, S. (1992) Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence : distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins. Infect. Immun. 60: 3771-3779

Socan, M., Kese, D., Marinic-Fiser, N. (2000) Polymerase chain reaction for detection of legionellae DNA in urine samples from patients with community-acquired pneumonia. Folia Microbiol. (Praha) 45: 469-472

Speers, D.J., Tribe, A.E. (1994) *Legionella longbeachae* pneumonia associated with potting mix. (letter) Med. J. Aust. 161: 509

Springer, N., Ludwig, W., Drozanski, W., Amann, R., Schleifer, K.-H (1992) The phylogenetic status of *Sarcobium lyticum*, an obligate intracellular bacterial parasite of small amoebae. FEMS Microbiol. Lett. 96: 199-202

Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. Sys. Bacteriol. 44: 846-849

Steele, T.W., Lanser, J., Sangster, N. (1990) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. Appl. Environ. Microbiol. 56: 49-53

Steele, T.W., McLennan, A.M. (1996) Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1081-1083

Steinert, M., Ott, M., Lück, C.P., annich, E., Hacker, J. (1994) Studies on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in protozoa and in macrophage-like cells. FEMS Microbiol. Ecol. 15: 299-308

Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F. (1998) *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. Appl. Environ. Microbiol. 65: 206-212

Strom, M.S., Bergman, P., Lory, S. (1993) Identification of active-site cysteines in the conserved domain of PiliD, the bifunctional type IV pilin leader peptidase/N-methyltransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 268: 15788-15894

Suggs, S.V., T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima, M.J. Johnson, K. Itakura, R.B. Wallace (1981) Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In D.D. Brown, and C.F. Fox (eds.): *Developmental biology using purified genes* 683-693. Academic Press, New York

Sullivan, J.T., Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5145-49

Tabor, S., and C.C. Richardson (1995) A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6339-6343

Taylor, T.H., Albrecht, M.A. (1995) *Legionella bozemanii* cavitary pneumonia poorly responsive to erythromycin; case report and review. Clin. Infect. Dis. 20: 329-334

Thien, B.C., Saier, M.H. (2001) Conjugal type IV macromolecular transfer systems of gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. Microbiology 147: 3201-3214

Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E.A, Menck, C.F.M., da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Kitajima, J.P., Simpson, A.J. (2002) Comparative Genomic Analysis of Plant Associated Bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 169-89

van't Hullenaar, N.G., van Ketel, R.J., Kuijper, E.J., Bakker; P.J., Dankert, J. (1996) Relapse of *Legionella longbeachae* infection in an immunocompromised patient. Neth. J. Med. 49: 202-204

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-489

Voss, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414

Walker, J.C., Tisdale, W.B. (1920) Observation on seed transmission of the cabbage black rot organism. Phytopathology 10: 175-177

Wassill, L., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1998) Development of a modified subtraction hybridization technique and its application for the design of strain specific PCR systems for lactococci. *FEMS Microbiology Letters* 166: 63-70

Weir, S.C., Fischer, S.H., Stock, F. Gil, V.J. (1998) Detection of Legionella by PCR in respiratory specimens using a commercially available kit. *Am. J. Clin. Pathol.* 110: 295-300

Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T., Fareed, G., Richardson, C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acids. *J. Biol. Chem.* 234: 4543-4555

Weiss, A.A., Johnson, F.D., Burns, D.L. (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2970-2974

Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218

Williams, P.H. (1980) Black rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant. Dis.* 64: 736-742

Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E., Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol. Cell* 6: 1461-1472

Yuan, W.M. and Crawford, D.L. (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3119-3128

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23: 11-28

Zwirgmaier, K., Wassil, L., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (2001) Subtraction hybridization in microplates: an improved method to generate strain-specific PCR primers. *System. Appl. Microbiol.* 24: 108-115

Zwirgmaier, K. (2003) The Use of Polynucleotide RNA Probes for Detection, Identification and Cell Sorting of Microorganisms. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München

G. Anhang

1 Isolierte DNS-Fragmente

Ausgehend von den mittels MASH isolierten DNS-Fragmenten (ca. 200 bp), wurden entweder mittels “spezifischen DNS Fischens“ oder RL-PCR versucht größere DNS-Fragmente zu isolieren. Im folgenden sind die erhaltenen Sequenzen mit ihrer Größe aufgeführt. Grau unterlegte Bereiche in den DNS-Sequenzen sind die Zielregionen der konstruierten spezifischen Primer. Eventuelle Ähnlichkeiten zu in Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gefundenen DNS-Sequenzen werden angegeben.

1.1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Sequenz (871 bp)

```

1 ATGGCATTTC TCGACCAGCA TCCC GGTTCTC GGCTTTCCCG CCGCGGCCGG ACTGGGACTG
61 CTGATCGGCA GCTTCCTGAA TGTAGTGATC CTGCGCTTGC CCAAGCGCAT GGAGTGgTAG
121 TGGCgGCGCG ATGCGCGCGA AATCCTGGAA CTGCCCGACA TCTACGAGCC GCCCGCGCCG
181 GGCATTGTGG TGGAGCCATC GCACGATCCG GTCACCGGCG ACAAGCTCAA GTGGTGGGAG
241 AACATTCCGC TGTTTCACTG GCTGATGCTG CGCGGCAAGT CGCGCTACAG CGGCAAGCCG
301 ATCTCCATCC AGTACCCGCT GGTGGAGCTG TTGACCTCGA TCCTGTGCGT GGCCAGCGTC
361 TGGCGCTTCG GCTTCGGCTG GCAGGGCTTC GGTGCGATCG TGCTGAGCTG CTTTCTGGTG
421 GCGATGTCCG GTATCGACCT GCGCCACAAG CTGCTGCCGG ACCAGCTGAC CTTGCCGCTG
481 ATGTGGTTGG GCTTGGTCCG TtCGATGGAC AACCTCTACA TGCCAGCCAA GCCCGCCCTG
541 CTGGGTgCTG CGGTCGGCTA TGTCTCGCTC TGGACGGTGT GGTGGCTGTT CAAGCAGCTC
601 ACCGGCAAGG AAGGGATGGG CCACGGCGAC TTCAAGTTGC TGGCTGCGCT GGGGGCGTGG
661 TCGGGGTTGA AGGGCATTCT CCGCATCATC CTGATCTCCT CGCTGGTCCG GCCCGTGCTC
721 GGTTTCGATCT GGCTGTTCCG CaAGGGGCGC GACCGCGCCA CGCCGATCCC GTTCGGACCT
781 TATCTGGCCA TCGCCGGCTG GGTAGTGTTT TTCTGGGGTA ACGaCCTGGT GGATGGCTAC
841 CTGCGTTTTCG CAgGCCTGCG TTGAGCAAGC C

```

Sequenzähnlichkeiten: 99% zur Typ IV pre-pilin Leader Peptidase von *X. c.* pv. *campestris* ATCC 33913

1.2 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* Sequenz (1030 bp)

```

1 CCGACAGCAC GCATCTCGAA TGACTTcCTG GATTACCAGT ACTCAGTGCT GGAATCCTG
61 GaATTACCTGA ACTCGCCTGA CGTGACCGAA ATCTGCATCA ATCGTCCGGG TGAGCTGTAT
121 CTTGAGACcA TTCATGGGTG GCAGCGGGTT GATGTGCCGT CGCTCACTTA CGACCGTGCT
181 CGGCAGTTTT GTACGGCTGT CGTCAACGAG AGCAATACCG GGCAACGTAT CACCGACGCC
241 GACCCGGTGG TATCACTGAC TTTTCCGACG GGGCAGCGCG CACAGTTCGT GATGCCGCCG
301 GCATGCGACG CCGGCAAGGT ATCCATCACG ATCCGGTTGC CTTCCAAGCA TACGAAGTCG
361 CTGGAGCAGT ATAAACATGA CGGTTTCTTC GACGAGGTCC TGGAACAGTC GGCCGATGTC
421 AGCGACCATG ACCAGGAGTT GCTGGAATTG CGCCGTAAAC GTGACTATGC CGAGTTCTTC
481 AAAAAGTGCG TGCTGTACAA GAAGAATGtA GTCGTGGCTG GGGCAACAGG CAGCGGCAAG
541 ACCACCTTCA TGAAGGCACT TGTCAATCAC ATCCCCAACG AAGAACGTCT TGTACCATC
601 GAGGACGCGC GTGAgcTGTT CATCAGTCAG CCCAATTCCG TGCACCTGTT GTATTGGAAG

```

```

661 GGTGGACAGA GCGCCAGCAA TGTGACTGCC AAGaGTTGCA TGGAGGCATG CCTGCGCATG
721 AAACCGGATC GcaTCATCCT GGCCGAGTTG CGTGGTGATG AGTCGTTCCTA CTCATCCGT
781 AACTGCGCAT CGGGACATCC GGGTTCCATC ACCAGTTGCC ACGCCGGTAG CGTCGAGCAG
841 ACCTGGGACC AGTTGGCCTT GATGGTGAAG GCATCCAACG AAGGCTCCGG TCTGGAGTTC
901 GAAGTGATCA AGCGTTTGCT GCGAATGACG ATCGACATCG TGGTTACAT CAAGGCACAC
961 GCCGGGCGCC GGTTTCATCAC GGGCATCGAC TTGCATCCTC TGAGAACCTT GCGCGGCGGT
1021 TGAGGGGTAA

```

Sequenzähnlichkeiten: 84 % zum virB11 Gen von *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306

1.3 *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* Sequenz (633 bp)

```

1 ATCATGGCGT GCTGTGAGTg GACGGGTaGG GAGTCTGcgA GCCGcGCGC CGGCGCATGT
61 GTGAATGGGC GCATTTGACA CGAACCTGCG GGTCTTTAAC ATTCTGCGGC TTATGTCCgC
121 GAACGTACCC gAAATGCTGG ATGCTTGGCG GATGGTcCa GCGCGCAGGc gTTTCGATGG
181 CCGCATCCCG CTCTCTGCGA TGACCCGTCT GCAAGGAAGC CTTGTGATA CCGAGGGCGA
241 ATGTGTCTAT TCGCTTGAAT TCGACCAGGA CGATCTGTTG AAGGTCGCTT ATGTCGAACT
301 CAGTATCGAT GTCGAGCTGC CGCTGGCGTG CCAGCGCACC CTGCAACGGT TTCTGTATCC
361 GGTGCAAATC AGACAGCGTC TTGGTTTGAT CCGTGACGAG GCCGACGAAG CTGCATTGCC
421 GGCCGAGTAC GAAGCGCTGC TGGTGCCTGA AGATGGCATG CTGCGGGCGG TGGATCTGGT
481 CGAGGACGAG CTGGTGTGT CCGTACCGGT GGTGCCAATG GCGCCGGGAA GCGAAGCCGT
541 CGAGGCCGAG TGGGTTCCGA CCCAGGAAGA GCAAGACAAG GCCAGTCCGT TCGCGGCGCT
601 GGCAGCGTTG AAGAAACAGT AACCGCCGCT GTT

```

Sequenzähnlichkeiten: 93 % zum XAC 1121-Gen (konserviertes hypothetisches Protein) von *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306

1.4 *Xanthomonas* pv. *lobelia* Sequenz (1012 bp)

```

1 TGGTGGTTTC TATCTTCCGT AACGGAAAAA ATCCACTGGC CTGCAGATGT TTTTGCATCA
61 GCGCTGTACC AAGCGAAGTC TGCGCATCGT GGGGGACTAA CAATGCATGC AAGCAGACGC
121 AACTAAGAGC AGCTAACAAA AGGACTGTGC TCACCATCAG GTGGGCGCGG CCGATACTCG
181 ATGCGGCATG GACCACGCGT AACTCCGGT TTTGAACGCG CCGTCCACAC CCACCTGACA
241 ACTGCTCGcT ATGTTTTGTT AGCCGCTCTT AGCGGTGCGAG ATGAATTCGG ATGTTCTGCA
301 GCCCTCAGAC GCGTGACAGG TGAATTCATG AGCAAGGTAT TCGTcAGCAT CGGCCTTAGC
361 TTGATGGCTA CATGGCGCCG GAAGGGATGA CCATGGACGA TCCCAGACAC AagAACTGGG
421 GAGCCAAATG GGGTGCATG ATGGGCTGGC TGATCACATC GCAGTATTTc CGCGAGAACG
481 TGCTCAAGCT CGCATCGGGT GGTACTACC GCCC GGTCaA CGACCTGGTC CGCAGCACCT
541 TCGCGCGCAT CGGCGCCAAC ATCATGGGCA AGcGGATGTT CGACCAAGG GAGGTTGCCT
601 GGCCAGAGGA GGCTCCGTT CACACCCGG TCTACGTGCT GACCCAGAA AACCCGAGC
661 CCTGGGTGCG TCCCGGCGGC ACAGACCTTC ACTTCATCAA CGACGGGCGG GAGCATGCGC
721 TGGAAGTGGC TCGCGAATCG GCTGGCAGCg CGATGTTTCGG ATTGCCGGtG GCGCAGATCT
781 GATCCaGCAG TATCTGAtGC TTGGGCGTGT CGACGaGCTG GgAGATTGCG TTGGcACCGg
841 TATTGTTTTCG GCGGCGGACG ACGTCTGTTC GAAACACCTT GGCGAGCCCC cgACACAATT
901 TCGTATCGAC AGGGTGTGTTG GATGGGCTG CGCCACCCCA CCTgCGCTAT GTGCGGCAgT
961 GAGCCGAGGC CTGGcTCATA CACTTAGGTG CGAGgCGCCC AAGTCACTTa TT

```

Sequenzähnlichkeiten: --

1.5 *Legionella pneumophila* Corby Sequenz (941 bp)

```

1 CCAATAACTT TATTTGTTCA ATTTCTTCTT TAGTTAGCGG TTTCTTCTCC AGCTTCTTGG
61 TTTTATCATT CATTACAGGT CGATTATCTA CCAANCCGA ACCGACNNGC GTTTTATTGT
121 TCCTGGCTGA TTTTATAGTAT GACTTATTGT TTTGTCCAAT TCGAAATTTT TAGTGGTTTG
181 CATGCGAACA TCCTTTGCCT GCATTTGATC TGACGATGTT TGTGAGGTA AGTTAATTTG
241 CGCTTGCATT TTGTTGAGGA TTATTTTTTT GCCCAAGAGA ACTATTTGCT TGAGGAGTAT
301 TTGATAATGT CCCAGGAACC CCGCTTGCTT CATTGACGC ATTACGACT TCTTGCAATAG
361 TTTGGTTCGC TCGGTAAAGC GGAGAGCTCC GGATTGAACA ATTCTTGAGT TTGTTCATAG

```


	141	151	161	171	181	191	201	210
PAENI_2.1R	AUAACUACCG	GAAACGGUAG	CUAAUACCCG	AUACAUCUUU	UUCCUGCAUG	GGAGAAGGAG	GAAAGG.GGA	
PAENI_3a	AUAACUACCG	GAAACGGUAG	CUAAUACCCG	AUACAUCUUU	UUCCUGCAUG	GGAGAAGGAG	GAAAGGCGGA	
PAENI_3b	AUAACUACCG	GAAACGGUAG	CUAAUACCCG	AUACAUCUUU	UUCCUGCAUG	GGAGAAGGAG	GAAAGGCGGA	
PAENI_1R	AUAACUACCG	GAAACGGUAG	CUAAUACCCG	AUACAUCUUU	UUCCUGCAUG	GGAGAAGGAG	GAAAGGCGGA	
PAENI_5R	AUAACUACCG	GAAACGGUAG	CUAAUACCCG	AUACAUCUUU	UUCCUGCAUG	GGAGAAGGAG	GAAAGGCGGA	
PAENI3_cR	AUAACUACCG	GAAACGGUAG	CUAAUACCCG	AUACAUCUUU	UUCCUGUAUG	GUAGAAGGAG	GAAAGACGGA	
	211	221	231	241	251	261	271	280
PAENI_2.1R	GCAAUCUGUC	ACUUGUGGAU	GggCCUGCGG	CGCAUUAGCU	AGUUGGUGGG	GUAAAGGCCU	ACCAAGGCCG	
PAENI_3a	GCAAUCUGUC	ACUUGUGGAU	GGGCCUGCGG	CGCAUUAGCU	AGUUGGUGGG	GUAAAGGCCU	ACCAAGGCCG	
PAENI_3b	GCAAUCUGUC	ACUUGUGGAU	GGGCCUGCGG	CGCAUUAGCU	AGUUGGUGGG	GUAAAGGCCU	ACCAAGGCCG	
PAENI_1R	GCAAUCUGUC	ACUUGUGGAU	GGGCCUGCGG	CGCAUUAGCU	AGUUGGUGGG	GUAAAGGCCU	ACCAAGGCCG	
PAENI_5R	GCAAUCUGUC	ACUUGUGGAU	GGGCCUGCGG	CGCAUUAGCU	AGUUGGUGGG	GUAAAGGCCU	ACCAAGGCCG	
PAENI3_cR	GCAAUCUGUC	ACUUGUGGAU	GGGCCUGCGG	CGCAUUAGCU	AGUUGGUGGG	GUAAAGGCCU	ACCAAGGCCG	
	281	291	301	311	321	331	341	350
PAENI_2.1R	CGAUGCUGAG	CCGACCUGAG	AGGGUGAUCG	GCCACACUGG	GACUGAGACA	CGGCCACAGC	UCCUACGGGA	
PAENI_3a	CGAUGCUGAG	CCGACCUGAG	AGGGUGAUCG	GCCACACUGG	GACUGAGACA	CGGCCACAGC	UCCUACGGGA	
PAENI_3b	CGAUGCUGAG	CCGACCUGAG	AGGGUGAUCG	GCCACACUGG	GACUGAGACA	CGGCCACAGC	UCCUACGGGA	
PAENI_1R	CGAUGCUGAG	CCGACCUGAG	AGGGUGAUCG	GCCACACUGG	GACUGAGACA	CGGCCACAGC	UCCUACGGGA	
PAENI_5R	CGAUGCUGAG	CCGACCUGAG	AGGGUGAUCG	GCCACACUGG	GACUGAGACA	CGGCCACAGC	UCCUACGGGA	
PAENI3_cR	CGAUGCUGAG	CCGACCUGAG	AGGGUGAUCG	GCCACACUGG	GACUGAGACA	CGGCCACAGC	UCCUACGGGA	
	351	361	371	381	391	401	411	420
PAENI_2.1R	GGCAGCAGUA	GGGAAUCUUC	CGCAAUGGGC	GAAAGCCUGA	CGGAGCAACG	CCGCGUGAGU	GAUGAAGGUU	
PAENI_3a	GGCAGCAGUA	GGGAAUCUUC	CGCAAUGGGC	GAAAGCCUGA	CGGAGCAACG	CCGCGUGAGU	GAUGAAGGUU	
PAENI_3b	GGCAGCAGUA	GGGAAUCUUC	CGCAAUGGGC	GAAAGCCUGA	CGGAGCAACG	CCGCGUGAGU	GAUGAAGGUU	
PAENI_1R	GGCAGCAGUA	GGGAAUCUUC	CGCAAUGGGC	GAAAGCCUGA	CGGAGCAACG	CCGCGUGAGU	GAUGAAGGUU	
PAENI_5R	GGCAGCAGUA	GGGAAUCUUC	CGCAAUGGGC	GAAAGCCUGA	CGGAGCAACG	CCGCGUGAGU	GAUGAAGGUU	
PAENI3_cR	GGCAGCAGUA	GGGAAUCUUC	CGCAAUGGGC	GAAAGCCUGA	CGGAGCAACG	CCGCGUGAGU	GAUGAAGGUU	
	421	431	441	451	461	471	481	490
PAENI_2.1R	UUCGGAUCGU	AAAGCUCUGU	UGCCAGGGAA	GAACGUCUUG	-UAGAGUAAC	UGCACAAAGA	GUGACGGUAC	
PAENI_3a	UUCGGAUCGU	AAAGCUCUGU	UGCCAGGGAA	GAACGUCUUG	-UAGAGUAAC	UGCACAAAGA	GUGACGGUAC	
PAENI_3b	UUCGGAUCGU	AAAGCUCUGU	UGCCAGGGAA	GAACGUCUUG	-UAGAGUAAC	UGCACAAAGA	GUGACGGUAC	
PAENI_1R	UUCGGAUCGU	AAAGCUCUGU	UGCCAGGGAA	GAACGUCUUG	-UAGAGUAAC	UGCACAAAGA	GUGACGGUAC	
PAENI_5R	UUCGGAUCGU	AAAGCUCUGU	UGCCAGGGAA	GAACGUCUUG	-UAGAGUAAC	UGCACAAAGA	GUGACGGUAC	
PAENI3_cR	UUCGGAUCGU	AAAGCUCUGU	UGCCAGGGAA	GAACGUCUUG	-UAGAGUAAC	UGCACAAAGA	GUGACGGUAC	
	491	501	511	521	531	541	551	560
PAENI_2.1R	CUGAGAAGAA	AGCCCCGGCU	AACUACGUGC	CAGCAGCCGC	GGUAAUACGU	AGGGGGCAAG	CGUUGUCCGG	
PAENI_3a	CUGAGAAGAA	AGCCCCGGCU	AACUACGUGC	CAGCAGCCGC	GGUAAUACGU	AGGGGGCAAG	CGUUGUCCGG	
PAENI_3b	CUGAGAAGAA	AGCCCCGGCU	AACUACGUGC	CAGCAGCCGC	GGUAAUACGU	AGGGGGCAAG	CGUUGUCCGG	
PAENI_1R	CUGAGAAGAA	AGCCCCGGCU	AACUACGUGC	CAGCAGCCGC	GGUAAUACGU	AGGGGGCAAG	CGUUGUCCGG	
PAENI_5R	CUGAGAAGAA	AGCCCCGGCU	AACUACGUGC	CAGCAGCCGC	GGUAAUACGU	AGGGGGCAAG	CGUUGUCCGG	
PAENI3_cR	CUGAGAAGAA	AGCCCCGGCU	AACUACGUGC	CAGCAGCCGC	GGUAAUACGU	AGGGGGCAAG	CGUUGUCCGG	
	561	571	581	591	601	611	621	630
PAENI_2.1R	AAUUAUUGGG	CGUAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CUCUUUAAGU	CUGGUGUUUA	AUCCCGAGGC	UCAACUUCGG	
PAENI_3a	AAUUAUUGGG	CGUAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CUCUUUAAGU	CUGGUGUUUA	AUCCCGAGGC	UCAACUUCGG	
PAENI_3b	AAUUAUUGGG	CGUAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CUCUUUAAGU	CUGGUGUUUA	AUCCCGAGGC	UCAACUUCGG	
PAENI_1R	AAUUAUUGGG	CGUAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CUCUUUAAGU	CUGGUGUUUA	AUCCCGAGGC	UCAACUUCGG	
PAENI_5R	AAUUAUUGGG	CGUAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CUCUUUAAGU	CUGGUGUUUA	AUCCCGAGGC	UCAACUUCGG	
PAENI3_cR	AAUUAUUGGG	CGUAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CUCUUUAAGU	CUGGUGUUUA	AUCCCGAGGC	UCAACUUCGG	
	631	641	651	661	671	681	691	700
PAENI_2.1R	GUCGCACUGG	AAACUGGGGA	GCUUGAGUGC	AGAAGAGGAG	AGUGGAAUUC	CACGUGUAGC	GGUGAAAUGC	
PAENI_3a	GUCGCACUGG	AAACUGGGGA	GCUUGAGUGC	AGAAGAGGAG	AGUGGAAUUC	CACGUGUAGC	GGUGAAAUGC	
PAENI_3b	GUCGCACUGG	AAACUGGGGA	GCUUGAGUGC	AGAAGAGGAG	AGUGGAAUUC	CACGUGUAGC	GGUGAAAUGC	
PAENI_1R	GUCGCACUGG	AAACUGGGGA	GCUUGAGUGC	AGAAGAGGAG	AGUGGAAUUC	CACGUGUAGC	GGUGAAAUGC	
PAENI_5R	GUCGCACUGG	AAACUGGGGA	GCUUGAGUGC	AGAAGAGGAG	AGUGGAAUUC	CACGUGUAGC	GGUGAAAUGC	
PAENI3_cR	GUCGCACUGG	AAACUGGGGA	GCUUGAGUGC	AGAAGAGGAG	AGUGGAAUUC	CACGUGUAGC	GGUGAAAUGC	
	701	711	721	731	741	751	761	770
PAENI_2.1R	GUAGAGAUGU	GGAGGAACAC	CAGUGGCGAA	GGCGACUCUC	UGGGCUGUAA	CUGACGCUGA	GGCGCGAAAG	
PAENI_3a	GUAGAGAUGU	GGAGGAACAC	CAGUGGCGAA	GGCGACUCUC	UGGGCUGUAA	CUGACGCUGA	GGCGCGAAAG	
PAENI_3b	GUAGAGAUGU	GGAGGAACAC	CAGUGGCGAA	GGCGACUCUC	UGGGCUGUAA	CUGACGCUGA	GGCGCGAAAG	
PAENI_1R	GUAGAGAUGU	GGAGGAACAC	CAGUGGCGAA	GGCGACUCUC	UGGGCUGUAA	CUGACGCUGA	GGCGCGAAAG	
PAENI_5R	GUAGAGAUGU	GGAGGAACAC	CAGUGGCGAA	GGCGACUCUC	UGGGCUGUAA	CUGACGCUGA	GGCGCGAAAG	
PAENI3_cR	GUAGAGAUGU	GGAGGAACAC	CAGUGGCGAA	GGCGACUCUC	UGGGCUGUAA	CUGACGCUGA	GGCGCGAAAG	

	771	781	791	801	811	821	831	840
PAENI_2.1R	CGUGGGGAGC	AAACAGGAUU	AGAUACCCUG	GUAGUCCACG	CCGUAAACGA	UGAAUGCUAG	GUGUUAGGGG	
PAENI_3a	CGUGGGGAGC	AAACAGGAUU	AGAUACCCUG	GUAGUCCACG	CCGUAAACGA	UGAAUGCUAG	GUGUUAGGGG	
PAENI_3b	CGUGGGGAGC	AAACAGGAUU	AGAUACCCUG	GUAGUCCACG	CCGUAAACGA	UGAAUGCUAG	GUGUUAGGGG	
PAENI_1R	CGUGGGGAGC	AAACAGGAUU	AGAUACCCUG	GUAGUCCACG	CCGUAAACGA	UGAAUGCUAG	GUGUUAGGGG	
PAENI_5R	CGUGGGGAGC	AAACAGGAUU	AGAUACCCUG	GUAGUCCACG	CCGUAAACGA	UGAAUGCUAG	GUGUUAGGGG	
PAENI3_cR	CGUGGGGAGC	AAACAGGAUU	AGAUACCCUG	GUAGUCCACG	CCGUAAACGA	UGAAUGCUAG	GUGUUAGGGG	
	841	851	861	871	881	891	901	910
PAENI_2.1R	UUUCGAUACC	CUUGGUGCCG	AAGUUAACAC	AUUAAGCAUU	CCGCCUGGGG	AGUACGGUCG	CAAGACUGAA	
PAENI_3a	UUUCGAUACC	CUUGGUGCCG	AAGUUAACAC	AUUAAGCAUU	CCGCCUGGGG	AGUACGGUCG	CAAGACUGAA	
PAENI_3b	UUUCGAUACC	CUUGGUGCCG	AAGUUAACAC	AUUAAGCAUU	CCGCCUGGGG	AGUACGGUCG	CAAGACUGAA	
PAENI_1R	UUUCGAUACC	CUUGGUGCCG	AAGUUAACAC	AUUAAGCAUU	CCGCCUGGGG	AGUACGGUCG	CAAGACUGAA	
PAENI_5R	UUUCGAUACC	CUUGGUGCCG	AAGUUAACAC	AUUAAGCAUU	CCGCCUGGGG	AGUACGGUCG	CAAGACUGAA	
PAENI3_cR	UUUCGAUACC	CUUGGUGCCG	AAGUUAACAC	AUUAAGCAUU	CCGCCUGGGG	AGUACGGUCG	CAAGACUGAA	
	911	921	931	941	951	961	971	980
PAENI_2.1R	ACUCAAGGA	AUUGACGGGG	ACCCGCACAA	GCAGUGGAGU	AUGUGGUUUA	AUUCGAAGCA	ACGCGAAGAA	
PAENI_3a	ACUCAAGGA	AUUGACGGGG	ACCCGCACAA	GCAGUGGAGU	AUGUGGUUUA	AUUCGAAGCA	ACGCGAAGAA	
PAENI_3b	ACUCAAGGA	AUUGACGGGG	ACCCGCACAA	GCAGUGGAGU	AUGUGGUUUA	AUUCGAAGCA	ACGCGAAGAA	
PAENI_1R	ACUCAAGGA	AUUGACGGGG	ACCCGCACAA	GCAGUGGAGU	AUGUGGUUUA	AUUCGAAGCA	ACGCGAAGAA	
PAENI_5R	ACUCAAGGA	AUUGACGGGG	ACCCGCACAA	GCAGUGGAGU	AUGUGGUUUA	AUUCGAAGCA	ACGCGAAGAA	
PAENI3_cR	ACUCAAGGA	AUUGACGGGG	ACCCGCACAA	GCAGUGGAGU	AUGUGGUUUA	AUUCGAAGCA	ACGCGAAGAA	
	981	991	1001	1011	1021	1031	1041	1050
PAENI_2.1R	CCUUACCAGG	UCUUGACAUC	CCUCUGACCG	GUCUAGAGAU	AGG--CCUUU	CCUUCGGGAC	AGAGGAGACA	
PAENI_3a	CCUUACCAGG	UCUUGACAUC	CCUCUGACCG	GUCUAGAGAU	AGG--CCUUU	CCUUCGGGAC	AGAGGAGACA	
PAENI_3b	CCUUACCAGG	UCUUGACAUC	CCUCUGACCG	GUCUAGAGAU	AG-AU-CUUU	CCUUCGGGAC	AGAGGAGACA	
PAENI_1R	CCUUACCAGG	UCUUGACAUC	CCUCUGACCG	GUCUAGAGAU	AGG--CCUUU	CCUUCGGGAC	AGAGGAGACA	
PAENI_5R	CCUUACCAGG	UCUUGACAUC	CCUCUGACCG	GUCUAGAGAU	AGGA-CCUUU	CCUUCGGGAC	AGAGGAGACA	
PAENI3_cR	CCUUACCAGG	UCUUGACAUC	CCUCUGACCG	GUCUCGAGAU	A-GA-CCUUU	CCUUCGGGAC	AGAGGAGACA	
	1051	1061	1071	1081	1091	1101	1111	1120
PAENI_2.1R	GGUGGUGCAU	GGUUGUCGUC	AGCUCGUGUC	GUGAGAUGUU	GGGUUAAGUC	CCGCAACGAG	CGCAACCCUU	
PAENI_3a	GGUGGUGCAU	GGUUGUCGUC	AGCUCGUGUC	GUGAGAUGUU	GGGUUAAGUC	CCGCAACGAG	CGCAACCCUU	
PAENI_3b	GGUGGUGCAU	GGUUGUCGUC	AGCUCGUGUC	GUGAGAUGUU	GGGUUAAGUC	CCGCAACGAG	CGCAACCCUU	
PAENI_1R	GGUGGUGCAU	GGUUGUCGUC	AGCUCGUGUC	GUGAGAUGUU	GGGUUAAGUC	CCGCAACGAG	CGCAACCCUU	
PAENI_5R	GGUGGUGCAU	GGUUGUCGUC	AGCUCGUGUC	GUGAGAUGUU	GGGUUAAGUC	CCGCAACGAG	CGCAACCCUU	
PAENI3_cR	GGUGGUGCAU	GGUUGUCGUC	AGCUCGUGUC	GUGAGAUGUU	GGGUUAAGUC	CCGCAACGAG	CGCAACCCUU	
	1121	1131	1141	1151	1161	1171	1181	1190
PAENI_2.1R	AUGCUIAGUU	GCCAGCAGGU	CAAGCUGGGC	ACUCUAAGCA	GACUGCCGGU	GACAAACCGG	AGGAAGGUGG	
PAENI_3a	AUGCUIAGUU	GCCAGCAGGU	CAAGCUGGGC	ACUCUAAGCA	GACUGCCGGU	GACAAACCGG	AGGAAGGUGG	
PAENI_3b	AUGCUIAGUU	GCCAGCAGGU	CAAGCUGGGC	ACUCUAAGCA	GACUGCCGGU	GACAAACCGG	AGGAAGGUGG	
PAENI_1R	AUGCUIAGUU	GCCAGCAGGU	CAAGCUGGGC	ACUCUAAGCA	GACUGCCGGU	GACAAACCGG	AGGAAGGUGG	
PAENI_5R	AUGCUIAGUU	GCCAGCAGGU	CAAGCUGGGC	ACUCUAAGCA	GACUGCCGGU	GACAAACCGG	AGGAAGGUGG	
PAENI3_cR	AUGCUIAGUU	GCCAGCAGGU	CAAGCUGGGC	ACUCUAAGCA	GACUGCCGGU	GACAAACCGG	AGGAAGGUGG	
	1191	1201	1211	1221	1231	1241	1251	1260
PAENI_2.1R	GGAUGACGUC	AAAUCAUCAU	GCCCCUUAUG	ACCUGGGCUA	CACACGUACU	ACAAUGGCCG	GUACAACGGG	
PAENI_3a	GGAUGACGUC	AAAUCAUCAU	GCCCCUUAUG	ACCUGGGCUA	CACACGUACU	ACAAUGGCCG	GUACAACGGG	
PAENI_3b	GGAUGACGUC	AAAUCAUCAU	GCCCCUUAUG	ACCUGGGCUA	CACACGUACU	ACAAUGGCCG	GUACAACGGG	
PAENI_1R	GGAUGACGUC	AAAUCAUCAU	GCCCCUUAUG	ACCUGGGCUA	CACACGUACU	ACA.UGGCCG	GUACAACGGG	
PAENI_5R	GGAUGACGUC	AAAUCAUCAU	GCCCCUUAUG	ACCUGGGCUA	CACACGUACU	ACAAUGGCCG	GUACAACGGG	
PAENI3_cR	GGAUGACGUC	AAAUCAUCAU	GCCCCUUAUG	ACCUGGGCUA	CACACGUACU	ACAAUGGCCG	GUACAACGGG	
	1261	1271	1281	1291	1301	1311	1321	1330
PAENI_2.1R	AAGCGAAGCC	GCGAGGCGGA	GCCAAUCCUA	GAAAAGCCGG	UCUCAGUUCG	GAUUGUAGGC	UGCAACUCGC	
PAENI_3a	AAGCGAAGCC	GCGAGGCGGA	GCCAAUCCUA	GAAAAGCCGG	UCUCAGUUCG	GAUUGUAGGC	UGCAACUCGC	
PAENI_3b	AAGCGAAGGA	GCGAUCUGGA	GCCAAUCCUA	GAAAAGCCGG	UCUCAGUUCG	GAUUGUAGGC	UGCAACUCGC	
PAENI_1R	AAGCGAAAUC	GCGAGGUGGA	GCCAAUCCUA	GAAAAGCCGG	UCUCAGUUCG	GAUUGUAGGC	UGCAACUCGC	
PAENI_5R	AAGCGAAGCC	GCGAGGUGGA	GCCAAUCCUA	GAAAAGCCGG	UCUCAGUUCG	GAUUGUAGGC	UGCAACUCGC	
PAENI3_cR	AAGCGAAGCC	GCGAGGUGGA	GCCAAUCCUA	GAAAAGCCGG	UCUCAGUUCG	GAUUGUAGGC	UGCAACUCGC	

	1331	1341	1351	1361	1371	1381	1391	1400
PAENI_2.1R	CUACAUGAAG	UCGGAAUUGC	UAGUAAUCGC	GGAUCAGCAU	GCCGCGGUGA	AUACGUUCCC	GGGUCUUGUA	
PAENI_3a	CUACAUGAAG	UCGGAAUUGC	UAGUAAUCGC	GGAUCAGCAU	GCCGCGGUGA	AUACGUUCCC	GGGUCUUGUA	
PAENI_3b	CUACAUGAAG	UCGGAAUUGC	UAGUAAUCGC	GGAUCAGCAU	GCCGCGGUGA	AUACGUUCCC	GGGUCUUGUA	
PAENI_1R	CUACAUGAAG	UCGGAAUUGC	UAGUAAUCGC	GGAUCAGCAU	GCCGCGGUGA	AUACGUUCCC	GGGUCUUGUA	
PAENI_5R	CUACAUGAAG	UCGGAAUUGC	UAGUAAUCGC	GGAUCAGCAU	GCCGCGGUGA	AUACGUUCCC	GGGUCUUGUA	
PAENI3_cR	CUACAUGAAG	UCGGAAUUGC	UAGUAAUCGC	GGAUCAGCAU	GCCGCGGUGA	AUACGUUCCC	GGGUCUUGUA	
	1401	1411	1421	1431	1441	1451	1461	1470
PAENI_2.1R	CACACCGCCC	GUCACACCAC	GAGAGUUUAC	AA.....
PAENI_3a	CACACCGCCC	GUCACACCAC	GAGAGUUUAC	AACACCCGAA	GUCGGUGAGG	UAACCGCAAG	GAGCCAGCCG	
PAENI_3b	CACACCGCCC	GUCACACCAC	GAGAGUU...	
PAENI_1R	CACACCGCCC	GUCACACCAC	GAGAGUUUAC	AACACCCGAA	GUCGGUGAGG	UAACCGCAAG	GAGCCAGCCG	
PAENI_5R	CACACCGCCC	GUCACACCAC	GAGAGUUUAC	AACACCCGAA	GUCGGUGAGG	UAACCGCAAG	GAGCCAGCCG	
PAENI3_cR	CACACCGCCC	GUCACACCAC	GAGAGUUUAC	AACACCCGAA	GUCGGUGAGG	
	1471	1481	1491	1501	1511	1521	1531	1540
PAENI_2.1R
PAENI_3a	CCGAAGUGUG	GGUAGAUGAU	UGGGGUGAAG	UCGUAACAAG	.UAGCCGUAU	CGGAAGGUGC	GGCUGGAUCA	
PAENI_3b	
PAENI_1R	CCGAAGUGUG	GAUAGAUGAU	UGGGGUGAAG	UCGUAACAAG	GUAGCCGUAU	CGGAAGGUGC	GGCUGGAUCA	
PAENI_5R	CCGAAGUGUG	GGUAGAUGAU	UGGGGUGAAG	UCGUAACAAG	GUAGCCGUAU	CGGAAGGUGC	GGCUGGAUCA	
PAENI3_cR	
	1541	1551	1561					
PAENI_2.1R					
PAENI_3a	CCUCCUUUCU	AUGGAGAAUC	GUUU					
PAENI_3b					
PAENI_1R	CCUCCUUUCU	AUGGAGAAUC	GUUU					
PAENI_5R	CCUCCUUUCU	AUGGAGAAUC	GUUU					
PAENI3_cR					

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer im Zeitraum von November 1999 bis Juni 2003 angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können und das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Ludwig für die gute Betreuung und fachliche Unterstützung.

Dr. Michael Steinert, Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der Legionellen-DNS.

Dr. Georg Poschenrieder, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in Freising, für die Bereitstellung zahlreicher *Xanthomonas* Isolaten sowie für die Informationen zu den *Xanthomonas* Stämmen.

Dr. Christian Lück, Konsiliarlaboratorium für Legionellen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden, für die Unterstützung in Form zahlreicher PCR-Reaktionen.

Dr. Thomas Behr für all seine wertvollen Ratschläge, seine große Hilfsbereitschaft und die wunderbare Zusammenarbeit.

Katie Fichtl, Johannes Fried, Giulio Petroni, Barbara Wunner-Füßl, Johannes Zimmermann und Katrin Zwirgmaier für ihre Hilfsbereitschaft und für alle fachlichen Diskussionen.

Martin Pillhofer für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

allen Angehörigen des Iso-Labors für die schöne Zeit am Lehrstuhl und die zahlreichen Unternehmungen.

meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung in all den Jahren.