

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

**Entwicklung und Anwendung von
in situ-Hybridisierungsmethoden
für Cyanobakterien**

Wilhelm Schönhuber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie
und Geowissenschaften 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. Priv.-Doz. Dr. R. Amann
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Die Dissertation wurde am 26.10.98 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften am
12.11.98 angenommen.

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Schönhuber, Wilhelm:

Entwicklung und Anwendung von *in situ*-Hybridisierungsmethoden
für Cyanobakterien / Wilhelm Schönhuber. - 1. Aufl. - Konstanz :
Hartung-Gorre, 1999

Zugl.: München, Techn. Univ., Diss., 1998

ISBN 3-89649-452-X

Alle Rechte beim Autor

Erste Auflage 1999

HARTUNG-GORRE VERLAG
KONSTANZ

ISBN 3-89649-452-X

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Material und Methoden | 9 |
| 2.1 | Verwendete Organismen | 9 |
| 2.1.1 | Cyanobakterien | 9 |
| 2.1.2 | Andere Organismen | 10 |
| 2.1.3 | Anzucht von Bakterien | 10 |
| 2.2 | Fixierung von Zellen | 10 |
| 2.2.1 | Fixierung mit Ethanol | 11 |
| 2.2.2 | Fixierung mit Paraformaldehyd | 11 |
| 2.3 | Extraktion von Nukleinsäuren für anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) nach der „Freeze-Thaw“-Methode | 12 |
| 2.4 | Amplifizierung von ribosomalen RNS-Genen (rDNS) | 12 |
| 2.4.1 | PCR-Reaktion | 13 |
| 2.4.2 | Analyse der Amplifikate | 15 |
| 2.4.3 | Aufreinigung der PCR-Amplifikate | 17 |
| 2.5 | Nichtradioaktive Sequenzanalyse von DNS-Molekülen nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll | 17 |
| 2.6 | Auswertung der Sequenzdaten und Konstruktion von Sonden | 18 |
| 2.6.1 | Vergleichende Anordnung der Sequenzen (Alignment) | 18 |
| 2.6.2 | Rekonstruktion von Stammbäumen | 19 |
| 2.6.3 | Konstruktion von gegen 16S rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden | 19 |
| 2.7 | Meerrettichperoxidase-Markierung von Oligonukleotiden | 20 |
| 2.7.1 | Aktivierung des Oligonukleotids und Kopplung der Meerrettichperoxidase (POD) | 20 |
| 2.7.2 | Aufreinigung | 21 |
| 2.7.3 | Aufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung | 22 |
| 2.8 | Fluoreszenz-Markierung von Oligonukleotiden | 24 |
| 2.8.1 | Markierungsreaktion | 24 |
| 2.8.2 | Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffes | 25 |
| 2.8.3 | Abtrennung des unmarkierten Oligonukleotidanteils | 25 |
| 2.8.4 | Abtrennung von Salzen | 26 |
| 2.8.5 | Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide | 27 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.9 | Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Oligonukleotiden | 27 |
| 2.9.1 | Membranhybridisierungen | 29 |
| 2.9.2 | Ganzzellhybridisierung | 31 |
| 2.9.3 | Nichtfluoreszierender Nachweis der Meerrettichperoxidase-markierten Sonden | 32 |
| 2.9.3.1 | 4-Triethylentrioxo-1-naphthol | 32 |
| 2.9.3.2 | DAB-Substrat | 33 |
| 2.9.4 | Chemilumineszenznachweis | 33 |
| 2.9.5 | Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) als fluoreszierender Nachweis POD-markierter Sonden | 33 |
| 2.9.6 | Vorbehandlungen | 35 |
| 2.10 | Doppelhybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden | 37 |
| 2.11 | Ganzzellhybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden | 37 |
| 2.12 | Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse | 39 |
| 2.12.1 | Konventionelle Licht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskopie | 39 |
| 2.12.2 | Konfokale Laserscanning-Mikroskopie | 40 |
| 2.13 | Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen | 41 |
| 2.13.1 | Quantifizierung mittels mikroskopgestützter Bildverarbeitung | 41 |
| 2.13.1.1 | Voreinstellung der Parameter zur Bildaufnahme | 41 |
| 2.13.1.2 | Aufnahme der Bilder | 42 |
| 2.13.1.3 | Auswerten der Bilder | 42 |
| 2.13.2 | Quantifizierung mittels Durchflußzytometer | 42 |
| 2.13.2.1 | Prinzip der Durchflußzytometrie | 42 |
| 2.13.2.2 | Verwendetes Gerät | 44 |
| 2.13.2.3 | Ganzzellhybridisierung in Flüssigkeit | 44 |
| 3 | Ergebnisse | 47 |
| 3.1 | Hybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden | 47 |
| 3.1.1 | Nichtfluoreszierender Nachweis | 47 |
| 3.1.2 | Chemilumineszenznachweis | 48 |
| 3.1.2.1 | Membranhybridisierungen | 48 |
| 3.1.2.2 | Ganzzellhybridisierungen | 49 |
| 3.1.3 | Steigerung der Sensitivität von Ganzzellhybridisierungen durch Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) | 50 |
| 3.1.3.1 | Spezifität und Anwendbarkeit | 50 |
| 3.1.3.2 | Quantifizierung der Signalstärken über Bildverarbeitung | 55 |
| 3.1.3.3 | Quantifizierungen mit dem Durchflußzytometer | 57 |
| 3.1.3.4 | Anwendbarkeit bei Umweltproben | 58 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2 | Ganzzellhybridisierung von Cyanobakterien | 60 |
| 3.2.1 | Entwicklung von cyanobakterienspezifischen, 16S rRNS-gerichteten Sonden | 61 |
| 3.2.2 | Membranhybridisierungen | 64 |
| 3.2.3 | Ganzzellhybridisierungen | 68 |
| 3.2.3.1 | Nichtfluoreszierender Nachweis | 68 |
| 3.2.3.2 | Nachweis mit Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) | 68 |
| 3.2.3.3 | Austesten der Spezifität der Sonden | 69 |
| 3.2.4 | Nachweis von <i>Prochlorococcus marinus</i> | 72 |
| 3.3 | Sequenzierung der 16S rRNS von Cyanobakterien und vergleichende Sequenzanalyse | 77 |
| 3.3.1 | <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7001 | 78 |
| 3.3.2 | <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335 | 78 |
| 3.3.3 | <i>Chroococcus</i> sp. PCC 9340 | 79 |
| 3.3.4 | <i>Crinalium epipsammum</i> PCC 9333 | 79 |
| 3.3.5 | <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7112 | 79 |
| 4 | Diskussion | 83 |
| 4.1 | Hybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden | 83 |
| 4.1.1 | Nichtfluoreszierende Detektion | 83 |
| 4.1.2 | Nachweis über Chemilumineszenz | 84 |
| 4.1.3 | Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) | 85 |
| 4.1.3.1 | Spezifität der Tyramid-Signal-Amplifikation | 87 |
| 4.1.3.2 | Quantifizierung der Signalstärken bei <i>E. coli</i> -Zellen mit Hilfe der Bildverarbeitung | 87 |
| 4.1.3.3 | Quantifizierung über das Durchflußzytometer | 90 |
| 4.1.3.4 | Anwendbarkeit in Umweltproben | 90 |
| 4.1.3.5 | Andere Anwendungen für TSA bei Bakterien | 91 |
| 4.1.4 | Vergleich nichtfluoreszierender Nachweis/Tyramid-Signal-Amplifikation | 91 |
| 4.2 | Hybridisierungen von Cyanobakterien | 92 |
| 4.2.1 | Cyanobakterienspezifische Sonden | 92 |
| 4.2.1.1 | Austesten durch Membranhybridisierungen | 92 |
| 4.2.1.2 | Ganzzellhybridisierungen | 92 |
| 4.2.2 | Cyanobakterien in Umweltproben | 95 |
| 4.2.3 | Ganzzellhybridisierungen von <i>Prochlorococcus marinus</i> | 95 |
| 4.3 | Vergleichende 16S rRNS-Sequenzanalyse von Cyanobakterien | 98 |
| 4.3.1 | <i>Synechococcus</i> spp. | 100 |
| 4.3.2 | <i>Chroococcus</i> sp. PCC 9340 | 102 |
| 4.3.3 | <i>Crinalium epipsammum</i> PCC 9333 | 103 |

| | | |
|----------|------------------------------------|------------|
| 4.3.4 | <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7112 | 104 |
| 4.3.5 | Ausblick | 106 |
| 5 | <i>Zusammenfassung</i> | 107 |
| 6 | <i>Anhang</i> | 109 |
| 7 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 113 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------|--|
| A | Adenin; Ampere |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BP | Bandpaßfilter |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin, Kohlenstoff |
| CFU | Koloniebildende Einheiten |
| CV | Variationskoeffizient |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid |
| DIG | Digoxigenin |
| DITC | <i>para</i> -Phenylendiisothiocyanat |
| DMS | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| rDNS | ribosomale Desoxyribonukleinsäure |
| ds | doppelsträngig |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ERG | Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| EtOH | Ethanol |
| FA | Formamid |
| FISH | Fluoreszierende <i>in situ</i> -Hybridisierung |
| FLUOS | 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester |
| g | Gramm, Fallbeschleunigung |
| G | Guanin |
| G+C | Mol% Guanin und Cytosin |
| GDal | Gigadalton |
| h | Stunde(n) |
| HCl | Salzsäure |
| H ₂ O _{dest.} | destilliertes Wasser |
| H ₂ O | destilliertes, über Ionenaustauscher gereinigtes, filtriertes Wasser |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| Kb | Kilobasen |
| l | Liter |
| LP | Langpaßfilter |
| m | Milli (10 ⁻³); Meter |
| M | Molar |

| | |
|-----------------|--|
| μ | Mikro (10 ⁻⁶) |
| min | Minute(n) |
| n | Nano (10 ⁻⁹) |
| NS | Nukleinsäure |
| OD _x | optische Dichte bei der Wellenlänge x nm |
| Pa | Pascal |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| POD | Meerrettichperoxidase |
| RNase | Ribonuklease |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rRNS | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Svedberg, Standardabweichung |
| s | Sekunde(n) |
| ss | einzelsträngig |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SSC | Standard Saline Citrat |
| T | Thymin |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TETON | 4-Triethylentrioxo-1-naphthol |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodaminisothiocyanat |
| TSA | Tyramid-Signal-Amplifikation |
| TUM | Technische Universität München |
| U | Einheiten, Uracil |
| ÜN | über Nacht |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen/Volumen |
| W | Watt |
| w | Gewicht |
| w/v | Masse/Volumen |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

1 Einleitung

„Kein Ding, kein Ich, keine Form, kein Grundsatz sind sicher, alles ist in einer unsichtbaren, aber niemals ruhenden Wandlung begriffen.“

ROBERT MUSIL

1988 wurde von Sallie Chisholm und Mitarbeitern ein Bakterium beschrieben, das sie während der Jahre zuvor bereits bei mehreren Forschungsfahrten mit dem Ziel der Aufklärung der Picoplanktongesellschaft in Ozeanen anhand seiner „durchflußzytometrischen Signifikanz“ beobachten konnten. Analysen nach Fluoreszenzverhalten und Seitwärtsstreulicht ließen durch rote statt orange Autofluoreszenz eine deutlich von den bisher bekannten autotrophen Prokaryonten im Picoplankton verschiedene Population erkennen, die sich vom ebenfalls rot fluoreszierenden, eukaryontischen Picoplankton durch die geringere Größe unterschied. Im Nordatlantik und Pazifik konnte diese Population nur an zwei von insgesamt 67 Beprobungsstellen nicht gefunden werden, und die Populationsgröße bewegte sich zwischen 5×10^4 und $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter Meerwasser. Die höchsten Zellzahlen wurden dabei in den tieferen Schichten der euphotischen Zone ermittelt (Chisholm *et al.*, 1988). Proben, die aus einer Tiefe von 100 Metern genommen wurden, zeigten unter dem Lichtmikroskop kleine kokkoide bis stäbchenförmige Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ließen den Unterschied zu den größeren, aber zahlenmäßig unterlegenen *Synechococcus*-Zellen deutlich werden: während bei letzteren die Thylakoide weit auseinander lagen, waren sie bei den neu entdeckten Organismen dicht gepackt (Chisholm *et al.*, 1988) und erinnerten damit an Thylakoide, wie sie bei Prochlorophyten beschrieben worden waren (Lewin, 1981). Die Analyse der Pigmentzusammensetzung über HPLC zeigte Chlorophyll *b*, Zeaxanthin, α -Carotin und Spuren eines anderen, nicht näher charakterisierten Pigments. Das Auftreten von Chlorophyll *b* wurde als weitere Bestätigung für die Zugehörigkeit der Organismen zu den Prochlorophyten gewertet (Chisholm *et al.*, 1988). Außerdem konnte ein neuer Typ von Chlorophyll *a*, das Divinyl-Chlorophyll *a* (Chisholm *et al.*, 1988; Goericke und Repeta, 1992) gefunden werden. Dieses Molekül lieferte erste Hinweise, daß die neuen Organismen wohl auch in oberen Wasserschichten auftreten können und ubiquitärer vorkommen. Für den subtropischen Atlantik (Veldhuis und Kraay, 1990) und die Sargassosee (Goericke und Repeta, 1992) konnte nämlich das Auftreten von Divinyl-

Chlorophyll *a* mit der Anwesenheit der neuen Organismen korreliert werden. So wurden frühere Berichte über das Auffinden dieses Moleküls im tropischen Atlantik und in der Bandasee in neues Licht gerückt und sprachen für eine weitere Verbreitung der picoplanktonischen Prochlorophyten als 1988 noch angenommen (Chisholm *et al.*, 1992). Direkte Beweise für diese weitere Verbreitung gab es durch Verbesserungen der Sensitivität der durchflußzytometrischen Analysen (Olson *et al.*, 1990), wodurch nicht mehr nur die pigmentreichen und daher stärker autofluoreszierenden Prochlorophyten am Grund der euphotischen Zone, sondern auch näher zur Wasseroberfläche hin vorkommende und schwächer fluoreszierende Organismen nachgewiesen werden konnten (Olson *et al.*, 1990). Campbell und Vault (1993) berichteten dann auch erstmals über zwei deutlich getrennte Populationen in verschiedenen Tiefen an einer Beprobungsstelle nahe Hawaii. Bis in eine Tiefe von etwa 80 Meter kamen ausschließlich schwach autofluoreszierende Zellen vor, in einer Übergangszone schwach und stark autofluoreszierende, und ab 140 Meter waren ausschließlich die stark fluoreszierenden zu finden. Erstmals wurde spekuliert, daß schwach und stark autofluoreszierende *Prochlorococcus*-Zellen nicht einfach Ausdruck einer physiologischen Anpassung an die gerade vorherrschenden Lichtverhältnisse waren, sondern daß vielmehr unterschiedliche Stämme, wenn nicht gar Arten, durch die Einnischung in verschiedene Standorte entstanden waren. Inzwischen konnte anhand von Isolaten gezeigt werden, daß Populationen von verschiedenen Standorten, aber gleichen Tiefenschichten, sich in ihrer 16S rRNS ähnlicher sind, als Populationen eines Standortes, aber unterschiedlicher Tiefe. Sequenzen von Isolaten aus oberflächennahen Schichten fielen nach vergleichender Sequenzanalyse in eine gemeinsame Entwicklungslinie, die als Hochlicht-adaptierte Linie bezeichnet wurde (Moore *et al.*, 1998; Urbach *et al.*, 1998). Moore und Mitarbeiter bezeichneten die an unterschiedliche Lichtverhältnisse angepaßten Populationen als „Ökotypen“ und folgerten, daß die physiologischen Unterschiede spezifisch mit den Unterschieden in der 16S rRNS verbunden sind (1998).

Doch zurück ins Jahr 1992: als erstmals über die Kultivierung der neuen Organismen berichtet wurde, und die Art- und Genusbeschreibung von *Prochlorococcus marinus* erfolgte (Chisholm *et al.*, 1992), waren sie von weiteren Arbeitsgruppen anhand ihrer „durchflußzytometrischen Signifikanz“ außer im Nordatlantik (Li und Wood, 1988; Olson *et al.*, 1990) auch im Mittelmeer (Vault *et al.*, 1990), im Pazifik (Chavez *et al.*, 1991) und im subtropischen Nordatlantik (Veldhuis und Kraay, 1990) gefunden worden. Anhand einer Kultur des

Isolats aus der Sargassosee konnte die weitgehende Übereinstimmung der Pigmentzusammensetzung (Goericke und Repeta, 1992) mit denen der ersten Proben aus der Sargassosee gezeigt werden (Chisholm *et al.*, 1988). Nur das vormals beschriebene „normale“ Chlorophyll *b* stellte sich, wie schon das Chlorophyll *a*₂, als Divinyl-Derivat heraus (Goericke und Repeta, 1992). Ebenfalls 1992 demonstrierten zwei Veröffentlichungen anhand von Sequenzen des 16S rRNS-Gens (Urbach *et al.*, 1992) und des Gens *rpoC1*, einer Untereinheit der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (Palenik und Haselkorn, 1992), die Verwandtschaft von *Prochlorococcus marinus* zu den beiden anderen bis dahin beschriebenen Prochlorophyten (Lewin, 1981), nämlich *Prochloron didemni* (Lewin, 1977; Florenzano *et al.*, 1986) und *Prochlorothrix hollandica* (Burger-Wiersma *et al.*, 1989). Beide Forschergruppen kamen überein, daß die Prochlorophyten keine monophyletisch einheitliche Gruppe inner- oder sogar außerhalb der Cyanobakterien darstellen, und auch keiner der drei Organismen ein direkter Vorfahre der Chloroplasten sein kann, mit denen sie das Vorhandensein von Chlorophyll *b* bzw. *b*₂ teilen. Urbach und Mitarbeiter schlugen 1992 vor, die Ordnung Prochlorales (Florenzano *et al.*, 1986; Burger-Wiersma *et al.*, 1989), die aufgrund dieser phylogenetischen Untersuchungen keine natürliche Gruppierung darstellt, als solche aufzugeben und die Prochlorophyten taxonomisch zu den Cyanobakterien zu zählen.

Hinsichtlich einer rein phänotypischen Charakterisierung bei Bakterien zeigt dieses Beispiel zwei Dinge. Zum einen ist es durchaus möglich, bei Bakterien Eigenschaften zu finden, die die Beschreibung einer neuen Art zulassen, auf der anderen Seite ermöglichen diese Eigenschaften nicht unbedingt die Klassifizierung nach den natürlichen Verwandtschaftsverhältnissen. Bei den Cyanobakterien schien es allerdings über lange Zeit möglich, ein natürliches Klassifizierungssystem nach phänotypischen – vor allem morphologischen – Eigenschaften aufzustellen. Grund dafür war die hohe Diversität innerhalb dieser Organismengruppe. Zunächst von den Botanikern vereinnahmt, wurden die damals „Cyanophyceae“ genannten Cyanobakterien von Geitler 1932 aufgrund von Formenvielfalt und Größenunterschieden in einer Flora mit mehr als 2.000 Arten klassifiziert. Castenholz schlug noch 1992 vor, den Artnamen entsprechend dieses Bestimmungsschlüssels „*sensu* Geitler 1932“ anzugeben. Zumindest der morphologische Phänotyp sei dadurch festgelegt und für den Leser überprüfbar, allerdings bliebe weiter im unklaren, inwieweit der Genotyp eines damaligen und eines neuen Organismus übereinstimmen, und inwieweit daher beide Organismen wirklich verwandt seien. Abgesehen davon, daß Geitler seine Flora in Deutsch verfaßt hätte,

seien auch viele neue Arten seit 1932 beschrieben worden (Castenholz, 1992). Als dann in den 70er Jahren Neugruppierungen der verschiedenen Cyanobakterien durch Mikrobiologen erfolgten (Stanier *et al.*, 1971; Waterbury und Stanier, 1978; Rippka *et al.*, 1979), bzw. diese in den späten 80er und Anfang der 90er Jahre modifiziert und auf den neuesten Stand gebracht wurden (Rippka, 1988; Castenholz, 1989; Waterbury und Rippka, 1989; Waterbury, 1989; Waterbury, 1992; Whitton, 1989), wurden neben den morphologischen auch physiologische, biochemische und genetische Eigenschaften in die Klassifizierung einbezogen. Als Alternative zu den von den Botanikern übernommenen Ordnungen definierten Rippka und Mitarbeiter (1979) bzw. Rippka und Herdman (1992) sogenannte Sektionen, um den provisorischen Charakter ihrer Klassifizierung zu unterstreichen. In jedem Fall erfolgte die Klassifizierung nur auf Gattungsebene. Es wurden fast ausschließlich Organismen aus Stammsammlungen verwendet, und statt eines Artnamens wurden nur Stammnummern angegeben. Gleichzeitig wird aber geschätzt, daß nur etwa 10% der potentiellen Gattungen und weniger als 5% der Arten an Cyanobakterien in Kultur vorliegen (Castenholz, 1992), so daß dieses neue System als am Anfang stehend und mit der Kultivierung neuer Organismen wachsend, nicht jedoch als abgeschlossen bezeichnet werden kann. Und auch wenn der Schritt von einem rein morphologischen Klassifizierungssystem zu einem, bei dem darüber hinaus weitere phänotypische und auch genotypische Eigenschaften eine Rolle spielen, nun vollzogen ist, scheint dieses System von der Wirklichkeit überholt worden zu sein, seit mehr und mehr auch bei den Cyanobakterien eine auf vergleichende 16S rRNS-Sequenzanalyse basierende, phylogenetische Einordnung angestrebt wird (Giovannoni *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1989; Giovannoni *et al.*, 1990; Willmote *et al.*, 1994; Nelissen *et al.*, 1995; Nelissen *et al.*, 1996; Palinska *et al.*, 1996; Neilan *et al.*, 1997; Rudi *et al.*, 1997; Garcia-Pichel *et al.*, 1998), weil deutlich wurde, daß die ausgewählten Eigenschaften zur Klassifizierung nicht ausreichten, um eine stabile, auf natürlichen Verwandtschaftsverhältnissen basierende Ordnung aufzubauen. Ein 1994 von Willmote veröffentlichter Stammbaum der Cyanobakterien auf der Basis von 16S rRNS-Sequenzen zeigt die teilweise uneinheitliche Morphologie innerhalb der verschiedenen Verwandtschaftsgruppen (Abbildung 1.1).

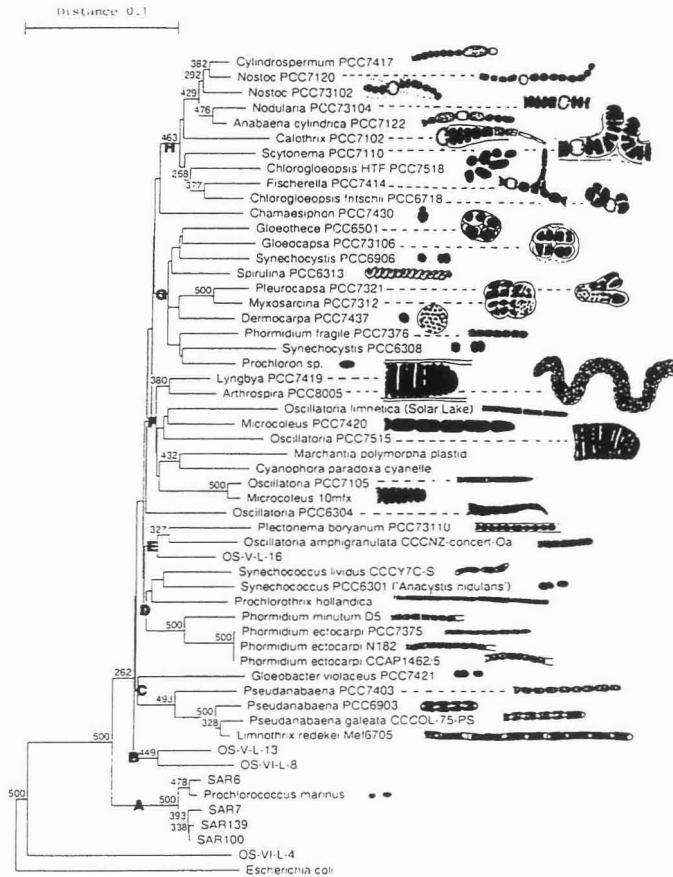


Abbildung 1.1: Auf 16S rRNS-Sequenzen basierender Stammbaum der Cyanobakterien (Wilmutte, 1994). Neben den Stämmen sind schematisch die entsprechenden Morphologien angegeben.

Schon etwas länger hat sich die vergleichende 16S rRNS-Analyse innerhalb der Mikrobiologie etabliert (Woese, 1987). Denn bei einer im Unterschied zu den Cyanobakterien verschwindend geringen morphologischen Diversität, war es zuvor einfach unmöglich, auch nur im Ansatz ein natürliches System der Verwandtschaftsverhältnisse zu entwerfen. Eingeführt wur-

de die vergleichende 16S rRNS-Analyse von Woese und seinen Mitarbeitern (Fox *et al.*, 1977; Woese, 1987). War zunächst die Aufklärung der Evolution von Bakterien und damit das Aufstellen eines taxonomischen Systems der Auslöser dieser Untersuchungen, wird die vergleichende Sequenzanalyse heute auch immer mehr ein Teil des sogenannten polyphasischen Ansatzes für die Neubeschreibung von Arten und dient darüber hinaus zur Identifizierung von Mikroorganismen (Ludwig *et al.*, 1998). Besonders wichtig für die Identifizierung sind die sogenannten diagnostischen Regionen (Ludwig und Schleifer, 1994). Es handelt sich dabei um Bereiche der 16S rRNS, deren Primärstruktur innerhalb bestimmter Abstammungslinien konserviert ist, aber Unterschiede zu anderen Gruppen aufweist. Diagnostische Regionen werden als spezifische Primerbindungsstellen für Polymerasekettenreaktionen oder Sondenbindungsstellen für Nukleinsäurehybridisierungen zur Detektion bestimmter Organismengruppen oder einzelner Organismen eingesetzt.

Bei diesen Nukleinsäurehybridisierungen paaren sich spezifisch zwei komplementäre Nukleinsäurestränge unter Ausbildung eines doppelsträngigen Hybrids (Schleifer *et al.*, 1993). Wählt man nun ein Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu einer diagnostischen Region der 16S rRNS ist und markiert dieses, kann nach der Hybridisierung anhand der Markierung die Hybridbildung detektiert werden. Über die Anwesenheit der diagnostischen Region kann dann ein Rückschluß auf das Vorhandensein entsprechender Organismen gezogen werden. 1988 gelang es für Bakterien erstmals, diese Hybridisierung *in situ*, d.h., in einzelnen Zellen, und nicht, wie bis dahin üblich, an extrahierten Nukleinsäuren durchzuführen (Giovannoni *et al.*, 1988). Radioaktiv markierte, gegen die 16S rRNS-gerichtete Oligonukleotide wurden nach der Hybridisierung ganzer, fixierter Zellen durch Mikroautoradiographie auf Einzelzellniveau detektiert. Entscheidend war dabei, daß die in der kleinen Untereinheit der Ribosomen gebundene 16S rRNS in hohen Kopienzahlen (ca. 10^3 - 10^5) vorlag (Amann *et al.*, 1995), und somit eine ausreichend hohe Menge an Zielmolekülen für die Hybridbildung zur Verfügung stand. Die Entwicklung und Anwendung fluoreszenzmarkierter Sonden und die damit verbundene schnellere und höher auflösende mikroskopische Auswertung der Hybridisierungssignale (DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990) war die Voraussetzung für die weitere Verbreitung der *in situ*-Hybridisierung (Amann *et al.*, 1995). Insbesondere bei quantitativen *in situ*-Populationsanalysen findet diese Methode eine häufige Anwendung. So ist es zwar auch über den sogenannten klassischen rRNS-Ansatz durch Extraktion von Nukleinsäuren und deren Sequenzierung (Stahl *et al.*, 1984; Lane *et al.*,

1985; Stahl *et al.*, 1985; Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986) möglich, die Diversität einer natürlichen Umweltprobe aufzuklären, aber immer mit der Einschränkung, daß die erhaltenen Ergebnisse nur die Häufigkeit des Auftauchens bestimmter Sequenzen angeben, aber nicht zwingenderweise die Häufigkeit des entsprechenden Organismus in der Probe widerspiegeln (Amann *et al.*, 1995). Die *in situ*-Hybridisierung kann nun zum einen den Kreis des rRNS-Ansatzes schließen, indem, basierend auf den Sequenzierungsergebnissen, neue Sonden konstruiert werden, und diese dann in der ursprünglichen Probe zur Detektion und Quantifizierung der entsprechenden Organismen eingesetzt werden (Amann *et al.*, 1997; Snaird *et al.*, 1997), zum anderen kann sie auch auf sich gestellt verlässliche Daten zu Zahl und Verteilung von Bakterien in unterschiedlicher taxonomischer Auflösung liefern. Dazu existieren heute schon viele Beispiele, vor allem aus der Analyse von Belebtschlämmen (in einer Übersicht Amann *et al.*, 1998), von Böden (Zarda *et al.*, 1997; Chatzinotas *et al.*, 1998) oder Sedimenten (Llobet-Brossa *et al.*, 1998).

Trotz einer Vielzahl erfolgreicher Anwendungen gibt es noch einige methodologische Probleme bei der *in situ*-Hybridisierung. Diese lassen sich folgendermaßen klassifizieren:

- mangelnde Sensitivität, verursacht durch zu geringe Anzahl von rRNS-Molekülen,
- Hintergrundfluoreszenz bzw. Autofluoreszenz der Zellen und
- mangelnde Permeabilisierung der Zellperipherie für Hybridisierungssonden

Aufgabe dieser Arbeit war es, vor allem anhand der natürlicherweise stark autofluoreszierenden Cyanobakterien, zur Entwicklung und Anwendung neuer Techniken der *in situ*-Hybridisierung beizutragen. Im Mittelpunkt standen dabei enzymmarkierte Oligonukleotidsonden.

2 Material und Methoden

Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde über eine Reinstwasseranlage (Milli-Q-Plus, Millipore, Eschborn, Deutschland) entsalztes und filtriertes Wasser (im folgenden als H₂O bezeichnet) verwendet. Entionisiertes Wasser (H₂O_{dest.}) wurde den Hauswasserleitungen entnommen. Sämtliche Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.A. Qualität eingesetzt.

2.1 Verwendete Organismen

2.1.1 Cyanobakterien

Folgende Cyanobakterien standen für Untersuchungen zur Verfügung:

| | | | |
|-------------------------------|-----------|--------------------------------|------------------------|
| <i>Anabaena</i> sp. | PCC 7122 | <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7112 |
| <i>Arthrospira</i> sp. | PCC 7345 | <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7515 |
| <i>Calothrix</i> sp. | PCC 7102 | <i>Pleurocapsa</i> sp. | PCC 7516 |
| <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 | <i>Prochlorococcus marinus</i> | PCC 9511 |
| <i>Chroococcus</i> sp. | PCC 7946 | <i>Prochlorococcus</i> sp. | CCMP 1375 ^T |
| <i>Chroococcus</i> sp. | PCC 9430 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | PCC 6903 |
| <i>Crinalium epipsammum</i> | PCC 9333 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | PCC 7409 |
| <i>Cyanothece</i> sp. | PCC 7424 | <i>Spirulina</i> sp. | PCC 6313 |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 7421 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6301 ^R |
| <i>Gloeocapsa</i> sp. | PCC 73106 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6307 |
| <i>Gloeotheca membranacea</i> | PCC 6501 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7001 |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. | PCC 7375 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. | PCC 7376 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7335 |
| <i>Microcoleus</i> sp. | PCC 7420 | <i>Synechococcus</i> sp. | WH8018 |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7005 | <i>Synechococcus</i> sp. | WH8103 ^R |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7941 | <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6308 |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7806 | <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6803 |
| <i>Nodularia</i> sp. | PCC 73104 | <i>Tohyothrix</i> sp. | PCC 7101 |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 7120 | <i>Tohyothrix</i> sp. | PCC 7601 |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 73102 | | |

^T Typstamm

^R Referenzstamm

CCMP Provasoli - Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, West Boothbay Harbor, ME, USA

PCC Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria, Institut Pasteur, Paris, Frankreich

WH Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, USA

2.1.2 Andere Organismen

| | | | |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | ATCC 23055 ^T | <i>Methanococcus voltae</i> | DSM 1537 ^T |
| <i>Bacillus firmus</i> | DSM 12 | <i>Methanogenium organophilum</i> | DSM 3596 ^T |
| <i>Bacillus subtilis</i> | DSM 10 ^T | <i>Methanoseta concilia</i> | DSM 3671 ^T |
| <i>Brevundimonas diminuta</i> | DSM 1635 | <i>Methanosarcina barkeri</i> | DSM 800 ^T |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | LMG 1222 ^T | <i>Methanospirillum hungatei</i> | DSM 864 ^T |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | DSM 20300 | <i>Micrococcus luteus</i> | CCM 169 |
| <i>Escherichia coli</i> | Grimont ¹ | <i>Neisseria canis</i> | LMG 8383 ^T |
| <i>Methanobacterium bryantii</i> | DSM 863 ^T | | |

^T Typstamm

ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

CCM Tschechische Sammlung von Mikroorganismen, Brünn, Tschechische Republik

DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

LMG Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien

2.1.3 Anzucht von Bakterien

Bakterien wurden unter den in den Stammsammlungen angegebenen Bedingungen kultiviert. Medien wurden 20 min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck autoklaviert. Festen Medien wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (Difco, Augsburg, Deutschland) zugegeben.

2.2 Fixierung von Zellen

Verwendete Lösungen:

- *Phosphat-gepufferte Saline (PBS)-Stammlösung* (Na_xPO_4)

200 mM Na_2HPO_4

200 mM NaH_2PO_4

pH 7,4

Na_2HPO_4 - und NaH_2PO_4 -Lösung wurden zunächst getrennt hergestellt, durch Mischung beider wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt.

¹ Dieser *E. coli*-Stamm wurde kürzlich bei Rindern isoliert und freundlicherweise von P. Grimont, Institut Pasteur, Paris, Frankreich, zur Verfügung gestellt.

- 1× PBS

130 mM NaCl
10 mM Na_xPO₄
pH 7,4

- 3× PBS

390 mM NaCl
30 mM Na_xPO₄
pH 7,4

- 4%ige Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung (Amann *et al.*, 1990)

2 g PFA wurden in 30 ml auf 60°C erwärmtes H₂O eingebracht, und zu dieser Suspension wurde solange 1 M NaOH zugetropft, bis das PFA vollständig gelöst war. Anschließend wurden 16,6 ml 3× PBS zugegeben, die Lösung mit 1 M HCl auf pH 7,0-7,4 eingestellt und mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde durch einen 0,2 µm-Filter (Millipore, Eschborn, Deutschland) filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

- 96%iger Ethanol

2.2.1 Fixierung mit Ethanol

Zellen aus Bakteriensuspensionen wurden entweder direkt durch Zugabe des gleichen Volumens 96%igen Ethanols fixiert oder zunächst durch Zentrifugieren (14.000× g, 5 min) geerntet und in 1× PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann in 1× PBS aufgenommen, gut resuspendiert, mit dem gleichen Volumen 96%igem Ethanol versetzt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Fixierung mit Paraformaldehyd

Drei Teile 4%iger, frisch hergestellter PFA-Lösung wurden mit einem Teil Bakteriensuspension gemischt und 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (14.000× g, 5 min) und das Zellpellet in 1× PBS gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 1× PBS resuspendiert, mit dem gleichen Volumen 96%igem Ethanol versetzt und bei -20°C gelagert.

2.3 Extraktion von Nukleinsäuren für anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) nach der „Freeze-Thaw“-Methode

Verwendete Lösungen:

- *Tris-EDTA- (TE-) Puffer*
 - 1 M Tris-HCl
 - 0,1 M EDTA
 - pH 8,0

Durchführung:

7,5 ml Flüssigkultur wurden abzentrifugiert und das Pellet mit 1× TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde es in 100 µl H₂O aufgenommen und die Suspension nacheinander jeweils für 1 min in flüssigem Stickstoff gefroren und bei 40°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Nach viermaliger Wiederholung dieser beiden Schritte wurde abzentrifugiert (14.000 × g, 5 min), der Überstand aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. 1-5 µl dieser Aliquots wurden für die PCR im 100 µl-Maßstab eingesetzt.

2.4 Amplifizierung von ribosomalen RNS-Genen (rDNS)

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNS-Sequenzen dar. Zwei Oligonukleotidprimer hybridisieren mit je einem der komplementären DNS-Strängen und flankieren die Region der Zielsequenz, die von Interesse ist. Das wiederholte Durchlaufen einer Folge von Temperatur-Zeitzyklen, die die Denaturierung der Zielsequenzen, das Anlagern der Primer und die Elongation der flankierenden Primer durch die DNS-Polymerase ermöglichen, bewirkt eine Vervielfältigung der Zielsequenz. Durch die Verwendung einer thermostabilen DNS-Polymerase wird es möglich, einen kontinuierlichen Prozeß auszuführen. Da die in einem Zyklus synthetisierten DNS-Kopien als Matrizen im nächsten Zyklus zur Verfügung stehen, wächst die Kopienzahl exponentiell, und geringste Ausgangsmengen an DNS können nachgewiesen werden.

2.4.1 PCR-Reaktion

Verwendete Lösungen:

- *10× PCR Puffer 1*
(Enzyme Technologies, Cambridge, England)
1× Puffer entspricht:
10 mM Tris-HCl
1,5 mM MgCl₂
50 mM KCl
0,1% (v/v) Triton X-100
0,1% (w/v) Gelatine
pH 9,0
- *Rinderserum Albumin (BSA)*
30 mg/ml, sterilfiltriert
(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- *Nukleotidmix*
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
(Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)
- *Primer*
50 µM
(Interactiva, Ulm, Deutschland; Biometra, Göttingen, Deutschland)

| Primer ² | Sequenz ³ (5'-3') | Position ⁴ | Quelle |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| GM3 F | AGAGTTTGATCMTGGC | 8-23 | Muyzer <i>et al.</i> , 1995 |
| GM4 R | TACCTTGTTACGACTT | 1492-1507 | Muyzer <i>et al.</i> , 1995 |

Tabelle 2.1: PCR-Primer für die fast vollständige Amplifikation der 16S rDNS.

² F, forward: Primer bindet an den nichtkodierenden Strang. R, reverse: Primer bindet an den kodierenden Strang

³ M: A/C

⁴ entsprechend *E. coli* Numerierung nach Brosius *et al.* (1981)

- *Taq-Polymerase*

Super-*Taq*-Polymerase (1U/ μ l)
(Enzyme Technologies, Cambridge, England)

- *Mineralöl für Molekularbiologie*

(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

- *PCR-Ansatz (100 μ l)*

| | |
|---------------------------------|-------------|
| 10 \times PCR Puffer | 10 μ l |
| BSA | 10 μ l |
| Nukleotidmix | 10 μ l |
| Primer 1 | 1 μ l |
| Primer 2 | 1 μ l |
| DNS | 1-5 μ l |
| ad 100 μ l H ₂ O | |

Durchführung:

Der PCR-Ansatz wurde wie oben beschrieben in einem 0,5 ml ERG zusammengemischt und zum Schutz vor Verdunstung während der PCR-Zyklen mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Nach dem ersten Denaturierungsschritt in einem programmierbaren Heizblock (FPHC-3CD; Techne Cyclogene, Cambridge, England) wurde 1 μ l *Taq*-Polymerase zugeben („hot start“) und das Programm laut Tabelle 2.2 fortgesetzt.

Nach Beendigung des Programms wurde der Ansatz mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig unter dem Mineralöl herausgezogen und bei -20°C gelagert.

| | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|--------------------|------------|------------------|--------|
| Startdenaturierung | 94°C | 5 min | 1 |
| „Hot Start“ | 80°C | manuell gestoppt | |
| Annealing | 48°C | 1 min | |
| Elongation | 72°C | 3 min | |
| Denaturierung | 94°C | 1 min | 30 |
| Annealing | 48°C | 1 min | |
| Elongation | 72°C | 3 min | |
| Denaturierung | 94°C | 1 min | 1 |
| Annealing | 48°C | 1 min | |
| Elongation | 72°C | 30 min | |
| Kühlung | 15°C | | |

Tabelle 2.2: Verwendetes PCR-Programm für die Amplifizierung des beinahe kompletten 16S rRNA-Gens mit dem Primern GM3 F und GM4 R.

2.4.2 Analyse der Amplifikate

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der Amplifikationseffizienz wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

- *Ladepuffer (5×)*
(Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
0,05% (*w/v*) Bromphenolblau
40% (*w/v*) Saccharose
100 mM EDTA
0,5% (*w/v*) Natriumlaurylsulfat
pH 8,0
- *Elektrophoresepuffer 1× TBE* (Sambrook *et al.*, 1989)
100 mM Tris-HCl
90 mM Borsäure
1 mM EDTA
pH 8,0

2 Material und Methoden

- *Lambda-Standard*

HindIII-verdaut

(Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)

Größen der Banden sind in Tabelle 2.3 ersichtlich.

| Bande | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------|-------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| Größe (bp) | 23130 | 9416 | 6557 | 4361 | 2322 | 2027 | 564 | 125 |

Tabelle 2.3: Größen der durch HindIII-Restriktion entstandenen Lambda-Banden

- „1 KB-ladder“-Standard

(Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland)

Größen der Banden sind in Tabelle 2.4 ersichtlich.

| Bande | 1 ⁵ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------|----------------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Größe (bp) | 6108 | 5090 | 4072 | 3054 | 2036 | 1636 | 1018 | 506 |

Tabelle 2.4: Größen der KB-ladder Banden

- „Low DNA Mass Ladder“-Standard

(Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)

- Agarose (Seakem LE)

(FMC Bioproducts, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

- Ethidiumbromidlösung

0,5 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in H₂O

Durchführung:

0,5 g Agarose wurden in 25 ml 1× TBE-Puffer unter Erwärmen gelöst (2% [w/v]) und in die Gelwanne der nach Herstellerangaben zusammengebauten Elektrophoresekammer (Horizon 11·14, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) gegossen. Nach dem Festwerden der Lösung wurde die Kammer mit 1× TBE-Puffer aufgefüllt, der Kamm gezogen und 5 µl-

⁵ Oberhalb der 6108bp Bande laufen noch Banden mit 7126bp, 8144bp, 9162bp, 10180bp, 11198bp und 12216bp Größe

Aliquots der zu untersuchenden PCR-Amplifikationsprodukte, vermischt mit 2 µl Ladepuffer und 3 µl H₂O, in die Geltaschen einpipettiert. Zur Größenabschätzung der Amplifikate wurde zusätzlich ein Längenstandard (Lambda- oder „1 KB-ladder“-Standard) aufgetragen. Um auch die Menge der erhaltenen Amplifikate bestimmen zu können, wurde statt dessen „Low DNA Mass Ladder“-Standard verwendet. Aufgetrennt wurde bei einer Spannung von 100 V 1-2 h. Anschließend wurde das Agarosegel 30 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und dann unter UV-Beleuchtung (314 nm; UV-Transilluminator, Vilber Lourmat, Marne la Vallée, Frankreich) dokumentiert (Cybertech CS1 Digital Kamera mit Image Capture Computer, Cybertech, Berlin, Deutschland).

2.4.3 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

PCR-Amplifikate, die für die Sequenzierung vorgesehen waren, wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. 5 µl-Aliquots der Proben wurden nach der Reinigung erneut qualitativ und quantitativ analysiert (siehe 2.4.2) und die DNA-Konzentration durch Vergleich mit den unterschiedliche Mengen an DNA enthaltenden Banden des „Low DNA Mass Ladder“-Standards abgeschätzt.

2.5 Nichtradioaktive Sequenzanalyse von DNS-Molekülen nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll

Die nichtradioaktive Sequenzanalyse erfolgte nach dem „Cycle Sequencing“-Protokoll (bzw. „linear amplification sequencing“; Murray, 1989), welches eine Kombination aus der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und der Polymerasekettenreaktion mit einer thermostabilen DNS-Polymerase darstellt. Zwei wesentliche Merkmale unterscheiden das „Cycle Sequencing“ von einer normalen PCR (Kretz *et al.*, 1994): die Verwendung von Didesoxynukleosidtriphosphaten und eines einzelnen Primers statt eines Primerpaares. Bei der linearen Amplifikation des gewünschten Produkts kommt es mit bestimmter Wahrscheinlichkeit zum Einbau eines Didesoxynukleotids, was zum Abbruch der Elongation führt. Da dies mehr oder weniger zufällig geschieht, erhält man ein Gemisch aus unterschiedlich langen Produkten, die über Polyacrylamidgelelektrophorese auf eine Base genau aufgetrennt werden können.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem Applied Biosystems PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und der AmpliTaq-DNS-Polymerase durchgeführt. Die

Analyse der Reaktionen erfolgte mit einem DNA-Sequenzierer ABI 373S (Perkin Elmer, Langen, Deutschland).

Diese Sequenzierarbeiten einschließlich des Editierens der Sequenzen wurden durch die Arbeitsgruppe von Professor Blohm am Umweltforschungs- und Technologiezentrum der Universität Bremen durchgeführt.

Neben den PCR-Primern wurden folgende in Tabelle 2.5 aufgelistete Primer für die Sequenzierreaktionen verwendet.

| Primer | Sequenz (5'-3') | Position | Quelle |
|--------|-------------------|-----------|--|
| GM1 F | CCAGCAGCCGCGGTAAT | 518-534 | komplementär zu GM1 R (Muyzer <i>et al.</i> , 1993) |
| 1114 F | GCAACGAGCGCAACCC | 1099-1114 | Lane, 1991 |
| 610 R | GTATTACCGCGGCTG | 522-536 | |

Tabelle 2.5: Weitere, für die Sequenzierung verwendete Primer

2.6 Auswertung der Sequenzdaten und Konstruktion von Sonden

Sämtliche in diesem Kapitel aufgeführten Methoden wurden mit Hilfe des Programmpakets ARB (Strunk *et al.*) durchgeführt, das zum einen eine erweiterbare Datenbank mit zur Zeit (August 1998) mehr als 10.000 Sequenzeinträgen zur Verfügung stellt, gleichzeitig aber auch die für die Bearbeitung dieser Sequenzen notwendigen Programme zum Editieren, Alignen, zur Baumberechnung mit verschiedenen Verfahren und zur Konstruktion und Überprüfung von Sonden implementiert hat. Integriert sind darüber hinaus Elemente von PHYLIP (Felsenstein, 1981) und fastDNAmI (Olsen *et al.*, 1994).

2.6.1 Vergleichende Anordnung der Sequenzen (Alignment)

Aus den Sequenzierungen oder Genbanken erhaltene Sequenzdaten wurden in ARB importiert und mit dem Unterprogramm „Align Sequence“ automatisch gegenüber den bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen angeordnet. Dies ist notwendig, um für phylogenetische Aussagen homologe Bereiche miteinander vergleichen zu können. Offensichtliche Unstimmigkeiten in der Anordnung durch diesen Aligner wurden manuell korrigiert. In diesem Stadium

wurden auch Konsensussequenzen der einzelnen, aus den Sequenzierreaktionen mit den verschiedenen Primern stammenden Teilsequenzen erstellt, die im weiteren für Analysen verwendet wurden.

2.6.2 *Rekonstruktion von Stammbäumen*

Die Darstellung von phylogenetischen Verwandtschaften erfolgt meist in Form von Stammbäumen. Neue Sequenzen wurden zunächst nach dem ARB-Parsimony-Verfahren in einen der bestehenden Bäume eingerechnet. Die Besonderheit dieser Methode bei ARB ist die sich nicht verändernde Topologie des Ausgangsbaumes. Neue Sequenzen werden – ohne den gesamten Baum neu zu rekonstruieren – an den Stellen integriert, wo ihre nächsten Verwandten zu finden sind. Dies liefert eine schnelle erste Einordnung der Sequenzen, ohne der Gefahr ausgesetzt zu sein, Verwandtschaftsverhältnisse in bereits etablierten und optimierten Bäumen durch Einfügen einzelner Sequenzen fälschlicherweise wieder zu zerstören. Diese bestände im besonderen Maße für das Einrechnen von Teilsequenzen. Ausgehend von dieser ersten Einordnung wurden dann Sequenzen ausgewählt, mit denen Teilbäume für die genauere Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der neu eingefügten Organismen rekonstruiert wurden. Um den Einfluß hochvariabler Bereiche einzuschränken, und um die Stabilität der Bäume einschätzen zu können, wurden Filter verwendet, die in unterschiedlichem Ausmaß weniger konservierte Basen bei dieser Rekonstruktion ausschließen. Die Berechnungen erfolgten mit Distanzmatrix- (Neighbourjoining-Methode [Saitou und Nei, 1987] nach Jukes-Cantor-Korrektur [Jukes und Cantor, 1969]), Maximum Parsimony- (Fitch und Margoliash, 1967) und Maximum Likelihood-Verfahren (Felsenstein, 1981), woraus letztendlich auf der Grundlage des Maximum Likelihood-Baumes ein Konsensusbaum aller drei Verfahren resultierte, in dem Abweichungen bzw. Unstimmigkeiten zwischen den Verfahren durch Mehrfachverzweigungen angezeigt wurden. Näheres zu diesen Methoden findet sich bei Ludwig *et al.* (1998).

2.6.3 *Konstruktion von gegen 16S rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden*

Die Konstruktion von spezifischen Oligonukleotidsonden auf der Basis von 16S rRNS Sequenzdaten erfolgte unter Zuhilfenahme der Funktion „Probe Design“ aus dem ARB Programmpaket. Die Spezifität konstruierter Oligonukleotidsonden gegenüber Organismen, deren 16S rRNS Sequenz bekannt ist, wurde durch die Funktion „Probe Match“ des ARB Programmpaketes überprüft.

2.7 Meerrettichperoxidase-Markierung von Oligonukleotiden

Dieser Markierungsart liegt die von Urdea *et al.* (1988) beschriebene Methode zugrunde. Das verwendete Oligonukleotid (Interactiva, Ulm, Deutschland) war am 5'-Ende mit einer Aminogruppe (5'-Amino-Modifizier C6: 6-(4-Monomethoxytritylamino)hexyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoamidit, Glen Research) versehen.

2.7.1 Aktivierung des Oligonukleotids und Kopplung der Meerrettichperoxidase (POD)

Verwendete Lösungen:

- *Natriumboratpuffer*
0,1 M $B_4Na_2O_7 \times 10 H_2O$
pH 9,2
- *Para-Phenylendisothiocyanat- (DITC-) Lösung*
DITC (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
20 mg/ml in Dimethylformamid (DMF; Merck, Darmstadt, Deutschland)
- *n-Butanol* (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- *Meerrettichperoxidase- (POD-) Lösung*
POD von Meerrettich, „EIA grade“ (ca. 3.500 U/mg Lyophilisat [25°C, Tetramethylbenzidin, H_2O_2]; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)
100 mg/ml in Natriumboratpuffer

Durchführung:

100 µg des zu markierenden Oligonukleotids wurden im Vakuum eingetrocknet und anschließend in 50 µl Natriumboratpuffer aufgenommen. Zur Aktivierung wurden 500 µl DITC-Lösung zum Oligonukleotid pipettiert und eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige DITC wurde durch Extraktion mit n-Butanol entfernt. In ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen wurden 5 ml n-Butanol und 3 ml H_2O vorgelegt und der Reaktionsansatz eingespritzt. Nach dem Ausschütteln wurde 10 min bei $5.000 \times g$ zentrifugiert (Sorvall RC2-B, Rotor SS34) und die obere Butanolphase verworfen.

Zum zweiten Ausschütteln wurden erneut 5 ml Butanol zugegeben. Es folgten solange weitere Extraktionsschritte, bis das Volumen der wässrigen Phase zwischen 50 und 100 μ l lag. Neben DITC löst sich während der Extraktion auch Wasser im Butanol, so daß das Volumen der wässrigen Phase jeweils um ein Viertel des verwendeten Butanolvolumens abnimmt. Meist konnte ab dem 3. Schritt vom 15 ml-Röhrchen auf ein ERG gewechselt werden (mit entsprechend reduzierten Volumina Butanol). Letzte Reste Butanol wurden durch bis zu halbstündiges Trocknen in der SpeedVac (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) entfernt. 100 μ l POD-Lösung wurden zum aktivierten Oligonukleotid gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert.

2.7.2 Aufreinigung

Verwendete Lösungen:

- *10× No-Name- (NN-) Puffer*

| | |
|-------------------------|---------|
| Tris | 162,0 g |
| Borsäure | 27,5 g |
| EDTA | 10,3 g |
| ad 1 l H ₂ O | |

- *Acrylamidstammllösung (15%)*

| | |
|----------------------------|---------|
| Acrylamid | 14,25 g |
| Bisacrylamid | 0,75 g |
| 10× NN-Puffer | 10 ml |
| ad 100 ml H ₂ O | |

- *Ammoniumperoxodisulfat- (APS-) Lösung*

APS (Merck, Darmstadt, Deutschland)
10% (w/v) in H₂O

- *N,N,N',N'-Tetramethyldiamin*

TEMED (Serva, Heidelberg, Deutschland)

- *Auftragspuffer*

20% (w/v) Saccharose in H₂O

Durchführung:

Die Auftrennung zwischen POD-markiertem und nicht markiertem Oligonukleotid bzw. freier POD erfolgte in einer senkrecht stehenden Gelapparatur (Hoefer SE 400, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) über ein 7,5%iges Polyacrylamidgel (AcrylamidstammLösung 1:1 mit $1\times$ NN Puffer verdünnt). Nach den Anweisungen des Herstellers wurde die Apparatur zusammengebaut bzw. im weiteren verwendet. Zunächst wurde ein Gelblock (5 ml 7,5%ige AcrylamidLösung, 70 μ l APS, 10 μ l TEMED) als Auslaufschutz gegossen, nach dessen Auspolymerisierung das eigentliche Trenngel (45 ml 7,5%ige AcrylamidLösung, 360 μ l APS, 36 μ l TEMED). Kämme für drei bzw. fünf Auftragstaschen wurden verwendet. Der Reaktionsansatz (s. o.) wurde komplett nach Zugabe von 80 μ l Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde bei 4°C und einer Spannung von 100 V durchgeführt, um die thermische Belastung des eingesetzten Enzyms möglichst gering zu halten. Nach ca. 2 h, wenn die untere sichtbare Bande, das markierte Oligonukleotid, 1-2 cm in das Gel eingewandert war, wurde die Elektrophorese abgebrochen. Mit Hilfe einer UV-Handlampe (254 nm; Bachofer, Reutlingen, Deutschland) konnten die Banden des markierten und unmarkierten Oligonukleotids durch Schattenbildung auf einer F254-Dünnschichtplatte mit fluoreszierender Beschichtung sichtbar gemacht werden. Das unmarkierte Oligonukleotid war weiter unten im Gel zu sehen. Die Bande des markierten Oligonukleotids wurde mit einer Rasierklinge, gereinigt mit 70%igem Ethanol, ausgeschnitten und in ein steriles ERG überführt. Bei sehr dicken Banden wurde auf zwei ERGs aufgeteilt und entsprechend mit den doppelten Volumina eluiert. Mit einer sterilen, an der Spitze zugeschmolzenen, blauen Pipettenspitze wurde das Gelstück zerkleinert und für die Elution in 1 ml sterilem H₂O suspendiert. Die Elution erfolgte im Schüttler bei 4°C für mindestens 1 h und wurde zweimal wiederholt, davon einmal für 12 h.

2.7.3 Aufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung

Die vereinigten Eluate (3 bzw. 6 ml) wurden sukzessive in Centricon30-Konzentratoren (Amicon, Witten, Deutschland) pipettiert und zentrifugiert (15-30 min, je nach Auftragsvolumen, 5.000 \times g; Sorvall RC2-B, Rotor SS34). Die Centricon-Röhrchen wurden nach Herstellerangaben zusammengebaut. Maximal konnten bei einem Zentrifugationsschritt 2 ml aufgetragen werden. Das Filtrat wurde dabei jeweils verworfen. Die aufkonzentrierte Probe sollte am Ende ein Volumen von etwa 100 μ l besitzen. 5 μ l dieser StammLösung wurden

photometrisch vermessen (Photometer Beckmann DU 650, München, Deutschland bzw. Shimadzu UV-1202, Duisburg, Deutschland). Dabei wurde die Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 230 und 480 nm bestimmt.

Bei optimaler Markierung sollte das Absorptionsmaximum bei 260 nm, das durch Oligonukleotid und Enzym hervorgerufen wird, und das durch die Peroxidase verursachte Absorptionsmaximum bei 404 nm ein Verhältnis von 3:1 aufweisen. Dem liegt zugrunde, daß bei einer 1:1 Markierung das Verhältnis der Absorptionsmaxima dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten ϵ entsprechen sollte.

Von folgenden Extinktionskoeffizienten wurde ausgegangen:

| Extinktionskoeffizient ϵ ($\text{cm}^2\mu\text{mol}^{-1}$) | |
|---|-------|
| Oligonukleotid ⁶ | 201,6 |
| Peroxidase | 80 |

Das Verhältnis $\epsilon_{\text{Oligonukleotid}} : \epsilon_{\text{Peroxidase}}$ von 2,5 kann nicht direkt auf das Verhältnis der beiden Absorptionsmaxima übertragen werden, weil das Absorptionsmaximum bei 260 nm anteilig sowohl vom Oligonukleotid als auch vom Enzym verursacht wird. Berechnet man einen Korrekturfaktor k von 0,276 ein, so kommt man auf ein Verhältnis der Maxima von ca. 3:1.

Auch für die Berechnung der Sondenkonzentration muß dieser Korrekturfaktor einbezogen werden:

$$\text{OD}_{260} = \text{gemessene OD}_{260} - \text{gemessene OD}_{404} \times k$$

Nach dieser Korrektur gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 20 \mu\text{g/ml ss DNS}_{\text{Oligonukleotid}}$$

Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Auf $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnte Arbeitslösungen wurden bei 4°C gelagert.

⁶ für ein 18mer mit durchschnittlichem Extinktionskoeffizienten ϵ von $11,2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ pro Nukleotid

2.8 Fluoreszenz-Markierung von Oligonukleotiden

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

FLUOS: 5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland); Absorptionsmaximum bei 494 nm; Emissionsmaximum bei 518 nm; $\epsilon = 7,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

TRITC: Tetramethylrhodamin-5,6-isothiocyanat (Isomer G, Molecular Probes Inc., Eugene, OR; Lambda, Graz, AUS); Absorptionsmaximum bei 537 nm; Emissionsmaximum bei 566 nm; $\epsilon = 1,07 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

TAMRA/CT: 5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester (gemischte Isomere; Molecular Probes Inc.); Absorptionsmaximum bei 537 nm; Emissionsmaximum bei 566 nm; $\epsilon = 0,87 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Cy3: 5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarbocyanin-N-hydroxysuccinimidester (Cy3.18, Biological Detection Systems, Pittsburgh, OH); Absorptionsmaximum bei 554 nm, Emissionsmaximum bei 570 nm; $\epsilon = 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Wie bei der Markierung mit POD werden die Farbstoffe über den Aminolinker am 5'-Ende des Oligonukleotids kovalent gebunden. Isothiocyanat-gekoppelte Farbstoffe bilden eine Thioharnstoffbindung aus, solche mit N-Hydroxysuccinimidester eine Säureamidbindung.

2.8.1 Markierungsreaktion

Verwendete Lösung:

- *Carbonatpuffer*

1 M NaHCO₃

1 M Na₂CO₃

pH 9,0

NaHCO₃- und Na₂CO₃-Lösung wurden getrennt angesetzt und etwa im Verhältnis 9:1 gemischt, so daß der angegebene pH-Wert erreicht wurde.

Durchführung:

50-100 µg des zu markierenden Oligonukleotids in wässriger Lösung wurden mit H₂O auf 175 µl aufgefüllt und mit 50 µl Carbonatpuffer versetzt. Aliquots der Farbstoffe FLUOS und

TRITC bzw. TAMRA wurden in Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst (5 mg/ml) und je 25 µl dieser Lösung zu den gepufferten Oligonukleotiden pipettiert und gemischt. Cy3 wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

2.8.2 Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffes

Die Abtrennung des nicht umgesetzten Farbstoffes erfolgte durch Größenausschlusschromatographie mit Sephadex G-25 Säulen (NAPTM-5; Pharmacia Biosystems, Freiburg, Deutschland).

Durchführung:

Nach Abgießen der Konservierungsflüssigkeit wurden die Säulen dreimal mit H₂O gespült, und anschließend der mit 250 µl H₂O versetzte Markierungsansatz aufgetragen. Dann wurde mit je 200 µl H₂O eluiert und dabei die Fraktionen 2-7 aufgefangen. Diese Fraktionen wurden unter Vakuum einrotiert (SpeedVac, Bachofer, Reutlingen, Deutschland).

2.8.3 Abtrennung des unmarkierten Oligonukleotidanteils

Verwendete Lösungen:

Siehe Kapitel 2.7.2

- *TE-Puffer*

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7,2

Durchführung:

Wie bei der Markierung mit POD, erfolgte auch bei dieser Markierung die Auftrennung über Polyacrylamidgelelektrophorese (2.7.2). Unterschiedlich war, bedingt durch andere Größenverhältnisse der zu trennenden Moleküle, die Konzentration der verwendeten Acrylamidstammllösung, die hier bei 15 statt 7,5% lag. Die einrotierten Fraktionen wurden in insgesamt 100 µl H₂O aufgenommen, mit 50 µl Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen

einpipettiert. Da, im Gegensatz zu POD, die Farbstoffe nicht temperaturempfindlich sind, konnte die Elektrophorese bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 300-400 V durchgeführt werden. Nach ca. 2 h wurde das Gel aus der Apparatur genommen und, wie unter 2.7.2 beschrieben, analysiert. Zur Anregung der Farbstoffe wurde die UV-Handlampe auf eine Wellenlänge von 365 nm geschaltet. Wie oben wurde die entsprechende Bande mit einer sterilen Rasierklinge ausgeschnitten, zerkleinert, das markierte Oligonukleotid aber mit TE-Puffer eluiert. Die drei Eluate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.8.4 Abtrennung von Salzen

Zur Abtrennung von Gelresten, störenden Salzen und zur Aufkonzentrierung der markierten Oligonukleotide wurde eine Reverse-Phase-Chromatographie mit NensorbTM20 Säulen (DuPont, Bad Nauheim, Deutschland) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

- *Triethylamin- (TEA-) Puffer*
 - 0,1 M Tris-HCl
 - 1 mM EDTA
 - nach dem Autoklavieren 0,14% (v/v) Triethylamin zugeben
 - pH 7,7 mit HCl einstellen
- *Methanol*
- *50% (v/v) Methanol in H₂O*

Durchführung:

Die Säule wurde mit 2 ml Methanol vorgespült und mit 2 ml TEA-Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die jeweils drei Eluate auf 0,14% TEA eingestellt und nach dem Abzentrifugieren von Gelresten (14.000× g, 2 min) auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 2 ml TEA-Puffer konnte das markierte Oligonukleotid mit 1 ml 50%igem Methanol eluiert werden. Dabei wurde die scharf zusammenlaufende Bande in den Tropfen 3-10 aufgefangen, der Methanol anschließend unter Vakuum (SpeedVac; Bachofer, Reutlingen, Deutschland) abgezogen und die getrockneten Niederschläge in 100 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen.

2.8.5 Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide

Aliquots der TRITC- und Cy3-markierten Oligonukleotide wurden mit sterilem H₂O und Aliquots der FLUOS-markierten Oligonukleotide mit verdünntem Carbonatpuffer (pH 9,0) im Verhältnis 1:100 verdünnt und im Spektralphotometer (Beckmann Photometer DU 650, München, Deutschland bzw. Shimadzu UV-1202, Duisburg, Deutschland) vermessen. Der Quotient aus Nukleotidabsorption (OD₂₆₀) und Farbstoffabsorption (FLUOS OD₄₉₀; TRITC und Cy3 OD₅₅₀) ermöglicht eine Abschätzung der Markierungsrate. Bei vollständiger Umsetzung ist der gemessene Wert gleich dem Quotienten der beiden Extinktionskoeffizienten, was bei den verwendeten Farbstoffen und einer durchschnittlichen Länge der eingesetzten Oligonukleotide von 18 Basen bei FLUOS und TRITC Werten von ca. 2,5 bis 3 und bei Cy3 von ca. 1 entspricht.

Die Konzentration des Oligonukleotids wurde wie bei POD-markierten Oligonukleotiden durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm nach folgender Gleichung bestimmt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml ss DNS}_{\text{Oligonukleotid}}$$

Stammlösungen und auf 50 ng/μl verdünnte Arbeitslösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Oligonukleotiden

Wegen der Instabilität des Enzyms bei Temperaturen über 40°C wurden Hybridisierungen mit POD-markierten Sonden bei 35°C durchgeführt. Um in etwa die gleichen Stringenzen wie bei Hybridisierungen mit 46°C zu erhalten, wurden die Formamidkonzentrationen um 20% erhöht. Dabei wurde zugrunde gelegt, daß eine Erhöhung um 1% Formamid einer Erhöhung der Hybridisierungstemperatur um 0,5°C entspricht (Wahl *et al.*, 1987).

Im Waschpuffer wurde die entsprechende Stringenz über die Konzentration an Na⁺-Ionen eingestellt. Der Zusammenhang zwischen Formamid- und Na⁺-Konzentration ist Tabelle 2.6 zu entnehmen.

2 Material und Methoden

Die Berechnung der dort angegebenen Konzentrationen an NaCl erfolgte mit folgender Formel (hergeleitet von Lathe 1985):

$$M_2 = \frac{M_1}{\frac{\Delta T_d}{10^{16,6}}}$$

In dieser Formel ist M_2 die Konzentration an Na^+ -Ionen im Waschpuffer und M_1 die Na^+ -Konzentration im Hybridisierungspuffer. ΔT_d errechnet sich aus der Konzentration des Formamids im Hybridisierungspuffer; dabei wird 1% Formamid einer Veränderung der Dissoziationstemperatur (T_d) von DNS/RNS-Hybriden um $0,5^\circ\text{C}$ gleichgesetzt. Für den Waschpuffer bei 35°C ist noch ein weiterer Umstand zu berücksichtigen: da der Waschschrift im allgemeinen etwas stringenter sein soll als die Hybridisierung, und dies in diesem Fall nicht über eine höhere Temperatur erfolgt, wird die Na^+ -Konzentration im Waschpuffer um einen etwa 3°C entsprechenden Wert abgesenkt. Dazu wird der anhand der Formamidkonzentration errechnete ΔT_d -Wert um 3 erhöht. Alternativ kann der Waschschrift auch bei 38°C durchgeführt werden, die in der Tabelle 2.6 angegebenen Konzentrationen von NaCl müßten dann entsprechend korrigiert werden (siehe Tabelle 2.8). Zu allgemeinen Fragen über die Einstellung von Hybridisierungsbedingungen siehe Wetmur (1991).

| % Formamid bei der Hybridisierung | $[\text{Na}^+]$ in M | μl 5 M NaCl auf 50 ml |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 20 | 0,145 | 1350 |
| 25 | 0,105 | 950 |
| 30 | 0,074 | 640 |
| 35 | 0,052 | 420 |
| 40 | 0,037 | 270 |
| 45 | 0,026 | 160 |
| 50 | 0,019 | 90 |
| 55 | 0,013 | 30 |
| 60 | 0,009 | 0 |
| 65 | 0,008 | 0 |
| 70 | 0,005 | 0 |

Tabelle 2.6: Waschpuffer für Hybridisierungen bei 35°C in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers.

2.9.1 Membranhybridisierungen

Verwendete Lösungen:

- *20× Standard-Saline-Citrat- (SSC)-Lösung:*
 - 3,0 M NaCl
 - 0,3 M Trinatriumcitrat
 - pH 7,0
 - autoklaviert
- *1× PBS*
 - 130 mM NaCl
 - 10 mM Na_2PO_4 ⁷
 - pH 7,2
 - autoklaviert
- *10% N-Lauryl-Sarkosin-Lösung*
 - 10% (w/v) N-Lauryl-Sarkosin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- *10% Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung*
 - 10% (w/v) SDS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
 - nicht autoklaviert
- *Puffer 1*
 - 0,15 M NaCl
 - 0,10 M Maleinsäure
 - pH 7,5 mit fester NaOH eingestellt
 - autoklaviert
- *Blockierungslösung*
 - 10% (w/v) Blocking Reagens (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in Puffer 1
 - autoklaviert

⁷ PBS-Stammlösung siehe Kapitel 2.1.3

2 Material und Methoden

- *Prähybridisierungslösung*

| | |
|-----------------------|-----------|
| 20× SSC | 28,125 ml |
| Blockierungslösung | 22,5 ml |
| 10% N-Lauryl-Sarkosin | 1,125 ml |
| 10% SDS | 0,225 ml |

- *Hybridisierungspuffer*

| | |
|--------------------------|--------|
| 5 M NaCl | 360 µl |
| 1 M Tris-HCl (pH 8,0) | 40 µl |
| 10% SDS | 2 µl |
| Formamid | x µl |
| Blockierungslösung | 400 µl |
| ad 2 ml H ₂ O | |

- *Waschpuffer*

| | |
|---------------------------|-------------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8,0) | 1 ml |
| 5 M NaCl | y µl ⁸ |
| 10% SDS | 50 µl |
| ad 50 ml H ₂ O | |

- *ECL Western Blotting Detektionsreagens*

(Amersham, Braunschweig, Deutschland)

Durchführung:

Nach Einbringen der Membran in Hybridisierungsröhrchen (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) und Zugabe von 10 ml der Prähybridisierungslösung wurde zwischen 30 min und 12 h bei der späteren Hybridisierungstemperatur, hier 35°C, inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und 100 ng einer POD-markierten Sonde in 2 ml Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierungsdauer betrug mindestens 30 min bei 35°C. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit je 10 ml des auf 35°C vorgewärmten Waschpuffers für je 10 min. Nach dem Waschen wurde die Membran kurz in 1× PBS geschwenkt und auf ein Filterpapier gelegt. Die Membran wurde dann mit 4-6 ml der nach

⁸ Die NaCl-Konzentration im Waschpuffer ist abhängig von der Formamidkonzentration bei der Hybridisierung. Für die Werte bei bestimmten Formamidkonzentrationen siehe Tabelle 2.6. Näheres über den Zusammenhang findet sich zu Beginn dieses Kapitels.

Herstellerrangaben gemischten ECL-Detektionslösung benetzt und samt Filterpapier in Folie eingeschweißt. In einer Filmkassette wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham, Braunschweig, Deutschland) dieser Membran für mindestens 30 min exponiert und anschließend entwickelt, fixiert, gewässert und getrocknet.

2.9.2 Ganzzellhybridisierung

Bei der Hybridisierung ganzer Zellen ist der grundlegende Vorgang, nämlich die Paarung homologer Basen, identisch mit dem der Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren. Allerdings sind bei der Ganzzellhybridisierung zwei zusätzliche Effekte zu berücksichtigen, die eine erfolgreiche Hybridisierung erschweren oder sogar verhindern können. Zum einen liegt die ribosomale RNS vermutlich noch mehr oder weniger im Komplex der Ribosomen gebunden vor, so daß ihre Sekundärstruktur und Wechselwirkungen mit ribosomalen Proteinen den Zugang der Sondenmoleküle erschweren oder verhindern können. Zum anderen muß auch der Zugang in die Zelle möglich sein, was um so schwieriger wird, je größer die Sondenmoleküle sind. Je nach Beschaffenheit der Zellhülle bzw. der Methode der Fixierung können Vorbehandlungen (siehe 2.9.6) notwendig werden, um einen freien Zugang zu ermöglichen.

Verwendete Lösungen:

Mit Ausnahme des Waschpuffers, dem ab einer 20% Formamid entsprechenden Natriumchloridkonzentration auch EDTA-Lösung zugegeben wurde, waren die verwendeten Puffer identisch mit denen der Membranhybridisierung (siehe Kapitel 2.9.1). EDTA ist notwendig, um bei niedrigen Natriumchloridkonzentrationen den starken Hybrid-stabilisierenden Einfluß zweiwertiger Kationen auszuschließen, der die Stringenz im Waschpuffer erniedrigen könnte.

- *Waschpuffer für Ganzzellhybridisierung*

| | |
|---------------------------|--------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8,0) | 1 ml |
| 0,5 M EDTA ⁹ | 0,5 ml |
| 5 M NaCl | y µl |
| 10% SDS | 50 µl |
| ad 50 ml H ₂ O | |

⁹ ab 20% FA im entsprechenden Hybridisierungspuffer

Durchführung:

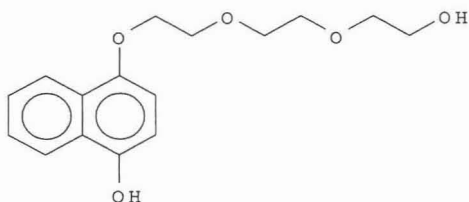
Zellen (frische oder fixierte) wurden auf die sechs Aussparungen von mit Epoxidharz versehenen Objektträgern (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim, Deutschland) getropft (je nach Zelldichte 2-10 μl). Nach einstündigem Lufttrocknen oder 10minütigem Trocknen bei 46°C erfolgte Dehydratisieren und Nachfixieren durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 3 min in 50, 80 und 96% EtOH) mit anschließendem 15minütigem Lufttrocknen. Etwaige Vorbehandlungen wurden nach dieser Ethanolreihe an den getrockneten Zellen durchgeführt, um die Zugänglichkeit der Zellen für die Sondenmoleküle zu verbessern. Angewendet wurden enzymatische und chemische Methoden (siehe Kapitel 2.9.6). Anschließend wurden pro Feld 9 μl Hybridisierungspuffer und 1 μl der eingesetzten Sondenlösung (50 ng/ μl) aufgetragen und gut vermischt. Die Hybridisierung erfolgte in einem isotonisch äquilibrierten Kunststoffröhrchen (50 ml-Probengefäß; Greiner, Nürtingen, Deutschland) für 90-120 min bei 35°C. Das Röhrchen wurde dazu mit Zellstoff ausgelegt und mit 1 ml Hybridisierungspuffer angefeuchtet. Im Anschluß daran wurden die Objektträger kurz mit auf 35°C vorgewärmten Waschpuffer gespült und bei gleicher Temperatur 20 min in einem Röhrchen mit diesem Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Objektträger kurz und vorsichtig mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült und luftgetrocknet (für nichtfluoreszierenden POD-Nachweis) bzw. direkt weiterbehandelt (für Tyramid-Signal-Amplifikation).

2.9.3 Nichtfluoreszierender Nachweis der Meerrettichperoxidase-markierten Sonden

Auf die getrockneten Felder wurden von den fertigen Inkubationslösungen pro Objektträgerfeld 30 μl aufgetragen und nach der Inkubationszeit von 5-10 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgespült. Anschließend wurde luftgetrocknet. Das Einbetten zur mikroskopischen Analyse erfolgte mit 50% Glycerin in H_2O . Folgende Substrate wurden verwendet:

2.9.3.1 4-Triethylentrioxo-1-naphthol

„BM TETON POD-Substrat, präzipitierend“ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)



- *Stammlösung: Lösung in DMF (Dimethylformamid), stabilisiert*
- *Inkubationspuffer: 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂; pH 8,0*

5 µl Stammlösung wurden zu 1 ml Inkubationspuffer pipettiert und mit 0,6 µl H₂O₂ (30%, v/v) versetzt.

2.9.3.2 DAB-Substrat

(Metall verstärkt, präzipitierend; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)

Dieses Substrat wurde nach Herstellerangaben, mit dem Peroxidpuffer vermischt, angewendet.

2.9.4 Chemilumineszenznachweis

Für diesen Nachweis wurde neben dem oben beschriebenen ECL (Kapitel 2.9.1) das „SuperSignal™ Nucleic Acid Chemiluminescent Substrate for Nucleic Acid Blotting“ (Pierce; Rockford, IL, USA) verwendet. Das Herstellen der Substratlösung erfolgte nach Herstellerangaben wie bei ECL durch Mischen der beiden gelieferten Lösungen im Verhältnis 1:1. Substratlösungen von ECL und SuperSignal® wurden nach Hybridisieren und Waschen zum Einbetten der getrockneten Objektträger verwendet.

2.9.5 Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) als fluoreszierender Nachweis POD-markierter Sonden

Bei dieser Nachweismethode wird die Fähigkeit der Meerrettichperoxidase ausgenutzt, phenolische Gruppen zu radikalisieren. Die in der Substratlösung gebildeten Tyramid-Radikale sind sehr reaktionsfreudig und gehen kovalente Bindungen mit ihresgleichen oder anderen phenolischen Resten ein. Beim TSA-System ist die Dimerisierung zweier Substratmoleküle

unerwünscht, weil diese somit für den Peroxidasenachweis nicht mehr zur Verfügung stehen, mangels ausreichender Konzentration an äquivalenten Reaktionspartnern binden die gebildeten Radikale aber auch an Tyrosinreste in den Zielzellen (mit dem gewünschten Effekt der Markierung der Zellen). Die Tyramide sind kovalent gekoppelt an Biotin oder gängige Fluoreszenzfarbstoffe wie AMCA, Fluorescein, Tetramethylrhodamin oder Cy3 erhältlich, eine Umsetzung in den Sonde tragenden Zellen führt deshalb zur Anhäufung von Biotin bzw. den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen.

Verwendete Lösungen:

- *TNT-Puffer*
 - 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5
 - 0,15 M NaCl
 - 0,05% (v/v) Tween® 20
- *40%ige Dextransulfatlösung*
 - 40% (w/v) Dextransulfat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in H₂O

Folgende Lösungen sind in den TSA™-Direct-Kits von NEN™ Life Science Products (Boston, MA) enthalten:

- *Amplifikationsdiluent*
- *Fluorochrom-Tyramid*
 - Die in den entsprechenden TSA™-Direct-Kits enthaltene Tyramide wurden in entsprechenden Volumina Dimethylsulfoxid (Fluorescein-Tyramid und Tetramethylrhodamin-Tyramid) bzw. H₂O (Cy3-Tyramid) gelöst.

Durchführung:

Die nach dem Waschschrift der Hybridisierung mit H₂O abgespülten, noch nicht getrockneten Objektträger wurden in einer Schale bei Raumtemperatur für 15 min mit TNT-Puffer unter Schütteln äquilibriert. Anschließend wurde überschüssiger Puffer vorsichtig entfernt, ohne jedoch die einzelnen Hybridisierungsfelder trocknen zu lassen. Pro Objektträger wurden 100 µl Substratlösung (entsprechend der Herstellerangabe 1:50, bzw. bis zu 1:200 im Amplifikationsdiluent verdünnte Fluorochrom-Tyramide) aufgebracht und 5-10 min inkubiert. Alternativ

wurde der Amplifikationsdiluent 1:1 mit 40%iger Dextransulfatlösung vermischt, bevor die Fluorochrom-Tyramide 1:50 verdünnt zugegeben wurden. Mit dieser Substratlösung wurde bis zu 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger kurz in TNT-Puffer gespült und anschließend weitere 15 min in diesem Puffer gewaschen. Bei der Alternativmethode mit Dextransulfat wurde dieses Waschen bei 55°C, ansonsten bei Raumtemperatur, aber jeweils unter Schütteln im Dunklen durchgeführt. Nach diesem Waschschrift wurden die Objektträger nochmals kurz mit H₂O gespült, getrocknet und in Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., Canterbury, England) eingebettet.

2.9.6 Vorbehandlungen

Wie oben angesprochen, wurden verschiedene Vorbehandlungsmethoden zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Zellen für die Sondenmoleküle durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

- *Lysozymlösung*
 - 0,1-10,0 mg/ml Lysozym (109.000 U/mg; Fluka, Buchs, Schweiz) in
 - 0,1 M Tris-HCl
 - 0,05 M EDTA
 - pH 8,0
- *Proteinase K-Lösung*
 - 1 mg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in
 - H₂O
- *SDS/Dithiothreitol* (Nicholson und Setlow, 1990)
 - 1% (w/v) SDS
 - 50 mM Dithiothreitol (DTT; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
 - SDS in 40 ml H₂O auf 65°C erwärmen und entsprechende Menge an DTT zugeben
- *Essigsäureanhydrid/Wasserstoffperoxid* (El-Gammal und Sadek, 1988)
 - 10% (v/v) Essigsäureanhydrid
 - 3% (v/v) Wasserstoffperoxid

2 Material und Methoden

- *SDS/Triton X100*
 - 5% SDS
 - 5% Triton X100
- *Formamid (FA)*
 - 90% FA
 - 20 mM Tris-HCl

Durchführung:

Vorbehandlungen wurden stets mit den bereits auf Objektträgern immobilisierten und der Ethanolreihe unterzogenen Zellen durchgeführt. Bis auf die Behandlung mit SDS/DTT, bei der der komplette Objektträger in einem 50 ml-Probengefäß mit der Lösung bei 65°C inkubiert wurde, wurden bei den Verfahren 30 µl der entsprechenden Lösung auf die Aussparungen der Objektträger pipettiert und in einer feuchten Kammer inkubiert (Zeit und Temperatur sind in Tabelle 2.7 zu finden). Anschließend wurden die Objektträger mit H₂O abgespült, getrocknet und erneut einer Ethanolreihe unterzogen. Nach dem Trocknen wurde die unter 2.9.2 beschriebene Hybridisierung fortgesetzt.

| Behandlung | Zeit | Temperatur |
|--|----------|------------|
| Lysozym | 5-30 min | 37°C |
| Proteinase K | 10 min | 0°C |
| SDS/DTT | 30 min | 65°C |
| Essigsäureanhydrid/H ₂ O ₂ | 1 h | RT |
| SDS/Triton X100 | 1 h | 46°C |
| FA | 1 h | 46°C |

Tabelle 2.7: Zeiten und Temperaturen für Vorbehandlungen

2.10 Doppelhybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden

Doppelhybridisierungen mit zwei POD-markierten Sonden mußten sukzessive erfolgen, wobei die erste Hybridisierung wie sonst üblich einschließlich der Detektion der Sonde durchgeführt wurde. Der getrocknete Objektträger wurde anschließend der zweiten Hybridisierung unterzogen. Um die POD-Sonde aus der ersten Hybridisierung zu inaktivieren, wurde z. T. ein Hitzeschritt vor die zweite Hybridisierung geschaltet (80°C, 1 h). Die beiden Sonden konnten sowohl nichtfluoreszierend als auch fluoreszierend detektiert werden.

Doppelhybridisierungen mit POD- und fluoreszenzmarkierter Sonde konnten simultan durchgeführt werden. Dazu wurde zum Hybridisierungsansatz mit der POD-Sonde 1 µl Arbeitslösung der fluoreszenzmarkierten Sonde zugegeben und die Hybridisierung wie sonst üblich einschließlich der Detektion der POD-Sonde fortgesetzt.

2.11 Ganzzellhybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden wurden bei einer Temperatur von 46°C durchgeführt und bei einer Temperatur von 48°C gewaschen. Außerdem enthielt der Hybridisierungspuffer kein Blocking Reagens, das durch H₂O ersetzt wurde.

Verwendete Lösungen:

Für Hybridisierungs- und Waschpuffer verwendete Stammlösungen siehe 2.9.1!

- *Hybridisierungspuffer*

| | |
|--------------------------|--------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8,0) | 20 µl |
| 5 M NaCl | 180 µl |
| FA | x µl |
| 10% SDS | 1 µl |
| ad 1 ml H ₂ O | |

2 Material und Methoden

- *Waschpuffer*

| | |
|---------------------------|--------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8,0) | 1000 μ l |
| 5 M NaCl | y μ l |
| 0,5 M EDTA (ab 20% FA) | 500 μ l |
| 10% SDS | 50 μ l |
| ad 50 ml H ₂ O | |

Wie bei der Hybridisierung mit 35°C war auch hier die NaCl-Konzentration abhängig von der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer. Aufschluß über die entsprechenden Kombinationen gibt Tabelle 2.8:

| % Formamid bei der Hybridisierung | [Na ⁺] in M | μ l 5 M NaCl auf 50 ml |
|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 0 | 0,900 | 9000 |
| 5 | 0,636 | 6300 |
| 10 | 0,450 | 4500 |
| 15 | 0,318 | 3180 |
| 20 | 0,225 | 2150 |
| 25 | 0,159 | 1490 |
| 30 | 0,112 | 1020 |
| 35 | 0,080 | 700 |
| 40 | 0,056 | 460 |
| 45 | 0,040 | 300 |
| 50 | 0,028 | 180 |
| 55 | 0,020 | 100 |
| 60 | 0,014 | 40 |
| 65 | 0,010 | 0 |

Tabelle 2.8: Waschpuffer für Hybridisierungen bei 46°C in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers.

Durchführung:

Die Zellen wurden wie unter 2.9.2 beschrieben vorbereitet, mit 9 μ l Hybridisierungspuffer, vermischt mit 1 μ l Sondenarbeitslösung, (oder 8 μ l und je ein 1 μ l unterschiedlich markierter Sonden für Doppelhybridisierungen) überschichtet und 1,5-2 h in einer mit Hybridisierungspuffer angefeuchteten Kammer bei 46°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger kurz mit auf 48°C vorgewärmtem Waschpuffer abgespült und in einem 50 ml-Probengefaß mit dem gleichen Puffer 15-30 min bei 48°C gewaschen. Nach diesem Schritt

wurde vorsichtig mit H₂O abgespült und luftgetrocknet. Die Einbettung der Objektträger für das Mikroskopieren erfolgte wie oben in Citifluor.

2.12 Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse

2.12.1 Konventionelle Licht- bzw. Auflichtfluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse und Dokumentation der Ganzzellhybridisierungsergebnisse standen mehrere Mikroskope, ausgerüstet mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Axioskop, Axioplan, Axiophot 2, Axiovert; Carl Zeiss, Jena, Deutschland), zur Verfügung. Sie waren ausgestattet mit Plan-Neofluar-Objektiven in den Vergrößerungen 10-, 20-, 40-, 63- und 100fach und entsprechenden Kameraeinheiten (MC100 bzw. Axiophotaufsatz) zur Dokumentation auf Farbdia- (Kodak Ektachrome P1600x oder 100S) oder schwarzweiß Negativfilmen (Kodak T_{max}400).

Mit POD-Sonden hybridisierte Zellen, bei denen der Nachweis nichtfluoreszierend erfolgte, wurden mit dem Durchlichtverfahren im Hellfeld und Phasenkontrast mikroskopiert.

Die Detektion von Chemilumineszenzsignalen erfolgte mit Hilfe einer hochempfindlichen photonensensitiven Kamera (Hamamatsu C2400-47; Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland), die an den Kameraausgang eines Axioplans (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) montiert war. Näheres zur Aufnahme von Bildern und zur Funktionsweise der Kamera findet sich bei Sternberg *et al.* (1997).

Die Auflichteinrichtung beim Axiophot 2 war mit einer 100 W Quecksilberhochdrucklampe, die der anderen Mikroskope mit einer 50 W Lampe ausgestattet. Die Leuchtintensität der 100 W Lampe war über eine AttoArcTM-Steuereinheit (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) regelbar. Für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe standen folgende, in Tabelle 2.9 aufgeführten, Filterkombinationen zur Verfügung:

| Filtersatz | Anregungsfilter [nm] | Farbteiler [nm] | Emissionsfilter [nm] | verwendbar für |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| 01 | BP 365/12 | FT 395 | LP 397 | DAPI |
| 09 | BP 470/40 | FT 510 | LP 520 | FLUOS |
| 15 | BP 546/12 | FT 580 | LP 590 | TRITC, Cy3 |
| 16 | BP 485/20 | FT 510 | LP 520 | FLUOS |
| 20 | BP 546/12 | FT 560 | 575-640 | TRITC, Cy3 |
| HQ-FITC | HQ 480/40 | Q 505 LP | HQ 535/50 | FLUOS |
| HQ-Cy3 | HQ 545/50 | Q 565 LP | HQ 610/75 | Cy3, TRITC |
| Pinkel | BP 495/15, | Polychroic 400, | Nr. 3368 | FLUOS u. |
| Dual | BP 575/25 | refl. 405/495/575 | | TRITC bzw. Cy3 |

Tabelle 2.9: Für die Epifluoreszenzmikroskopie verwendete Filtersätze (Carl Zeiss, Jena; HQ- und Pinkel Dual Filtersätze über AHF Analysetechnik, Tübingen). BP, Bandpaß; LP, Langpaß; FT, Farbteiler; HQ, „High Quality“.

2.12.2 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie bietet den Vorteil, Objekte ohne die störende Fluoreszenz der Bereiche ober- und unterhalb der eingestellten Fokusebene zu erfassen. Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn das zu beobachtende Präparat starke Autofluoreszenz oder eine große räumliche Ausdehnung besitzt, welche in der konventionellen Mikroskopie nicht adäquat dargestellt werden kann. Emittiertes Licht aus Brennebenen, die über oder unter der Fokusebene liegen, kann die Bildschärfe erheblich reduzieren. Diese Beschränkung kann durch die konfokale Laserscanning-Mikroskopie aufgehoben werden.

Das Präparat wird punktförmig mit monochromatischem Licht angeregt, wobei als Lichtquellen Laserlinien verschiedener Wellenlänge genutzt werden. Das zu untersuchende Objekt wird auf diese Weise in zwei Raumrichtungen abgerastert. Die von jedem Bildpunkt ausgesandte Fluoreszenz wird über Photomultiplier verstärkt und von einem Detektor als Helligkeitswert gemessen. Dabei ist im Lichtweg ein „pinhole“ (eine kleine Lochblende) eingeschaltet, welches bewirkt, daß nur Licht aus einer definierten Brennebene, bei gleichzeitiger Ausblendung sämtlichen Streulichtes, detektiert wird. Durch wiederholtes Abrastern verschiedener Fokusebenen werden optische Schnitte durch ein Präparat gelegt, die zusammen die dreidimensionale Struktur des Präparats wiedergeben. Die Bildinformation steht

dabei pixelweise in digitaler Form zur Verfügung. Dadurch wird eine anschließende Bildbearbeitung sowie die Darstellung der räumlichen Information in Form von Projektionen, Schnitten oder farbcodierten Tiefenprofilen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein inverses konfokales Laserscanning-Mikroskop vom Typ LSM 410 und sein Nachfolgemodell LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), koppelbar an einen inversen oder aufrechten Mikroskopstand, verwendet. Genauere Daten zum LSM 410 finden sich z. B. bei Snaidr (1998), das LSM 510 wurde mit Laserlinien bei 488 nm und 543 nm benutzt, die Steuerung und Bildverarbeitung erfolgte über die mitgelieferte Software (Version 1.49.44). Bilder wurden über PowerPoint 97 (Microsoft GmbH, Unterhaching, Deutschland) mit einem Diabelichter (Personal LFR plus; Lasergraphics, Irvine, CA) auf Farbumkehrfilm (Kodak Ektachrome 100S) ausgegeben.

2.13 Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen

2.13.1 Quantifizierung mittels mikroskopgestützter Bildverarbeitung

Ausführliche Beschreibungen der Bestandteile des Quantifizierungssystems sowie des genutzten Softwareprogramms FGCELL sind bei Trebesius (1995) zu finden.

2.13.1.1 Voreinstellung der Parameter zur Bildaufnahme

Theoretisch sollten die Parameter Helligkeit und Kontrast der Kamerasteuereinheit so eingestellt werden, daß die zu untersuchenden Proben den gesamten Dynamikbereich der 256-stufigen Grauwertskala der CCD-Kamera (CF15/2; Kappa Meßtechnik, Gleichen, Deutschland) ausschöpfen können, ohne allerdings den oberen oder unteren Grenzwert zu erreichen. Bei konstanter Belichtungszeit können dann die ermittelten Werte direkt miteinander verglichen werden. Bei den sehr großen Helligkeitsunterschieden von direkt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden und POD-markierten Oligonukleotiden, die mit dem TSA-System nachgewiesen wurden, war eine einheitliche Voreinstellung aber nicht möglich, so daß bei konstanten Parametern Helligkeit und Kontrast, die Belichtungszeit entsprechend angepaßt wurde. Da der lineare Zusammenhang von Zeit und Helligkeitswert bei dieser Meßanordnung bereits gezeigt wurde (Trebesius, 1995), konnten die ermittelten Werte nach Umrechnung ebenfalls miteinander verglichen werden.

2.13.1.2 Aufnahme der Bilder

Für jede zu messende Hybridisierung wurde ein einzelner Objektträger verwendet, der bis zur Analyse im Dunklen aufbewahrt wurde. Nach Einbetten in Citifluor wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop analysiert. Die Bildaufnahmeoption wurde in OPTIMAS (Version 3.01, Bioscan Inc., Washington, DC) auf „Acquire“ gestellt, der Kameraausgang des Mikroskops geöffnet, und die Bildaufnahmeoption auf „Freeze“ gesetzt. Das erhaltene Bild wurde als TIFF-Datei gespeichert. Für jede Hybridisierung wurden mindestens 100 quantifizierbare Objekte aufgenommen.

2.13.1.3 Auswerten der Bilder

Die zu einer Hybridisierung gehörigen Bilder wurden nacheinander mit dem Programm FGCELL ausgewertet, wobei die erhaltenen Daten sukzessive in einer ASCII-Datei gespeichert wurden. Diese Datei wurde in das Tabellenkalkulationsprogramm EXCELL 5.0 (Microsoft GmbH, Unterhaching, Deutschland) eingelesen und weiter bearbeitet. Da unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden Einfluß auf die Größe der Zellen nahmen, wurde darauf verzichtet, die relative Fluoreszenzintensität als Helligkeit pro Fläche zu bestimmen und statt dessen die Helligkeit pro Zelle verwendet, um diesen Einfluß auszuschließen. Für jede Hybridisierung wurde Mittelwert und Standardabweichung aus allen gemessenen Zellen berechnet. Werte für Aufnahmen mit niedrigen Belichtungszeiten wurden auf die jeweils höchste Belichtungszeit extrapoliert.

2.13.2 Quantifizierung mittels Durchflußzytometer

2.13.2.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen oder allgemein Partikel in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl nach verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern vermessen werden können. Als Detektorsysteme werden neben optischen auch elektronische und akustische Sensoren und Sensoren für Radioaktivität eingesetzt werden (Shapiro, 1995). In dieser Arbeit wurde mit dem gängigsten Typ, dem Durchflußzytometer mit Streulicht- und Fluoreszenzmessung gearbeitet.

Die in Flüssigkeit vorliegende Probe („cell suspension“) wird über eine sehr feine Nadel als Probenstrom in einer Kammer („flow chamber“) in einen breiten Mantelstrom („sheath liquid“) eingespritzt (vgl. Abbildung 2.1). Am Ende der Kammer tritt der Flüssigkeitsstrahl durch eine sich verjüngende Düse aus. Dadurch wird der gesamte Strahl auf den Düsen-

durchmesser (zwischen 50-200 μm , je nach Fabrikat) eingeengt. Sowohl der Mantelstrom als auch die sich verjüngende Düse haben den Effekt, daß die Zellen im Probenstrahl vereinzelt werden, und der gesamte Strahl stabilisiert mit hoher Geschwindigkeit (ca. 10 m/s) aus der Düse strömt.

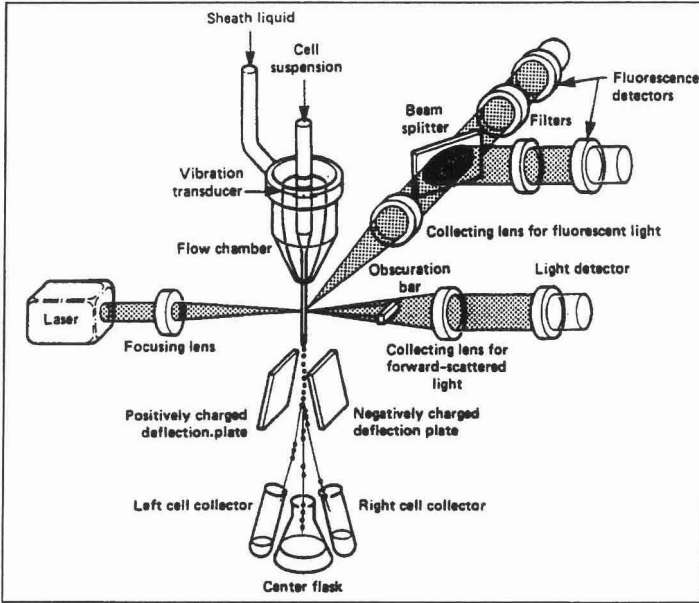


Abbildung 2.1.: Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers (aus Dean, 1990)

Durch diese sogenannte hydrodynamische Fokussierung passieren die Zellen einzeln und exakt im Zentrum des Flüssigkeitsstrahls, aufgereiht wie Perlen an einer Schnur, den Beobachtungspunkt und werden schließlich in einem Abfallbehälter („center flask“) aufgefangen. An diesem Beobachtungspunkt treten die Zellen mit dem Anregungslicht in Wechselwirkung. Dieses wird zum einen von den Zellen in alle Richtungen gestreut (Streulicht), zum anderen absorbiert und als Fluoreszenzlicht wieder emittiert. Durch geeignete Spiegel- und Filtersysteme können die verschiedenen Signale aufgrund ihrer räumlichen und spektralen Unterschiede voneinander getrennt und jeweils eigenen optischen Detektoren zugeführt werden. Diese wandeln die optischen in elektrische Signale um, die dann weiterverarbeitet werden. Vorteil der Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels Durchflußzytometer ist neben des

großen Dynamikumfangs der Meßanordnung, der Messungen über mehrere Größenordnungen unter Beibehaltung der voreingestellten Parameter zuläßt, auch der hohe Probendurchsatz, der sehr schnell statistisch abgesicherte Durchschnittswerte für Messungen liefert.

2.13.2.2 *Verwendetes Gerät*

Alle Arbeiten wurden an einem Durchflußzytometer „FACS Star Plus“ (Becton Dickinson, Mountain View, CA) in der Arbeitsgruppe „Durchflußzytometrie“ an der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH, Neuherberg, Deutschland) in Zusammenarbeit mit Herrn Bernhard Fuchs durchgeführt. Alle weiteren Gerätedaten wie Lichtquellen und Filter finden sich bei Fuchs (1996).

2.13.2.3 *Ganzzellhybridisierung in Flüssigkeit*

Verwendete Lösungen:

Hybridisierungspuffer wurden hergestellt wie bei den entsprechenden Hybridisierungen beschrieben (Kapitel 2.9.2 und 2.11). Anstelle der dort benutzten Waschpuffer wurde der jeweilige Hybridisierungspuffer zum Waschen verwendet.

- *Lysozymlösung*

0,1 mg/ml Lysozym (Fluka, Buchs, Schweiz; 66.200 U/mg) in
100 mM Tris-HCl
50 mM EDTA
pH 8,0

- *1× PBS*

(siehe Kapitel 2.1.3)
pH 8,4

Durchführung:

Für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wurden die Hybridisierungen standardmäßig durchgeführt wie schon früher beschrieben (Wallner *et al.*, 1993; Fuchs, 1996; Wallner *et al.*, 1995). Dieses Standardprotokoll wurde für POD-markierte Sonden wie folgt abgewandelt: mit PFA fixierte Zellen wurden abzentrifugiert (5.000× g, 5 min), und das Pellet nach Verwerfen des Überstands in der Lysozymlösung resuspendiert. Nach einer 5minütigen Inkubation auf

Eis wurde erneut abzentrifugiert, in $1\times$ PBS gewaschen und $80\ \mu\text{l}$ Hybridisierungspuffer, versetzt mit $2\ \mu\text{l}$ einer Sondenarbeitslösung (siehe Kapitel 2.7.3), zugegeben. Zellen, die in Ethanol fixiert wurden, wurden ohne Vorbehandlung hybridisiert. Nach 3 h Hybridisierung bei 35°C wurde abzentrifugiert, der Puffer durch den entsprechenden Hybridisierungspuffer ohne Sonde ersetzt und weitere 30 min bei 35°C gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde erneut abzentrifugiert und anschließend mit TNT-Puffer (siehe Kapitel 2.9.4) für 15 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Wieder wurde abzentrifugiert und die Zellen in Fluorescein-Tyramid-Substratlösung resuspendiert. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert und 15 min bei Raumtemperatur in TNT-Puffer gewaschen. Schlußendlich wurden die Zellen nach beiden Hybridisierungsverfahren in $1\times$ PBS resuspendiert, um sie durchflußzytometrisch zu untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Hybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden

Bei der Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden läuft im Prinzip der gleiche Vorgang ab wie bei der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden, nur daß der Fluoreszenzfarbstoff durch das Enzym ersetzt wird. Eine erfolgreiche Anwendung dieser Methode setzt die Zugänglichkeit für die, im Vergleich zu direkt fluoreszenzmarkierten Sonden, größeren enzymgekoppelten Sondenmoleküle voraus. Zu beachten ist außerdem die Notwendigkeit einer niedrigeren Hybridisierungstemperatur, bedingt durch die Temperaturinstabilität des verwendeten Enzyms. Um die sondentypische Stringenz der Hybridisierung zu erhalten, muß daher mehr Formamid zugegeben werden (siehe 2.9). Zudem kann eine Enzymmarkierung nicht direkt, z.B. durch Fluoreszenzanregung, nachgewiesen werden. Ein weiterer Detektionsschritt nach der Hybridisierung ist notwendig, um das durch die Hybridisierung der Sonde an die rRNS in der Zelle vorliegende Enzym sichtbar zu machen. Man bedient sich dazu verschiedener Substrate, die spezifisch von der Meerrettichperoxidase umgesetzt werden und dabei ihre Eigenschaften so verändern, daß deren Anwesenheit erkennbar wird. In dieser Arbeit wurden drei prinzipiell unterschiedliche Detektionsmethoden verwendet.

3.1.1 Nichtfluoreszierender Nachweis

Für die nichtfluoreszierende Detektion bei Ganzzellhybridisierungen wurden chromogene Substrate benutzt, die durch die Umsetzung zum einen ihre Farbe änderten, zum anderen präzipitierten und so lokal begrenzt am Bildungsort, sprich nur in hybridisierten Zellen, eine Farbreaktion auslösten. Positive Zielorganismen konnten dann leicht durch diese Anfärbung erkannt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden TETON, das einen blauen Niederschlag bildet, oder das bräunlich-schwarz präzipitierende DAB-Substrat verwendet. Durch die unterschiedliche Farbe der beiden Substrate war es möglich, Zellen die gemeinsam in einer Probe vorlagen, durch zwei aufeinanderfolgende Hybridisierungen mit unterschiedlichen Sonden zu diskriminieren, indem die Detektion der gebundenen Sonde nach der ersten Hybridisierung mit dem bräunlich-schwarzen DAB-Substrat durchgeführt wurde und nach der zweiten Hybridisierung mit dem blauen TETON. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Doppelhybridisierung und die Detektion mit den beiden unterschiedlichen Substraten.

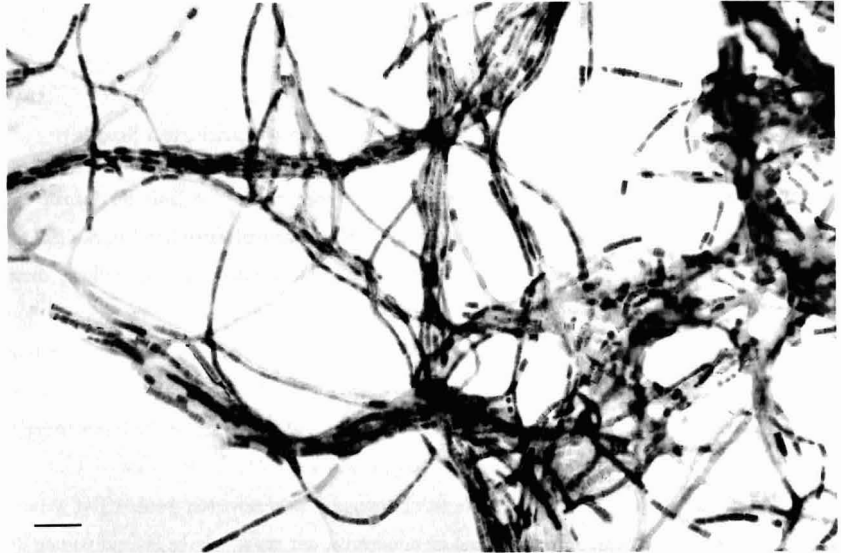


Abbildung 3.1: Beispiel für eine sukzessive Doppelhybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden mit nichtfluoreszierender Detektion der gebundenen Sondenmoleküle. Eine Mischung aus Zellen von *Microcoleus* sp. PCC 7420 und *Tolypothrix* sp. PCC 7101 wurde nacheinander mit den Sonden CYA664 und CYA762 hybridisiert. Die Sonde CYA664 war spezifisch für *Tolypothrix* sp. und wurde mit dem braunen DAB-Substrat nachgewiesen, die Sonde CYA762 war spezifisch für beide Stämme. Außer den Zellen von *Microcoleus* sp. wurden nach der zweiten Hybridisierung beim Nachweis mit dem blauen Substrat TETON auch einige der nach der ersten Hybridisierung noch nicht gefärbten Zellen in den Filamenten von *Tolypothrix* sp. gefärbt. Hellfeldaufnahme; Vergrößerung 400fach; Balken 20 μm .

3.1.2 Chemilumineszenznachweis

3.1.2.1 Membranhybridisierungen

Hybridisierungen von membrangebundenen Nukleinsäuren mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden wurden bei einer Anzahl von PCR-Produkten von Referenzorganismen zur Charakterisierung der Spezifität von cyanobakterienspezifischen Sonden durchgeführt. Mit ECL als Substrat konnte die Anwesenheit gebundener Sonden aufgrund emittierter Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen detektiert werden. Bei konstanter Temperatur von 35°C wurden durch unterschiedliche Konzentrationen an Formamid im Hybridisierungspuffer und

entsprechend an NaCl im Waschpuffer geeignete Stringenzen für die Hybridisierung bestimmt, die nur eine spezifische Bindung der Sonden zuließen (siehe 3.2.2).

3.1.2.2 Ganzzellhybridisierungen

Auch bei Hybridisierung ganzer Zellen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden wurden chemilumineszierende Substrate zum Nachweis der sondenvermittelten Enzymaktivität verwendet. Mit einer photonensensitiven Kamera auf der Detektionsseite war es möglich, mit dem SuperSignal™-Substrat, nicht aber mit ECL, spezifische Signale zu erhalten, wobei die Substratlösungen zum Einbetten der hybridisierten Zellen verwendet wurden und so während der Beobachtung zur Verfügung standen. Wie die Abbildung 3.2 zeigt, waren für *E. coli* Signale nur aus größeren Ansammlungen ab etwa 20-40 Zellen nachweisbar, bei den größeren Cyanobakterien wurde fast Einzelzellniveau erreicht. Neben dem ebenfalls in Abbildung 3.2 gezeigten *Cylindrospermum* sp. PCC 7417 konnten auch *Nostoc* sp. PCC 7120 und *Aphanizomenon* sp. PCC 7905 in ähnlicher Auflösung dargestellt werden.

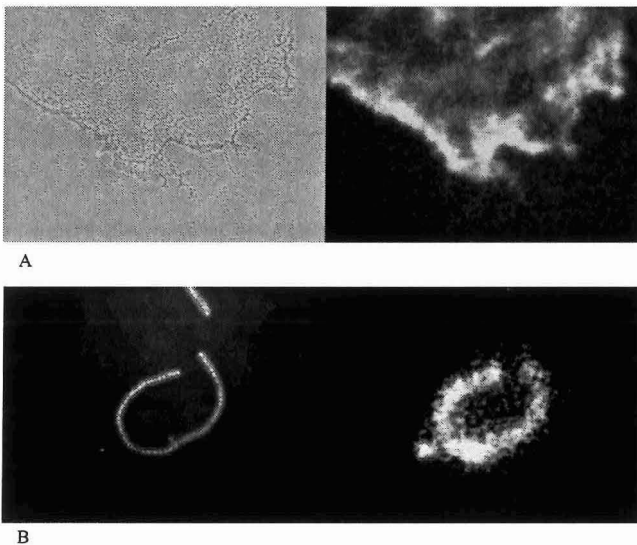


Abbildung 3.2: Nachweis Meerrettichperoxidase-markierter Sonden in ganzen Zellen mit Hilfe eines chemilumineszierenden Substrates. Hybridisierung jeweils mit EUB338. A, Zellen von *E. coli*. B, Filament von *Cylindrospermum* sp. PCC 7417. Links, Phasenkontrastaufnahmen; rechts Aufnahmen der photonensensitiven Kamera im Photon-counting Modus; Vergrößerung 400fach.

3.1.3 Steigerung der Sensitivität von Ganzzellhybridisierungen durch Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA)

Bei dieser Art von Signalverstärkung wird das Potential der sondengebundenen Meerrettichperoxidase-Moleküle ausgenutzt, mehr als ein Substratmolekül umzusetzen. Gilt bei direkt fluoreszenzmarkierten Sonden, daß jedes Sondenmolekül genau ein Fluoreszenzmolekül zur Detektion beiträgt, kann jedes an die Zelle gebundene Enzymmolekül theoretisch die Anlagerung beliebig vieler detektierbarer Substratmoleküle induzieren. Dadurch kommt es zur gewünschten Signalverstärkung.

3.1.3.1 Spezifität und Anwendbarkeit

Erste Resultate mit einer Mischung aus ethanolfixierten Zellen von *Escherichia coli* und *Acinetobacter calcoaceticus*, jeweils aus logarithmischer Kultur, zeigten die Möglichkeit, auch mit dieser Methode spezifische Detektionen zu erreichen. Während mit der für die meisten Bakterien spezifischen Sonde EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' [Stahl *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990]) beide Organismen angefärbt wurden, zeigten nach der Hybridisierung mit der Sonde ACA23a (5'-ATCCTCTCCCATACTCTA-3' [Wagner *et al.*, 1994]) nur die kokkoiden Zellen von *A. calcoaceticus* starke Fluoreszenz. Beide Male waren die Signale mit den entsprechenden direkt fluoreszenzmarkierten Sonden deutlich schwächer, wie der Vergleich bei gleicher Belichtungszeit aufgenommener Bilder zeigt (Abbildung 3.3). Mit der für Eukaryonten spezifischen Sonde EUK516 (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3' [Amann *et al.*, 1995]) durchgeführte Negativkontrollen bzw. TSA-Inkubationen an nicht hybridisierten Zellen zeigten die Spezifität des Nachweises für durch Hybridbildung gebundene Sonden bzw. das Fehlen endogener Peroxidasen bei den verwendeten Organismen. Eine geringe Hintergrundfluoreszenz war stets vom deutlich helleren positiven Signal zu unterscheiden. Aufnahmen dieser Negativkontrollen mit den für die Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse ausreichenden Belichtungszeiten ließen keine Fluoreszenz erkennen.

Um die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode zu untersuchen, wurden Hybridisierungen auch mit Vertretern anderer bakterieller Phyla durchgeführt. *Burkholderia cepacia* und *Neisseria canis* als Vertreter der beta-Gruppe, sowie *Brevundimonas diminuta* als Mitglied der alpha-Gruppe der Proteobakterien konnten ebenfalls nachgewiesen werden, auch wenn die Signale von ethanolfixierten Zellen sehr uneinheitlich waren. Eine Verbesserung hinsichtlich dieser uneinheitlichen Färbung brachte die Hybridisierung Paraformaldehyd-fixierter Zellen, die mit Lysozym vorbehandelt worden waren.

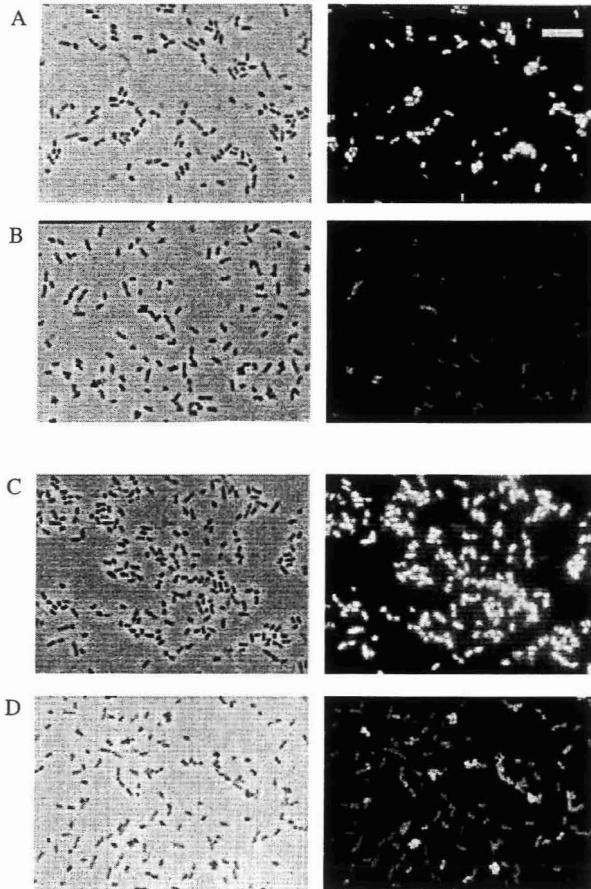


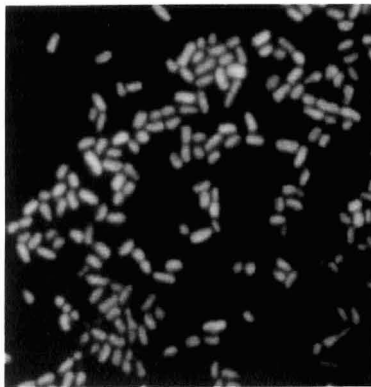
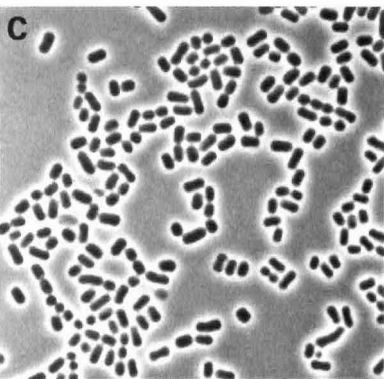
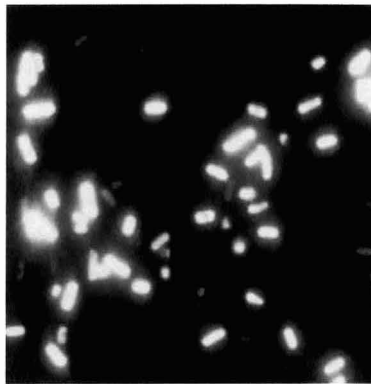
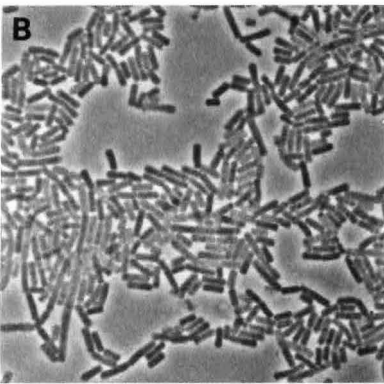
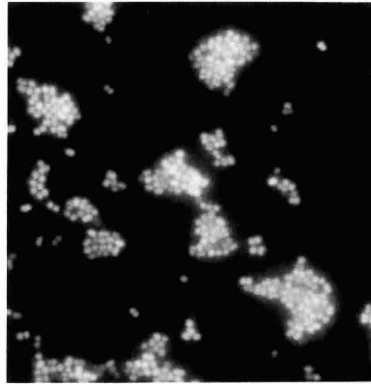
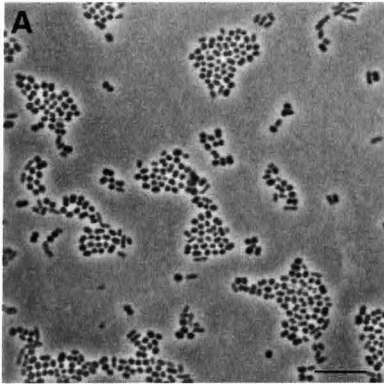
Abbildung 3.3: Hybridisierungen von Mischungen aus Zellen von *E. coli* und *A. calcoaceticus*. A, Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierter Sonde ACA23a und Nachweis mit Fluorescein-Tyramid. B, Hybridisierung mit fluoresceinmarkierter Sonde ACA23a. C, Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierter Sonde EUB338 und Nachweis mit Fluorescein-Tyramid. D, Hybridisierung mit fluoresceinmarkierter Sonde EUB338. Belichtungszeit bei A und B 4 s, bei C und D 2 s. Links, Phasenkontrastaufnahmen; rechts, Epifluoreszenzaufnahmen mit dem Filtersatz 09; Vergrößerung 1.000fach, Balken 10 µm.

Bei grampositiven Organismen mit hohem G+C Gehalt der DNS (*Corynebacterium glutamicum* und *Micrococcus luteus*) bzw. niedrigem G+C Gehalt der DNS (*Bacillus subtilis*, *B. cereus* und *B.*

firmus) waren dagegen nach Fixierung mit Ethanol und zusätzlicher Vorbehandlung mit Lysozym nur einzelne Zellen zu detektieren, diese aber mit hoher Signalstärke. Von den untersuchten Euryarchaeota zeigten die meisten in mehr als 50% der Zellen stärkere Signale nach der Hybridisierung mit der Sonde ARCH915 (5'-GTGCTCCCCGCAATTCCT-3' [Stahl und Amann, 1991] als mit der entsprechenden direkt fluoreszenzmarkierten Sonde. Zellen von *Methanogenium organophilum*, die schon bei normaler Hybridisierung ungleichmäßige Signale zeigten, waren für Meerrettichperoxidase-markierte Sonden nicht zugänglich. Abbildung 3.4 zeigt Beispiele für verschiedene Bakterien.

Um die Sensitivität der Methode weiter zu untersuchen, wurden Hybridisierungen mit *E. coli*-Zellen durchgeführt, die über 60 Tage in Leitungswasser ausgehungert worden waren. Dazu wurden Zellen verwendet, die entweder auf Polycarbonatfiltern konzentriert und durch Trocknen fixiert oder mit Ethanol fixiert und auf Objektträger getropft wurden. Weniger als 5% der Zellen konnten in beiden Fällen angefärbt werden, wobei die Signale mit der Standardmethode deutlich niedriger waren als die mit TSA. Eine Vorbehandlung mit Lysozym (0,1 mg/ml; bis zu 30 min) erhöhte den Anteil der mit POD-Sonden detektierbaren Zellen auf etwa 10-15% bei stark angestiegener Signalstärke (Abbildung 3.5). Wurden die auf Filtern konzentrierten Zellen auf mit LB-Medium getränktem Whatman Papier zunächst inkubiert (Meier, 1997), so hatten sich nach drei Stunden kleine Kolonien mit zehn bis zwanzig, im Vergleich zu den ausgehungerten Zellen fünfmal größere, Zellen gebildet, die unter zehn Prozent der Gesamtzellzahl auf dem Filter ausmachten, aber fast alle ein sehr helles Signal zeigten (Abbildung 3.5). Nach sechs Stunden Inkubation umfaßten die Kolonien 50 bis 100 größere Zellen, die nach der Hybridisierung eine hohe Signalstärke erreichten. Kleinere Zellen waren nach dieser Inkubationszeit fast vollständig verschwunden. Eine Vorbehandlung mit Lysozym nach drei- bzw. sechsständiger Inkubation führte zu einem Abfall der Signalintensität.

Abbildung 3.4: Beispiele für die Tyramid-Signal-Amplifikation. Hybridisierungen mit EUB338, markiert mit Meerrettichperoxidase, und Nachweis mit Fluorescein-Tyramid. A, *E. coli*-Zellen aus stationärer Phase. B, *Bacillus cereus*. C, *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. Links, Phasenkontrastaufnahmen; rechts, Epifluoreszenzaufnahmen mit dem Filtersatz 09; Vergrößerung 1.000fach; Balken 10 µm.



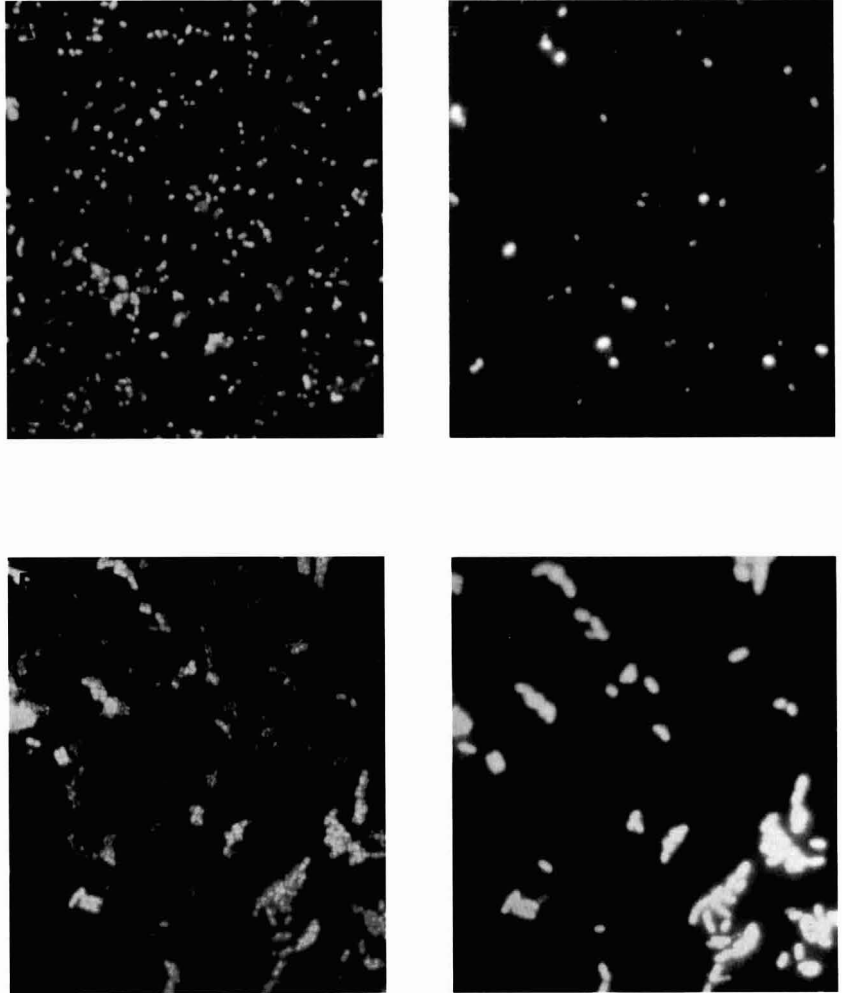


Abbildung 3.5: Hybridisierungen von ausgehungerten *E. coli*-Zellen auf Filtern. Hybridisierung mit EUB338 markiert mit Meerrettichperoxidase und Nachweis mit TSA. A, ohne Inkubation, mit Lysozymbehandlung. B, nach dreistündiger Inkubation auf mit LB-Medium getränktem Whatman Papier, ohne Lysozymbehandlung. Links, Epifluoreszenzaufnahmen mit dem Filtersatz 01; rechts, Epifluoreszenzaufnahmen mit dem Filtersatz 09; Vergrößerung 1.000fach, Balken 10 μm .

3.1.3.2 Quantifizierung der Signalstärken über Bildverarbeitung

E. coli-Zellen aus einer Übernachtskultur wurden 1:10 (Kultur I) bzw. 1:20 (Kultur II) in frisches Medium überimpft und bei 37°C inkubiert. Zellen aus Kultur I wurden nach 45 Minuten bei einer OD₅₆₀ von 0,7 geerntet, Zellen aus Kultur II nach zwei Stunden und einer OD₅₆₀ von 0,8. Außerdem wurden Zellen aus der Übernachtskultur geerntet. Aliquots wurden jeweils mit Paraformaldehyd bzw. Ethanol fixiert und nach Immobilisierung auf Objektträgern im Vergleich den beiden Hybridisierungsverfahren unterzogen. Erste Hybridisierungen der mit Ethanol fixierten Zellen mit direkt fluoreszenzmarkierten Sonden zeigten die hellsten und gleichmäßigsten Signale bei Kultur I, bei Kultur II waren die Signale schwächer und nicht alle Zellen hybridisiert. Bei der Übernachtskultur waren nur einzelne Zellen viel schwächer fluoreszierend zu erkennen. Dieser erste Eindruck spiegelte sich auch in den Werten der Quantifizierung der Fluoreszenzsignale bei Kultur I und II wider: nach Fixierung mit Ethanol waren die durchschnittlichen Signale von Kultur I heller ($50,3 \pm 16,1$ relative Helligkeit pro Zelle im Vergleich zu $42,2 \pm 16,9$). Das Verhältnis Standardabweichung zu relativer Helligkeit war dabei mit 32% bei Kultur I deutlich niedriger als bei Kultur II mit 40%. Für die Übernachtskultur konnten nach Fixierung mit Ethanol keine Werte bestimmt werden, erst nach Vorbehandlung mit Lysozym waren Signale von Paraformaldehyd-fixierten Zellen meßbar ($12,0 \pm 3,7$). Die Angabe der Helligkeit pro Zelle und nicht pro Fläche wurde nach den ersten Hybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden und Signalverstärkung gewählt, als deutlich wurde, daß die unterschiedlichen Verfahren nach der Hybridisierung voneinander abweichende Zellgrößen ergaben. Besonders auffällig war eine Zunahme der Größe bei Zellen, die mit Paraformaldehyd fixiert, mit Lysozym vorbehandelt und mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden hybridisiert wurden. Nach der Inkubation mit Fluorescein-Tyramid war bei Kultur I und II etwa ein Verdopplung der Größe (1314 ± 285 bzw. 1308 ± 229) im Vergleich zu Zellen bei allen anderen Versuchen festzustellen, bei denen im Rahmen der Meßtoleranz mehr oder weniger gleiche Werte vorkamen (zwischen 650 ± 135 und 817 ± 142 Bildpunkte).

3 Ergebnisse

| Kultur | Fixierung | Lysozym | Sonde | Zeit | Mittelwert | Standardabweichung | korr. Mittelwert | korr. Standardabweichung |
|--------|-----------|---------|-------|------|------------|--------------------|------------------|--------------------------|
| I | PFA | nein | FLUOS | 6 | 50,3 | 16,1 | 50,3 | 16,1 (32,1%) |
| I | PFA | ja | FLUOS | 6 | 30,8 | 9,2 | 30,8 | 9,2 (29,9%) |
| I | EtOH | nein | POD | 0,2 | 34,8 | 9,2 | 1044 | 276 (26,4%) |
| I | PFA | nein | POD | 0,4 | 47,3 | 17,1 | 709,5 | 256,5 (36,1%) |
| I | PFA | ja | POD | 0,6 | 102,2 | 29,3 | 1022 | 293 (28,7%) |
| II | PFA | nein | FLUOS | 6 | 42,2 | 16,9 | 42,2 | 16,9 (40,0%) |
| II | PFA | ja | FLUOS | 6 | 23,6 | 6,9 | 23,6 | 6,9 (29,1%) |
| II | EtOH | nein | POD | 0,2 | 37,2 | 11,6 | 1116 | 348 (31,2%) |
| II | PFA | nein | POD | 0,4 | 42,2 | 16,9 | 633 | 253,5 (40,0%) |
| II | PFA | ja | POD | 0,6 | 134,0 | 34,9 | 1340 | 349 (26,0%) |
| ÜN | PFA | ja | FLUOS | 6 | 12,0 | 3,7 | 12,0 | 3,7 (30,5%) |
| ÜN | PFA | ja | POD | 0,4 | 68,3 | 16,4 | 1024,5 | 246 (24,0%) |

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Quantifizierung mit der Bildverarbeitung. Angegeben sind die relativen Helligkeiten pro Zelle (korrigierte Werte sind auf die längste Belichtungszeit von 6 s extrapoliert).

Die Signalstärken nach den verschiedenen Vorbehandlungen und Hybridisierungen sind in Tabelle 3.1 zu finden. Zunächst zeigte sich, daß bei der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden bei Zellen beider Kulturen eine Verringerung der Signalstärke auftrat, wenn diese zunächst mit Lysozym vorbehandelt wurden. Nur 61 bzw. 56% der ursprünglichen Intensität wurden erreicht. Im weiteren wurde bei der Angabe der Signalverstärkung als Verhältnis von Signalintensität mit Meerrettichperoxidase-markierten und Signalintensität mit fluoreszenzmarkierten Sonden der höhere Wert zugrunde gelegt. So wurden mit TSA bei ethanolfixierten Zellen Verstärkungen um den Faktor 21 (Kultur I) bzw. 26 (Kultur II) erreicht. Bei Paraformaldehyd-fixierten Zellen waren die Signalstärken 14 bzw. 15 mal höher, nach Lysozymbehandlung dieser Zellen aber 20 und 32 mal. Neben der niedrigeren Signalintensität bei den Paraformaldehyd-fixierten, aber nicht vorbehandelten Zellen fiel auch die ungleichmäßigere Färbung auf, die sich in der erhöhten Standardabweichung widerspiegelte (CV von 36,1 bzw. 40,0%). Der subjektive Eindruck, daß Zellen, die mit Paraformaldehyd fixiert und mit Lysozym vorbehandelt worden waren, nach

TSA im Vergleich zu den ethanolfixierten und unbehandelten Zellen einheitlichere Färbungen der Zellen zeigten, konnte dagegen durch die Quantifizierungen nicht bestätigt werden. Eine im Bereich der Kulturen I und II liegende Signalstärke wurde bei Paraformaldehyd-fixierten und vorbehandelten Zellen der Übernachtskultur mit TSA erreicht, woraus sich, bedingt durch den weitaus niedrigeren Wert bei der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter Sonde, eine Verstärkung um den Faktor 86 ergab.

3.1.3.3 *Quantifizierungen mit dem Durchflußzytometer*

Quantifizierungen mit dem Durchflußzytometer boten den Vorteil, aufgrund des über mehrere Größenordnungen gehenden Dynamikbereichs dieses Gerätes, Zellen nach den verschiedenen Behandlungen, einschließlich der Negativkontrollen mit einheitlichen Voreinstellungen messen zu können. Messungen, die mit Paraformaldehyd-fixierten Zellen durchgeführt wurden, erbrachten nur eine 10fache Signalverstärkung bei vorbehandelten Zellen und TSA im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen, die mit fluoreszenzmarkierter Sonde hybridisiert wurden (Abbildung 3.6). Bei TSA lag die durchschnittliche Helligkeit bei 2575 ± 302 relativen Einheiten, wobei 22% aller untersuchten Zellen nicht vollständig gefärbt waren (Abbildung 3.6) und deshalb für die Ermittlung des Durchschnittswertes nicht herangezogen wurden. Standardmäßig hybridisierte Zellen hatten eine durchschnittliche relative Helligkeit von 264 ± 16 . Die Hybridisierung mit einer nicht bindenden Sonde (EUK516, spezifisch für Eukarya) resultierte mit TSA in einem durchschnittlichen Signal von 55 relativen Einheiten. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis war mit 47 ($2575/55$) etwas niedriger als das des Standardsystems mit 66. Wurde die Inkubation mit Fluorescein-Tyramid ohne vorherige Hybridisierung an fixierten Zellen durchgeführt, lag der Wert nur knapp über der Autofluoreszenz der gleichen Zellen (8 bzw. 4 relative Einheiten).

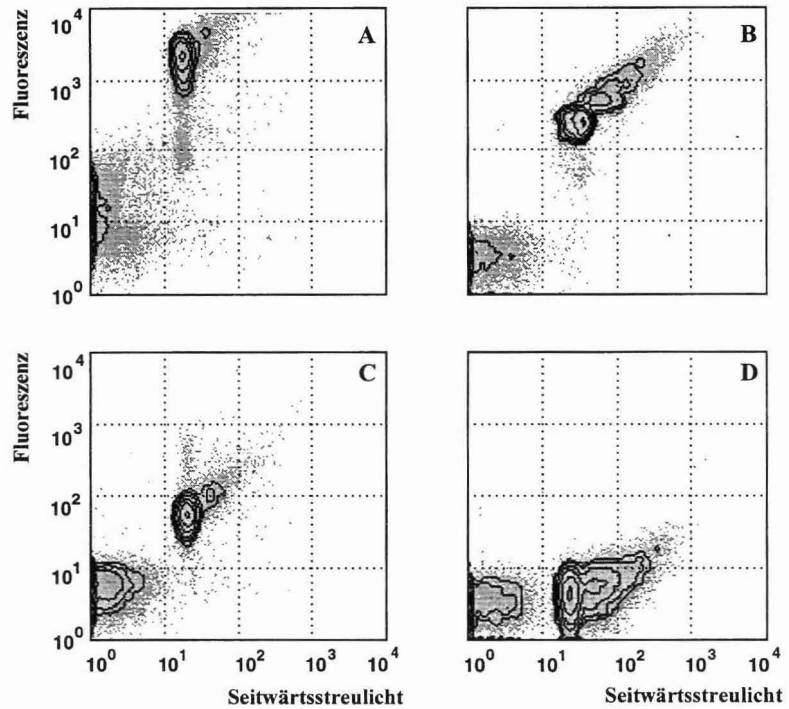


Abbildung 3.6: Verteilung von Seitwärtsstreulicht (x-Achse) und sondenvermittelter Fluoreszenz (y-Achse). Hybridisiert wurden Reinkulturen von *E. coli* mit der Sonde EUB338 (A, B) bzw. EUK516 (C, D). In A und C sind Ergebnisse mit dem TSA-System, in B und D mit fluoreszenzmarkierten Sonden dargestellt. Jeder Punkt entspricht einer analysierten Zelle. Häufigkeiten können anhand der Dichte der Punkte bzw. der überlagerten Kontourlinien (von innen nach außen 3, 6, 12, 24, 48 und 95% Häufigkeit) abgeschätzt werden. Nach Schönhuber *et al.* (1997).

3.1.3.4 Anwendbarkeit bei Umweltproben

Um neben der Anwendbarkeit bei Reinkulturen auch die in natürlichen Umweltproben zu zeigen, wurden in Ethanol fixierte Proben aus dem Belebtschlammbecken einer Kläranlage und aus einem Teich vergleichend mit der Standardmethode untersucht. Eine Abschätzung der Detektionsraten als Anteil der mit EUB338 hybridisierten Zellen an der durch DAPI-Anfärbung ermittelten Gesamtzellzahl zeigte, daß mit dem TSA-System bei weitem weniger

Zellen ansprechbar waren als mit der Standardmethode. So kam es in der Belebtschlammprobe einer Kläranlage zu einer Detektionsrate von 77% für die Standardmethode, aber nur von 37% für das TSA-System. Im Teich stand entsprechend eine Detektionsrate von 75% einer von 25% gegenüber. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis einer Doppelhybridisierung der Belebtschlammprobe mit einer Cy3- und einer Meerrettichperoxidase-markierten Sonde EUB338, die anschließend mit Fluorescein-Tyramid detektiert wurde. Der überwiegende Teil der Zellen war ausschließlich mit der direkt fluoreszenzmarkierten Sonde rot anfärbbar, die grünen bzw. gelben Zellen waren auch für die enzymmarkierte Sonde zugänglich.

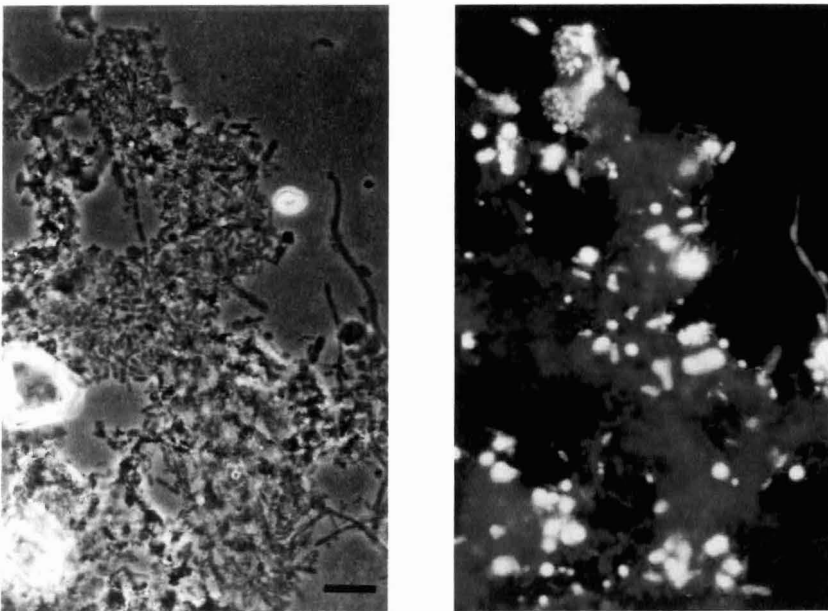


Abbildung 3.7: Doppelhybridisierung einer Belebtschlammprobe mit Meerrettichperoxidase- und Cy3-markierter Sonde EUB338. Nachweis der Meerrettichperoxidase-markierten Sonde mit TSA. Links, Phasenkontrastaufnahme, rechts, Epifluoreszenzaufnahme mit Pirel Dual Filtersatz; Vergrößerung 1.000fach, Balken 10 μm .

3.2 Ganzzellhybridisierung von Cyanobakterien

Da die Standardmethode der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden bei Cyanobakterien aufgrund ihrer Autofluoreszenz erschwert bzw. gänzlich verhindert wurde, war es notwendig, Alternativen auf ihre Anwendbarkeit bei Cyanobakterien zu untersuchen. Eine Hybridisierung mit FLUOS- oder Cy3-markierten Sonden erbrachte bei allen untersuchten Gruppen keine eindeutig positiven oder negativen Ergebnisse. Eine Einordnung war, wenn überhaupt, nur durch direkten Vergleich mit Kontrollen möglich. Vermeintliche Signale erhöhten die Fluoreszenz der hybridisierten Zellen nur unwesentlich über die Autofluoreszenz, und die Bewertung konnte nur sehr subjektiv erfolgen. Eine Dokumentation gelang nicht, denn die Unterschiede waren zu gering. Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, das Problem der Autofluoreszenz zu umgehen:

- den nichtfluoreszierenden Nachweis von Sonden,
- die Verstärkung der sondenvermittelten Fluoreszenz,
- die Erniedrigung der Autofluoreszenz und
- die Verwendung von Fluoreszenzmolekülen als Sondenmarker, deren Absorptions- bzw. Emissionsspektren sich von der Autofluoreszenz von Cyanobakterien unterscheiden.

Schwerpunktmäßig wurden in dieser Arbeit die beiden ersten Möglichkeiten auf ihre Anwendbarkeit zur *in situ*-Identifizierung von Cyanobakterien mittels 16S rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden geprüft. Die Möglichkeit des nichtfluoreszierenden Nachweises mit direkt Meerrettichperoxidase-markierten Sonden war schon von Zarda (1994) und Schönhuber (1995) an symbiontisch lebenden Cyanobakterien gezeigt worden und wurde in der vorliegenden Arbeit systematisch auf die verschiedensten Vertreter der Cyanobakterien ausgedehnt. Die zunächst unabhängig vom Nachweis der Cyanobakterien entwickelte Tyramid-Signal-Amplifikation zur Verstärkung von fluoreszierenden Signalen bei der *in situ*-Hybridisierung (siehe 3.1.3), die ja ebenfalls auf Meerrettichperoxidase-markierten Sonden basiert, war auch für Cyanobakterien im Sinne der zweiten Möglichkeit erfolgreich.

Erste Hybridisierungen an ethanolfixierten Reinkulturen mit der Sonde EUB338 zeigten, daß die Ergebnisse der Hybridisierungen von symbiontisch lebenden Cyanobakterien nicht einfach übertragbar waren. Während letztere auch ohne Vorbehandlung zu einem hohen Anteil

detektierbar waren (Zarda, 1994; Schönhuber, 1995), konnten von Reinkulturen freilebender Cyanobakterien meist nur maximal 20% der Zellen angefärbt werden. Dies war insbesondere für die, wie symbiontische Cyanobakterien, in Sektion IV gehörenden, filamentösen, Heterocysten-bildenden Spezies überraschender als z.B. für unizelluläre Spezies aus den Sektionen I und II. Bei ihnen kam es regelmäßig vor, daß nur einzelne Zellen innerhalb der Ketten angefärbt wurden. Zwei Möglichkeiten bieten sich als Erklärung: entweder waren die untersuchten Cyanobakterien nicht zugänglich für die, im Vergleich zu fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, größeren Sondenmoleküle, oder die Zahl der an die Ribosomen gebundenen Sonden reichte nicht aus, um das Detektionslimit der Methode zu erreichen.

3.2.1 Entwicklung von cyanobakterienspezifischen, 16S rRNS-gerichteten Sonden

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität bei der Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden innerhalb der Cyanobakterien wurden Sonden entwickelt, die einzelne Gruppen innerhalb dieses Phylums detektierten. Zum Austesten dieser Sonden wurden systematisch Zielorganismen, also solche, die aufgrund ihrer bekannten 16S rRNS-Sequenzen keine Fehlpaarung mit der Sonde haben sollten, mit Nichtzielorganismen verglichen, die eine oder mehrere Fehlpaarungen innerhalb dieses potentiellen Hybrids aufwiesen. Auf diese Weise war es möglich, Aussagen über die Spezifität in Abhängigkeit von Fehlpaarungen und über die *in situ*-Anwendbarkeit der einzelnen Sonden zu treffen.

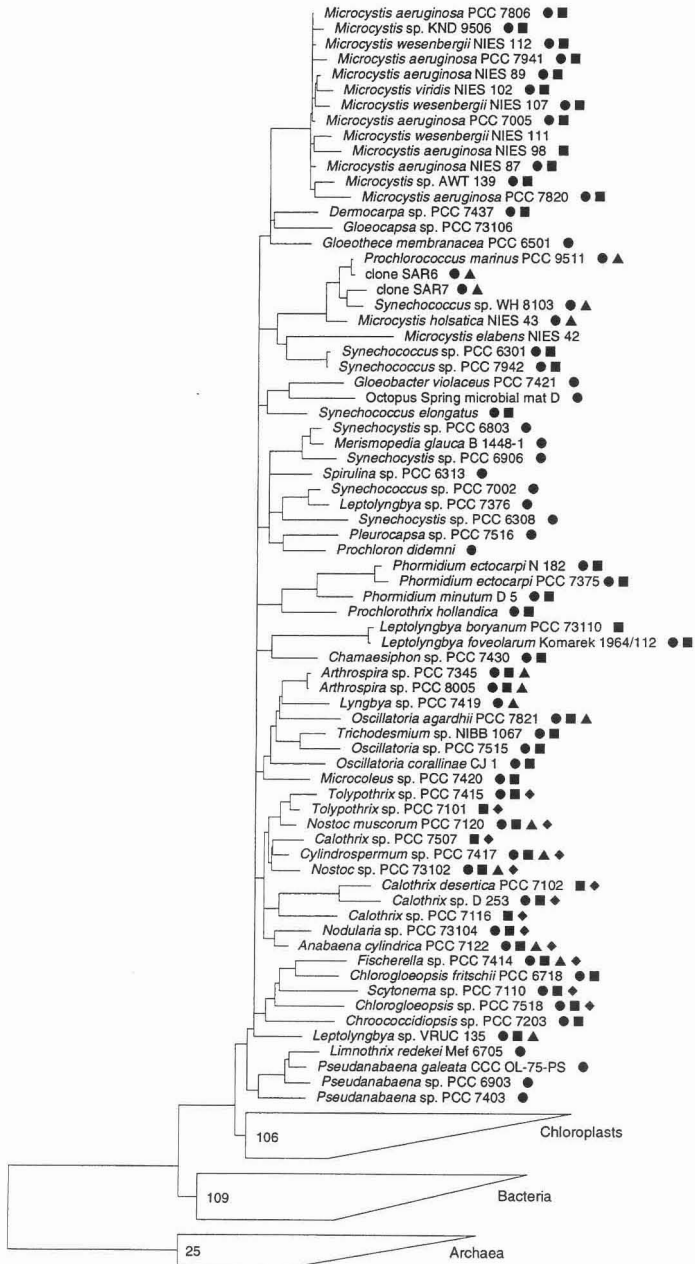
Auch wenn die Cyanobakterien nach der Analyse der 16S rRNS und anderer phylogenetisch relevanter Moleküle (23S rRNS, Elongationsfaktor Tu und beta-Untereinheit der ATPase) innerhalb der Bakterien eine Gruppe monophyletischen Ursprungs darstellen (Ludwig *et al.*, 1998), war es nicht möglich, eine phylumspezifische 16S rRNS-gerichtete Sonde zu finden, die alle Mitglieder dieser Gruppe erfaßt. Um die Möglichkeit der Ganzzellhybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden für die Gruppe der Cyanobakterien zu untersuchen, wurden zunächst Sonden entwickelt, die es erlaubten, innerhalb dieser Gruppe Zielorganismen und Nichtzielzellen mit unterschiedlicher Anzahl und Verteilung der Fehlpaarungen innerhalb des entsprechenden Sonden-16S rRNS-Hybrids zu finden.

Zwei der Sonden, CYA361 und CYA762, erfaßten jeweils einen großen Teil der Cyanobakterien. Die Sonde CYA664 wurde hinsichtlich einer *in situ* besonders gut zugänglichen Region gewählt und war komplementär zu einer kleineren Zahl an Organismen aus mehreren Entwicklungslinien innerhalb der Cyanobakterien. Allen drei Sonden gemein war

3 Ergebnisse

darüber hinaus die Spezifität für verschiedene 16S rRNS Sequenzen von Chloroplasten, die ebenfalls ohne Fehlpaarung erfaßt wurden. Eine vierte Sonde, CIV/V1342, war spezifisch für die Heterocysten-bildenden Cyanobakterien aus den Sektionen IV und V (Rippka *et al.*, 1979). In Abbildung 3.8 sind mit Symbolen diejenigen Organismen markiert, deren 16S rRNS komplementär zu den entsprechenden Sonden sind. Der zugrunde liegende, freundlicherweise von Herrn Dr. Wolfgang Ludwig zur Verfügung gestellte Baum ging als Konsensusbaum aus drei mit unterschiedlichen Verfahren rekonstruierten Bäumen hervor, für deren Berechnung Sequenzen mit mindestens 1.400 Basen verwendet wurden. In Fällen, in denen die Abfolge der einzelnen Entwicklungslinien nicht von allen drei Verfahren unterstützt wurde, wurden Äste auf einen gemeinsamen Ursprung gesetzt. Sequenzen mit weniger als 1.400 Basen wurden mit ARB Maximum Parsimony in den Baum eingerechnet, ohne die Topologie des ursprünglichen Baumes zu verändern.

Abbildung 3.8: Phylogenetischer, auf 16S rRNS-Daten basierender Baum der Cyanobakterien und Sondenspezifitäten (Schönhuber *et al.*, 1999). Sequenzen mit vollständig komplementären Zielregionen sind wie folgt markiert: ● (CYA361), ■ (CYA762), ▲ (CYA664) und ◆ (CIV/V1342). Die Namen der Organismen entsprechen denen der Datenbankeinträge und besitzen in vielen Fällen keine taxonomische Gültigkeit. Folgende Sequenzen sind nicht in der öffentlichen ARB-Datenbank vertreten: *Calothrix (Rivularia)* sp. PCC 7116, *Calothrix* sp. PCC 7507, *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, *Toxophrax* sp. PCC 7101 und *Toxophrax* sp. PCC 7415 (alle T. Coursin, *persönliche Mitteilung*), *Limnothrix redekei* MEF 6705 (A. Wilmotte, *persönliche Mitteilung*), *Pseudanabaena* sp. PCC 7403 (F. Haes, *persönliche Mitteilung*), *Microcystis wesenbergii* NIES 111 (D89034), *Microcystis aeruginosa* NIES 98 (D89032), *Microcystis aeruginosa* NIES 87 (D89031), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (D88288), *Microcystis balsatica* NIES 43 (D89036), *Synechococcus elongatus* (D83715), *Merismopedia glauca* (X94705), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (D90916), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (D88289) und *Calothrix* sp. D 253 (X99213). Der Balken entspricht einem berechneten Sequenzunterschied von 10%.



0.10

3.2.2 Membranhybridisierungen

Zunächst wurden die Sonden durch Membranhybridisierung von amplifizierter 16S rDNS ausgesuchter Referenzorganismen getestet. Die fast vollständige 16S rDNS wurde dafür spezifisch mit den Primern GM3F und GM4R aus der durch die „Freeze-Thaw“-Methode gewonnenen Gesamt-DNS der Organismen amplifiziert und auf Membranen immobilisiert. Membranhybridisierungen wurden ebenfalls mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden durchgeführt, für deren Detektion ein chemilumineszierendes Substrat verwendet wurde. Hybridisierungen bei niedriger Stringenz erbrachten bei allen aufgetragenen 16S rDNS Amplifikaten Signale mit den getesteten Sonden, bei schrittweisem Anheben der Stringenz durch Erhöhung der Formamidkonzentration wurde zunächst die Signalstärke bei den Organismen niedriger, deren 16S rDNS Sequenz eine oder mehrere Fehlpaarungen innerhalb des Hybrids verursachte. Bei genügend hoher Stringenz waren aufgrund der Destabilisierung auch eines vollständig gepaarten Hybrids keine Signale mehr zu detektieren. Für Ganzzellhybridisierungen wurden im weiteren die Formamidkonzentrationen verwendet, bei denen die Sequenzen mit Fehlpaarungen diskriminiert werden konnten, aber diejenigen ohne Fehlpaarungen noch Signale lieferten. Das waren für die Sonden CYA361 und CIV/V1342 50%, für CYA664 55% und für CYA762 65% Formamid. Tabelle 3.2 zeigt die dadurch theoretisch erreichten Hybridisierungstemperaturen im Vergleich zu den nach unterschiedlichen Verfahren berechneten Dissoziationstemperaturen der Sonden.

| Sonde | Länge | mol% G+C | T _d ¹ | T _D ² | T bei der Hybridisierung ³ |
|-----------|-------|----------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| CYA361 | 18 | 50 | 52,1 | 55,7 | 60 |
| CYA664 | 17 | 65 | 54,1 | 59,2 | 62,5 |
| CYA762 | 19 | 63 | 60,1 | 63,4 | 67,5 |
| CIV/V1342 | 18 | 50 | 52,1 | 55,7 | 60 |

Tabelle 3.2: Vergleich der errechneten Schmelzpunkte der cyanobakterienspezifischen Sonden mit der theoretisch bei der Hybridisierung verwendeten Temperatur.

¹ Schmelztemperatur nach Suggs *et al.* (1981), bezogen auf eine Konzentration monovalenter Kationen von 0,9 M: $T_d = 4(\Sigma G+C) + 2(\Sigma A+T) - 1,9$

² Schmelztemperatur nach Thomas und Dancis (1973) und Lathe (1985): $T_D = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 [\% (G+C)] - 820/n$ mit $M = 0,9$ M; n Anzahl der Nukleotide

³ Theoretische Hybridisierungstemperatur unter der Annahme, daß die Zugabe von 1% Formamid in den Hybridisierungspuffer einer Temperaturerhöhung von 0,5°C entspricht

Wie die in Abbildung 3.9 dargestellten Ergebnisse zeigen, war mit der Sonde CYA762 die Diskriminierung der randständigen CA-Fehlpaarung bei *Gloeothece* sp. PCC 6501 nicht möglich, auch wenn die Signalstärke im Vergleich zu niedrigerer Stringenz bereits deutlich abnahm. Bei allen anderen getesteten, nicht vollständig komplementären 16S rDNS Sequenzen waren einzelne interne Fehlpaarungen ausreichend, um eine Hybridbildung zu verhindern.

Abbildung 3.9: Differentielles Alignment der Referenzstämme, Sonden- und Zielsequenzen, Sondenpositionen und Ergebnisse der Hybridisierungen von membrangebundenen Nukleinsäuren und ganzen Zellen. Sondenpositionen sind entsprechend der *E. coli*-Numerierung nach Brosius *et al.*, 1981 angegeben. Punkte im Alignment zeigen die Übereinstimmung mit der Zielsequenz an dieser Position. Basenunterschiede sind an den entsprechenden Stellen angegeben. N steht für eine unbekannte Base. Bei den Hybridisierungsergebnissen steht + für positiv, - für negativ und (+) für positiv, aber schwächeres Signal als bei der Hybridisierung mit der Sonde EUB338 unter gleichen Bedingungen.

3 Ergebnisse

| Sonde CYA762 | 3' -CTGCTTTCGATCCCCTCGC-5' | Hybridisierungsergebnisse | | | |
|---------------------------|----------------------------|--|----------------------------|---------------------|--------|
| | | Zielregion (<i>E. coli</i> -Position 762-780) | 5' -GACGAAAGCUAGGGGAGCG-3' | Membran | Zellen |
| | | | | nichtfluoreszierend | TSA |
| <i>Anabaena</i> sp. | PCC 7122 | | | + | |
| <i>Arthrospira</i> sp. | PCC 7345 | | + | + | |
| <i>Calothrix</i> sp. | PCC 7102 | | + | + | |
| <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 | | | + | |
| <i>CyandrospERMUM</i> sp. | PCC 7417 | | + | + | |
| <i>Fischerella</i> sp. | PCC 7414 | | | + | |
| <i>Microcoleis</i> sp. | PCC 7420 | | | + | |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7806 | | | - | |
| <i>Nodularia</i> sp. | PCC 73104 | | | + | |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 7120 | | | + | |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 73102 | | + | + | |
| <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7515 | | | + | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6301 | | + | - | |
| <i>Toxoptrix</i> sp. | PCC 7101 | | + | + | |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 6501 |a | (+) | + | |
| <i>Pseudanabaena</i> sp. | PCC 6903 | u..NN..... | | + | |
| <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6803 |u..... | | - | |
| <i>Spirulina</i> sp. | PCC 6313 |u..... | - | - | |
| <i>Pleurocapsa</i> sp. | PCC 7516 |u..... | - | - | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | WH 8103 |C..... | | - | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 |a..u..... | | - | |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. | PCC 7376 |C.a..... | | - | |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 7421 | u.....c.....a | - | - | |

| Sonde CYA664 | 3' -CCCCGTCCTCCCTTAAGG-5' | Hybridisierungsergebnisse | | | |
|---------------------------|---------------------------|--|-------------------------|---------------------|--------|
| | | Zielregion (<i>E. coli</i> -Position 664-680) | 5' -GGGGCAGAGGGAAUUC-3' | Membran | Zellen |
| | | | | nichtfluoreszierend | TSA |
| <i>Anabaena</i> sp. | PCC 7122 | | | + | |
| <i>Arthrospira</i> sp. | PCC 7345 | | + | + | |
| <i>CyandrospERMUM</i> sp. | PCC 7417 | | + | + | |
| <i>Fischerella</i> sp. | PCC 7414 | | | + | |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 7120 | | | + | |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 73102 | | + | + | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | WH 8103 | | | + | |
| <i>Toxoptrix</i> sp. | PCC 7101 |NN..... | + | + | |
| <i>Calothrix</i> sp. | PCC 7102 |u..... | - | - | |
| <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 |u..... | | - | |
| <i>Microcoleis</i> sp. | PCC 7420 |u..... | | - | |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. | PCC 7376 |u..... | | + | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 |u..... | | + | |
| <i>Nodularia</i> sp. | PCC 73104 |uN..... | | - | |
| <i>Pleurocapsa</i> sp. | PCC 7516 |uu..... | - | - | |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 7421 |ag..... | - | - | |
| <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7515 |ca..... | | - | |
| <i>Spirulina</i> sp. | PCC 6313 |u.g..... | - | - | |
| <i>Pseudanabaena</i> sp. | PCC 6903 |N.ga..... | | - | |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 6501 |u.u..... | - | - | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6301 |u.c..... | - | - | |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7806 |u.ca..... | | - | |
| <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6803 |u.ca..... | | - | |

3 Ergebnisse

| Sonde CYA361 | 3' - CCTTAAAGGGCTTACCC - 5' | Hybridisierungsergebnisse | | |
|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------|-----|
| | | Membran | Zellen | |
| | | | nichtfluoreszierend | TSA |
| Zielregion (<i>E. coli</i> -Position 361-378) | 5' - GGAAUUUCCGCAUUGGG - 3' | | | |
| <i>Anabaena</i> sp. | PCC 7122 | | (+) | |
| <i>Calothrix</i> sp. | PCC 7102 | | + | (+) |
| <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 | | | (+) |
| <i>Cylindrocapsa</i> sp. | PCC 7417 | | + | (+) |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 7421 | | + | (+) |
| <i>Microcoleus</i> sp. | PCC 7420 | | | (+) |
| <i>Nodularia</i> sp. | PCC 73104 | | | (+) |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 7120 | | | (+) |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 73102 | | + | (+) |
| <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7515 | | | (+) |
| <i>Spirulina</i> sp. | PCC 6313 | | + | (+) |
| <i>Tolypothrix</i> sp. | PCC 7101 |NN | + | (+) |
| <i>Arthrospira</i> sp. | PCC 7345 | | + | |
| <i>Fischerella</i> sp. | PCC 7414 | | | - |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7806 | | | (+) |
| <i>Gloeotheca</i> sp. | PCC 6501 | | + | - |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. | PCC 7376 | | | - |
| <i>Pleurocapsa</i> sp. | PCC 7516 | | + | - |
| <i>Pseudanabaena</i> sp. | PCC 6903 | | | - |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6301 | | + | - |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 | | | - |
| <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6803 |N | | - |

| Sonde CIV / V1342 | 3' - GCGATCATTACGTCCAG - 5' | Hybridisierungsergebnisse | | |
|---|------------------------------|---------------------------|---------------------|-----|
| | | Membran | Zellen | |
| | | | nichtfluoreszierend | TSA |
| Zielregion (<i>E. coli</i> -Position 1342-1359) | 5' - CGCUAGUAAUUGCAGGUC - 3' | | | |
| <i>Anabaena</i> sp. | PCC 7122 | | + | |
| <i>Calothrix</i> sp. | PCC 7102 | | + | + |
| <i>Cylindrocapsa</i> sp. | PCC 7417 | | + | + |
| <i>Nodularia</i> sp. | PCC 73104 | | | + |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 7120 | | | + |
| <i>Nostoc</i> sp. | PCC 73102 | | + | + |
| <i>Tolypothrix</i> sp. | PCC 7101 | | + | + |
| <i>Fischerella</i> sp. | PCC 7414 |N | | + |
| <i>Arthrospira</i> sp. | PCC 7345 |C | - | - |
| <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 |C | | - |
| <i>Gloeobacter</i> sp. | PCC 7421 |C | - | - |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. | PCC 7376 |C | | (+) |
| <i>Microcoleus</i> sp. | PCC 7420 |C | | - |
| <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7515 |C | | - |
| <i>Pleurocapsa</i> sp. | PCC 7516 |C | - | - |
| <i>Pseudanabaena</i> sp. | PCC 6903 |C | | - |
| <i>Spirulina</i> sp. | PCC 6313 |C | - | - |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 |C | | - |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6301 |C | - | - |
| <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6803 |C | | (+) |
| <i>Microcystis</i> sp. | PCC 7806 |C | | - |
| <i>Gloeotheca</i> sp. | PCC 6501 |C | - | - |

3.2.3 Ganzzellhybridisierungen

3.2.3.1 Nichtfluoreszierender Nachweis

Die bei den Membranhybridisierungen ermittelten Formamidkonzentrationen wurden als Grundlage für das Austesten der Sonden zur Ganzzellhybridisierung verwendet. Bei jedem untersuchten Stamm wurde zunächst mit der Sonde EUB338 untersucht, ob die Permeabilität der Zellen für die relativ großen Sondenmoleküle gegeben war. Zugänglichkeitsprobleme der Zielregion innerhalb der ribosomalen RNS sollten für diese Sonde nicht auftreten, die bei anderen Bakterien durchweg gute Signale bei *in situ*-Hybridisierungen lieferte. Bis auf wenige Ausnahmen konnten ethanolfixierte Cyanobakterien mit der Meerrettichperoxidase-markierten Sonde und TETON oder DAB als Substrat nachgewiesen werden. Allerdings war die Färbung von Zelle zu Zelle selbst innerhalb einer Kultur nicht einheitlich und oft wurden auch nicht alle Zellen erfaßt. Bei filamentösen Stämmen traten selbst innerhalb eines Filaments unterschiedliche Färbungen auf. Eine Vorbehandlung mit Lysozym konnte den Anteil nachweisbarer Zellen zwar erhöhen, jedoch war nie eine 100%ige Detektion zu erreichen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit den beiden nichtfluoreszierenden Substraten über die gewöhnlich veranschlagten 5-10 Minuten hinaus, zeigte keinen positiven Effekt. Auch andere Vorbehandlungsmaßnahmen, beispielsweise die Verwendung von Proteinase K oder eines Gemisches von SDS und Dithiotreitol bzw. von Essigsäureanhydrid und Wasserstoffperoxid, hatten entweder keine Wirkung oder führten zu einer schwer kontrollierbaren Lyse der Zellen. Einige Referenzorganismen konnten mit dieser Methodik in den vorliegenden fixierten Kulturen nicht gefärbt werden: *Leptolyngbya* sp. PCC 7376, *Microcystis* sp. PCC 7806, *Pleurocapsa* sp. PCC 7516, *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, *Synechococcus* sp. PCC 6301, *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *Synechocystis* sp. PCC 6803. Aufgrund der unterschiedlichen Detektionsraten innerhalb der einzelnen Kulturen wurden die Ergebnisse mit den cyanobakterienspezifischen Sonden meist im Vergleich zu der Positivkontrolle mit der Sonde EUB338 bewertet.

3.2.3.2 Nachweis über Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA)

Die sensitivere TSA-Methode wurde angewandt, um aufzuklären, ob die mangelhafte Detektion einzelner Stämme an der zu geringen Sensitivität der nichtfluoreszierenden Substrate lag. Tatsächlich zeigten mit TSA auch diejenigen Organismen, die mit nichtfluoreszierenden Substraten nicht nachzuweisen waren, deutliche Signale. Die ursprünglich als Problem für den Nachweis mit direkt fluoreszenzmarkierten Sonden angesehene Autofluoreszenz spielte bei dieser Methode keine Rolle, da die durch die Sonde vermittelte spezifische Fluoreszenz weitaus stärker war und völlig ausreichte, die Autofluoreszenz zu überstrahlen. Bilder, die mit gleicher

Belichtungszeit aufgenommen worden waren, ließen nur die sondenvermittelte Fluoreszenz der Zielzellen erkennen, die Autofluoreszenz von nicht hybridisierten Zellen war bei den für die Sondendetektion ausreichenden Zeiten nicht zu erkennen. Getestet wurden drei verschieden markierte Tyramide (Fluorescein-, Tetramethylrhodamin- und Cy3-Tyramid), wobei sich das Fluorescein-Tyramid als am geeignetsten erwies. Obwohl auch bei Cy3-Tyramid der Helligkeitsunterschied zwischen Autofluoreszenz und Sondersignal ähnlich hoch war, war bei der Fluorescein-Variante außerdem der farbliche Unterschied signifikant: bei blauer Anregung war die Autofluoreszenz allein gelblich-grün, während das Fluoresceinsignal eindeutig im grünen Spektralbereich lag. Bei den beiden Farbstoffen im orange-roten Spektrum war eine Diskriminierung nur über die Intensität – bei Cy3 besser als bei Tetramethylrhodamin – möglich. Allerdings konnten Cy3- und Fluorescein-Tyramid nicht ohne weiteres nebeneinander verwendet werden, ein starkes Cy3-Signal war auch mit dem für Fluorescein spezifischen Filtersatz zu detektieren. Umgekehrt war auch ein hohes Fluoresceinsignal durch den für Cy3 oder Rhodamin spezifischen Filtersatz nicht vollständig zu diskriminieren, so daß bei gleichzeitiger Verwendung zweier Farbstoffe eine Bewertung der Hybridisierungsergebnisse sehr vorsichtig und unter Zuhilfenahme der entsprechenden Kontrollexperimente zu erfolgen hatte. Daß nichtsdestotrotz die Verwendung zweier unterschiedlich markierter Tyramide in zwei aufeinanderfolgenden Hybridisierungen ein und derselben Probe zur klaren Unterscheidung zweier Populationen möglich war, zeigt die Abbildung 3.10B. Die Detektion der nach der ersten Hybridisierung gebundenen Sonde erfolgte mit Fluorescein-Tyramid, bevor eine zweite Hybridisierung durchgeführt und deren Ergebnis mit Hilfe von Tetramethylrhodamin-Tyramid visualisiert wurde. Weniger leicht gelang die Unterscheidung, wenn die beiden Tyramide in der anderen Reihenfolge, also zunächst Tetramethylrhodamin- und dann Fluorescein-Tyramid, eingesetzt wurden. Aus oben genannten Gründen wurde eine Kombination aus Fluorescein- und Cy3-Tyramid nicht getestet. Für die Bestimmung der Spezifitäten der für Cyanobakterien entwickelten Sonden wurde anschließend ausschließlich Fluorescein-Tyramid verwendet.

3.2.3.3 Austesten der Spezifität der Sonden

Die Überprüfung der theoretischen SONDENSPEZIFITÄT an Referenzorganismen erfolgte nichtfluoreszierend mit TETON und, wo dies aufgrund der mangelnden Sensitivität nicht möglich war, mit Fluorescein-Tyramid. Die theoretische Spezifität wurde bei den meisten Organismen durch die Ergebnisse der Hybridisierungen bestätigt (siehe Abbildung 3.9). Nur bei einer einzelnen, randständigen Fehlpaarung, wie sie z.B. bei *Gloeothece* sp. PCC 6501 mit der

Sonde CYA762 auftrat, war, wie schon bei der Membranhybridisierung, eine Diskriminierung weder beim fluoreszierenden noch beim nichtfluoreszierenden Nachweis möglich. Allerdings konnten auch einzelne, interne Fehlpaarungen mit der sensitiveren, fluoreszierenden Methode nicht immer diskriminiert werden. Allerdings nahm die Signalstärke bei einer nicht vollständig komplementären Zielregion deutlich gegenüber derjenigen ab, die ein gänzlich gepaartes Hybrid erreichte. Die Sonde EUB338 diente in solchen Fällen als Vergleich. In der Abbildung 3.10A ist ein Beispiel für die Spezifität der Sonde CIV/V1342 gegeben: während die filamentösen Zellen von *Nodularia* sp. PCC 73104 die Sonde bei der Hybridisierung gebunden hatten und mit Ausnahme der Heterocysten mit Fluorescein-Tyramid angefärbt worden waren, blieben Zellen von *Spirulina* sp. PCC 6313, die sich durch ein C anstelle eines Us inmitten der Sondenbindungsregion unterschieden, ungefärbt. Abbildung 3.10B zeigt die Spezifität der Sonden CYA664 und CYA762. Eine Mischung aus Zellen von *Synechococcus* sp. WH 8103 und *Synechococcus* sp. PCC 6301 wurde nacheinander mit den beiden Sonden hybridisiert. Die nach der ersten Hybridisierung mit der Sonde CYA664 von *Synechococcus* sp. WH 8103 gebundenen Sondenmoleküle wurden mit Fluorescein-Tyramid nachgewiesen, die nach der weiteren Hybridisierung von *Synechococcus* sp. PCC 6301 gebundene Sonde CYA762 mit Tetramethylrhodamin-Tyramid. Eindeutig waren anschließend die kleineren, kokkoiden Zellen von *Synechococcus* sp. WH 8103 in grün von den größeren, stäbchenförmigen Zellen von *Synechococcus* sp. PCC 6301 in rot zu unterscheiden.

Für die Sonde CYA361 konnten sowohl mit dem nichtfluoreszierenden Substrat als auch mit TSA keine zufriedenstellenden Hybridisierungsergebnisse erhalten werden. Die mit TETON erreichten Signale waren sehr schwach und nur im direkten Vergleich mit Negativ- und Positivkontrollen zu interpretieren. Referenzzellen, bei denen erfolgreiche Hybridisierungen mit anderen Sonden nur durch den Nachweis mit TSA zu detektieren waren, zeigten selbst mit dieser Methode kein Signal nach Hybridisierung mit der Sonde CYA361.

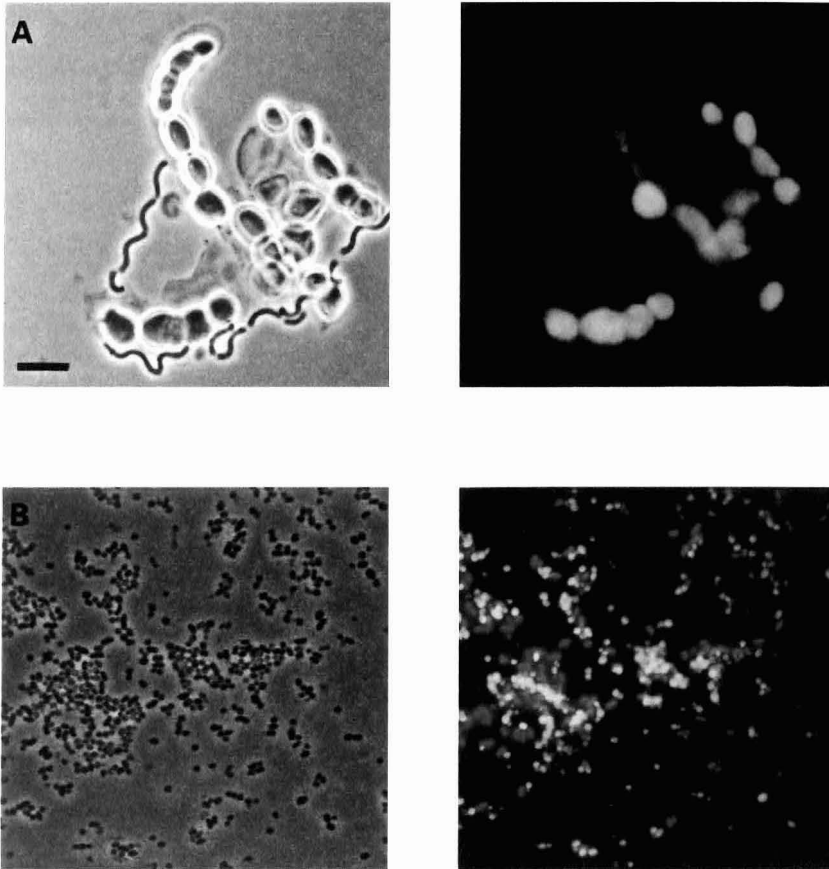


Abbildung 3.10: Beispiele für Hybridisierungen mit cyanobaktérienspezifischen Sonden. A, Mischung aus Zellen von *Nodularia* sp. PCC 73104 und *Spirulina* sp. PCC 6313. Hybridisierung mit der Meerrettichperoxidase-markierten Sonde CIV/V1342 und Nachweis mit Fluorescein-Tyramid. Links, Phasenkontrastaufnahme; rechts Epifluoreszenzaufnahme mit dem Filtersatz 09. B, sukzessive Doppelhybridisierung einer Mischung aus Zellen von *Synechococcus* sp. PCC 6301 und *Synechococcus* sp. WH 8103 mit den Meerrettichperoxidase-markierten Sonden CYA664 und CYA762. Nachweis nach der ersten Hybridisierung mit Fluorescein-Tyramid, nach der zweiten mit Tetramethylrhodamin-Tyramid. Links, Phasenkontrastaufnahme; rechts Epifluoreszenzaufnahme, Doppelbelichtung mit den Filtersätzen 09 und 15. A und B, Vergrößerung 1.000fach; Balken 10 µm.

3.2.4 Nachweis von *Prochlorococcus marinus*

Wie in der Einleitung ausgeführt, unterscheidet man bei *Prochlorococcus* sp. verschiedene „Ökotypen“, die sich in ihrer 16S rRNS-Sequenz unterscheiden, aber gemeinsam an einem Standort im Ozean vorkommen (Moore *et al.*, 1998; Abbildung 3.11B). Ein Tiefenprofil dieser Hoch- und Niedriglicht-adaptierten Typen kann bisher nur indirekt über die Bestimmung des Autofluoreszenzsignals erstellt werden (Campbell und Vaultot, 1993; Moore *et al.*, 1998), wobei insbesondere in den Schichten, wo beide Typen gleichzeitig auftreten, eine solche phänotypische Charakterisierung fraglich erschien. Ziel war es, Möglichkeiten aufzuzeigen, die beiden Typen durch *in situ*-Hybridisierung zu unterscheiden.

Für *Prochlorococcus* spp. war eine verhältnismäßig schwache Autofluoreszenz beschrieben worden. Trotzdem erwies sich leider die Annahme, diese Zellen mit direkt Cy3- und fluoresceinmarkierten Sonden spezifisch detektieren zu können, nach ersten Hybridisierungen als falsch. Bei den verwendeten Laborkulturen von *Prochlorococcus marinus* PCC 9511 und *Prochlorococcus* sp. SS120 war mit verschiedenen direktmarkierten Sonden (einschließlich EUB338 und NON338 [Snaird *et al.*, 1997] als Kontrollen) keine eindeutige Diskriminierung von theoretisch positiven und negativen Resultaten zu erhalten. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Lysozym erbrachte ebenfalls keine Erhöhung der Signalstärke, auch wenn längere Inkubationszeiten durch Lyse von Zellen zeigten, daß die verwendeten *Prochlorococcus*-Stämme durchaus sensitiv für Lysozym waren. Alternativ durchgeführte Vorbehandlungen mit Dithiothreitol/SDS führten ebenfalls zur Lyse eines Großteils der Zellen.

Um Probleme mit der Autofluoreszenz zu umgehen, wurden Hybridisierungen im weiteren mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden durchgeführt. Aber auch der Versuch, gebundene Sonden mit Hilfe von TETON nichtfluoreszierend nachzuweisen, scheiterte für ethanolfixierte und mit Lysozym vorbehandelte Zellen. Erst die Detektion der gebundenen Sondenmoleküle durch TSA mit Fluorescein-Tyramid als Substrat erbrachte die eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit positiver und negativer Hybridisierungsergebnisse. Die erhaltenen positiven Signale lagen auch bei den beiden untersuchten *Prochlorococcus* spp. weit über der Autofluoreszenz.

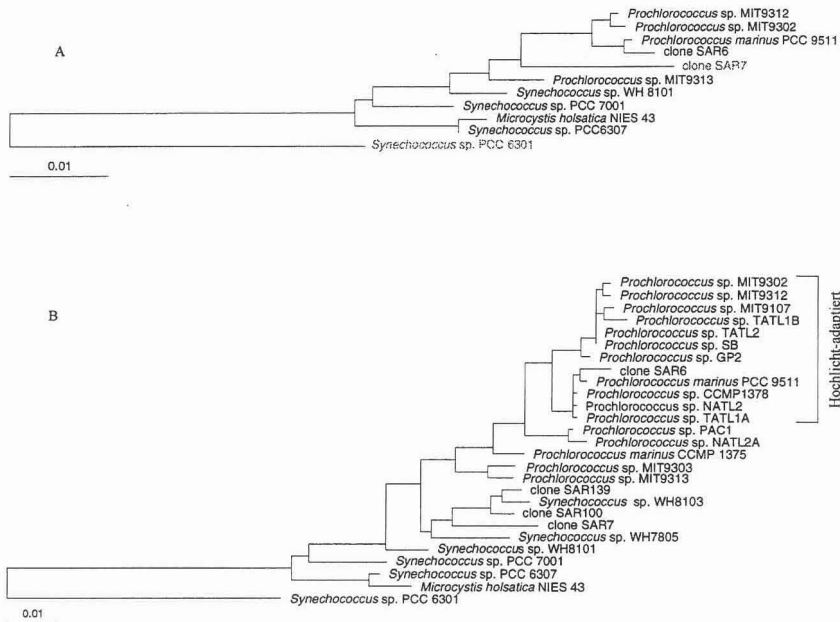


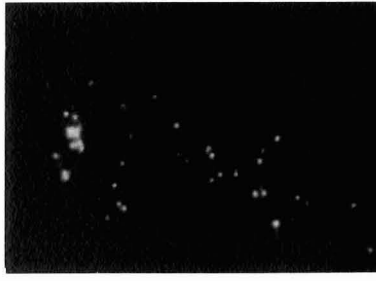
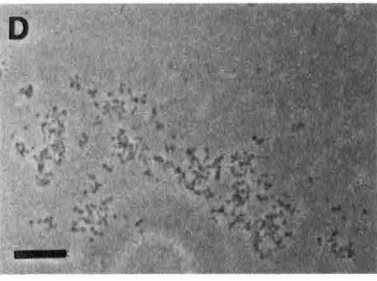
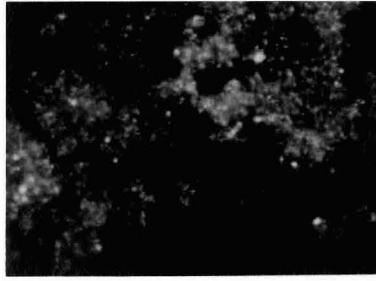
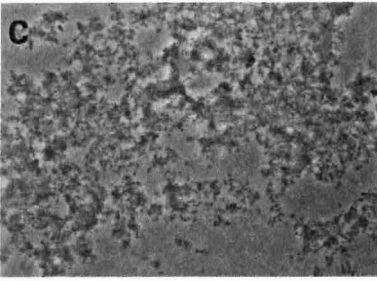
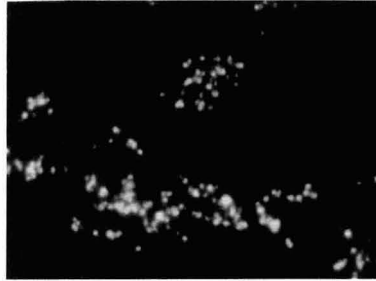
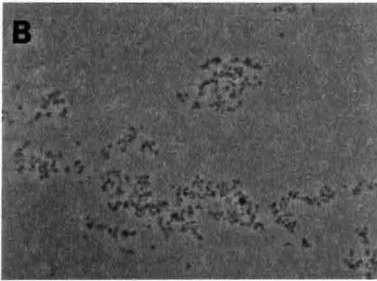
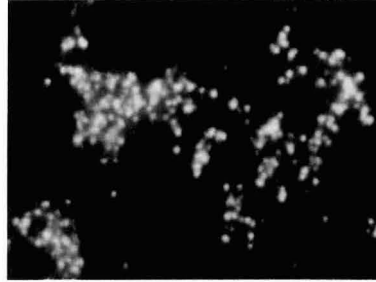
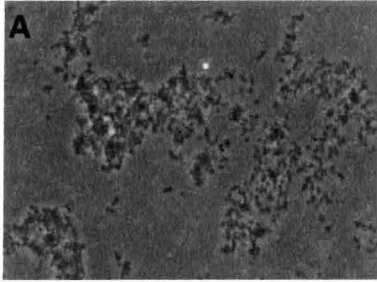
Abbildung 3.11: Ausschnitt eines auf 16S rRNS-Sequenzen basierenden Baumes mit der Entwicklungslinie der *Prochlorococcus* spp., mariner *Synechococcus* spp. und von als Klonsequenzen vorliegenden Proben aus der Sargassosee. Beide Bäume sind Teilbäume eines größeren, mit Hilfe des Maximum Likelihood-Ansatzes berechneten Baumes. Weitere Cyanobakterien- und Chloroplastensequenzen dienten bei der Rekonstruktion als „outgroup“. Nur Basen, die in mindestens 50% aller Cyanobakterien mit mindestens 1.400 sequenzierten Basen identisch waren, wurden berücksichtigt. A zeigt nur solche Organismen, die an der für die Bindung der Sonde PS1439 entscheidenden Stelle (1439-1456 im *E. coli*-Numerierungssystem nach Brosius *et al.*, 1981) sequenziert worden sind. Sequenzen, die an der entsprechenden Position nicht vollständig komplementär zur Sondensequenz sind, sind in grau dargestellt. B zeigt alle Sequenzen, die in diese Linie fallen. Solche mit einer Länge von weniger als 1.400 Basen wurden mit Maximum Parsimony in den Maximum Likelihood-Baum eingerechnet. „Hochlicht-adaptiert“ bezeichnet die Stämme, die von Urbach *et al.* (1998) und Moore *et al.* (1998) in der sogenannten Hochlicht-adaptierten Abstammungslinie von *Prochlorococcus* spp. zusammengefaßt wurden. Zusätzlich zu diesen bereits veröffentlichten Sequenzen wurde bei Rekonstruktion des Baumes die Sequenz von *Prochlorococcus* sp. PCC 9511 (T. Coursin, *persönliche Mitteilung*) eingerechnet. *Prochlorococcus* sp. PCC 9511 gehört danach ebenfalls zur Gruppe der Hochlicht-adaptierten *Prochlorococcus*-Stämme.

Mit den weiter oben beschriebenen, für Cyanobakterien spezifischen Sonden durchgeführte Hybridisierungen zeigten auch hier die theoretisch vorhergesagten Spezifitäten. So waren mit beiden *Prochlorococcus*-Stämmen Hybridisierungen mit der Sonde CYA664, zu der der

entsprechende Bereich der 16S rRNS vollständig komplementär ist, positiv (Abbildung 3.13), während die Sonde CYA762 bei der Hybridbildung eine zentrale Fehlpaarung eingehen müßte und entsprechend diskriminiert werden konnte.

Unterschiedliche Ergebnisse wurden mit den beiden *Prochlorococcus*-Stämmen nach einer Hybridisierung mit der experimentell noch nicht näher charakterisierten Sonde PS1439 (Abbildung 3.13) erzielt. Theoretisch erfaßt diese Sonde, mit einer Ausnahme, vollständig den Ast mit den *Prochlorococcus* spp., den marinen *Synechococcus* spp. und Sequenzen, die aus Umweltproben erhalten worden waren (Abbildung 3.11A). Diese Ausnahme bildet der Klon SAR7, der an mindestens drei Positionen Unterschiede aufweist. Außerhalb dieses Astes liegende Organismen haben mindestens einen Unterschied in der Zielregion (*Synechococcus* sp. PCC 7335 und *Cylindrospermum* sp. PCC 7417), alle anderen mindestens zwei, so daß theoretisch eine spezifische Erfassung dieser phylogenetischen Linie möglich sein sollte. Einschränkend muß aber gesagt werden, daß der überwiegende Teil der Sequenzen, die ebenfalls in diese Entwicklungslinie des Baumes fallen (Abbildung 3.11B), im Bereich der Sondenbindungsstelle keine Information liefern. Bekannt ist dieser Bereich bei *Prochlorococcus marinus* PCC 9511: Er ist vollständig komplementär zur Sondensequenz (Abbildung 3.13), und entsprechend wurden auch positive Hybridisierungssignale erhalten (Abbildung 3.12). Nicht sequenziert in diesem Bereich ist dagegen *Prochlorococcus* sp. SS120. Mit der Sonde PS1439 ergab sich ein anderes Bild als beim Stamm PCC 9511. Nur ein Teil der Zellen aus der Kultur SS120 wurde gefärbt (Abbildung 3.12).

Abbildung 3.12: Hybridisierungen von Zellen von *Prochlorococcus* spp. mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden und Nachweis mit Fluorescein-Tyramid. A und B, *Prochlorococcus* sp. PCC 9511; C und D, *Prochlorococcus* sp. SS120. A und C, Hybridisierung mit der Sonde CYA664. B und D, Hybridisierung mit der Sonde PS1439. Links, Phasenkontrastaufnahmen; rechts Epifluoreszenzaufnahmen mit dem Filtersatz 09; Vergrößerung 1.000fach; Balken 10 µm.



3 Ergebnisse

| | | |
|---|-----------------|----------------------------------|
| Sonde PS1439 | | 3' -AATGAGGTTGGGAACACC-5' |
| Zielregion (<i>E. coli</i> -Position 1439-1456) | | 5' -UUACUCCAACCCUUGUGG-3' |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> | PCC 9511 | |
| <i>Prochlorococcus</i> sp. | MIT 9302 | |
| <i>Prochlorococcus</i> sp. | MIT 9313 | |
| <i>Prochlorococcus</i> sp. | MIT 9312 | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | WH 8103 | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7001 | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6307 | |
| <i>Microcystis holsatica</i> | NIES 43 | |
| SAR6 | | |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7335 | ...c..... |
| <i>Cylindrospermum</i> sp. | PCC 7421 | ...c.....N. |
| <i>Chondrus crispus</i> | Chloroplast von |u..a... |
| <i>Micromonospora</i> spp. | versch. Spezies | g.ggc..... |
| SAR7 | |N.....c.g.a. |
| <i>Saccharomonospora viridis</i> | | a...g..gg...N..N. |

Abbildung 3.13: Differentielles Alignment der Sonde PS1439, Sonden- und Zielsequenz und Position (nach Brosius *et al.*, 1981). Punkte geben die Übereinstimmung mit der Zielregion wieder, Basen entsprechend die Abweichungen. Für Organismengruppen mit mehr als einer Fehlpaarung sind nur Beispiele angegeben.

3.3 Sequenzierung der 16S rRNS von Cyanobakterien und vergleichende Sequenzanalyse

Von fünf, in der Tabelle 3.3 aufgeführten Cyanobakterien wurde die beinahe vollständige 16S rRNS-Primärstruktur bestimmt und vergleichend untersucht.

| Organismus | Stamm- nummer | Sektion | Eigenschaften | Referenz |
|--------------------------|------------------|---------|--|---|
| <i>Chroococcus</i> sp. | PCC 9340 | I | beweglich; keine Gasvakuolen; C-PE negativ | Rippka und Herdman, 1992 |
| <i>Crinalium</i> sp. | PCC 9333 | III | keine Gasvakuolen | Rippka und Herdman, 1992 |
| <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7112 | III | 7-8 µm; beweglich; keine Gasvakuolen; C-PE; PEC negativ; CCA Gruppe I; obligat autotroph; N ₂ -Fixierung negativ; G+C 49,5% | Rippka <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7001 | I | 0,8 µm; unbeweglich; keine Gasvakuolen; C-PE negativ; PEC negativ; obligat autotroph; N ₂ -Fixierung negativ; euryhalin; resistent gegen Phagen AS-1M; G+C 69,5%; Genomgröße 2,01 Gdal (3,2 Mb) | Van Baalen, 1962; Stanier <i>et al.</i> , 1971; Rippka <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7335 | I | 1,4-1,5 µm; unbeweglich; keine Gasvakuolen; C-PE; PEC negativ; CCA Gruppe III; obligat autotroph; anaerobe N ₂ -Fixierung; marin; G+C 47,4%; Genomgröße 3,11 Gdal (4,9 Mb) | Rippka <i>et al.</i> , 1979 |

Tabelle 3.3: Cyanobakterien, von denen die 16S rRNS-Sequenz bestimmt wurde. C-PE, Phycoerythrobilin; PEC, Phycoerythrocyanin; CCA, „complementary chromatic adaptation“ (Tandeau de Marsac, 1977); G+C, G+C Gehalt der DNS. Nach Rippka und Herdman, 1992.

Die nach fünfmaligem Einfrieren und Auftauen der suspendierten Zellen erhaltenen Überstände wurden für eine PCR-Reaktion mit den 16S rRNS-spezifischen Primern GM3 F und GM4 R eingesetzt. Die aufgereinigten Amplifikate wurden nach dem „Cycle Sequencing“-Verfahren mit den oben genannten und zusätzlich drei internen Primern sequenziert. Die jeweils fünf Teilsequenzen waren ausreichend, um beinahe jeden Bereich der 16S rDNS in beiden Strängen vorliegen zu haben (bis auf den Abschnitt etwa ab Base 500 bis Base 550 der

E. coli-Numerierung nach Brosius *et al.* (1981) und das 3'-Ende etwa ab Base 1470). Teilweise überlappten auch die Teilsequenzen eines Strangs. Unstimmigkeiten in einem Strang konnten so im Vergleich mit dem Gegenstrang bzw. einer anderen Teilsequenz des gleichen Stranges und der Überprüfung der sich daraus ergebenden Sekundärstruktur ausgeräumt werden. Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

3.3.1 *Synechococcus* sp. PCC 7001

Von diesem Organismus wurden 1447 Basen der 16S rRNS, entsprechend *E. coli*-Positionen 7-1508, bestimmt. Die vergleichende Anordnung mit anderen Sequenzen im Alignment zeigte, daß die gegenüber *E. coli* „fehlenden“ Basen nicht auf einen nicht sequenzierten Bereich zurückgehen, sondern vielmehr auf einzelne Deletionen gegenüber der *E. coli* 16S rRNS-Sequenz, wie sie auch bei anderen Cyanobakterien vorkommen. Ähnlichkeiten von 97% oder mehr zeigte die Sequenz von *Synechococcus* sp. PCC 7001 mit denen von *Synechococcus* sp. PCC 6307 (97,5%), *Synechococcus* sp. WH 8101 (97,2%) und *Microcystis holsatica* NIES 43 (97,0%). Als nächste Gruppe folgten *Prochlorococcus marinus*-Stämme mit Ähnlichkeiten zwischen 96,0 und 96,4%. Im gleichen Rahmen bewegten sich die Übereinstimmungen zu den durch Klonierung aus Proben der Sargassosee erhaltenen Sequenzen SAR 6, SAR 7, SAR 100 und SAR 139 (95,7-96,6%). Zu 95,9 und 96,0% waren die Sequenzen der *Synechococcus* spp. WH 7805 bzw. WH 8103 identisch. Dagegen waren die Ähnlichkeiten zu Sequenzen anderer auch als *Synechococcus* sp. klassifizierter Organismen, wie z. B. des ebenfalls sequenzierten *Synechococcus* sp. PCC 7335 (90,4%), nie höher als 91,1%.

3.3.2 *Synechococcus* sp. PCC 7335

1437 Basen der 16S rRNS, entsprechend der *E. coli*-Positionen 14-1502, wurden lückenlos bestimmt. Die nächstverwandte Sequenz zu diesem Organismus war mit 92,3% Übereinstimmung die von *Phormidium* sp. N 182. Mit einer Ähnlichkeit von 90,9 und 90,6% folgten dann erst Sequenzen von anderen *Synechococcus* spp., nämlich die von *S. lividus* CCCY7C-S bzw. *Synechococcus* sp. PCC 7001.

3.3.3 *Chroococcus* sp. PCC 9340

Die Positionen 14-1502 wurden von diesem *Chroococcus*-Stamm bestimmt (1434 Basen). Die größte Übereinstimmung in der 16S rRNS trat mit *Gloeotheca membranacea* PCC 6501 auf (92,9%), es folgten *Prochloron didemni* (92,6%) und *Cyanotheca* sp. PCC 7424 (91,5%).

3.3.4 *Crinalium epipsammum* PCC 9333

Von *Crinalium* sp. wurden 1443 Basen (*E. coli*-Positionen 14-1507) sequenziert. Zwei Basen ließen sich nicht eindeutig bestimmen. An Position 69 steht entweder ein A oder ein G, an Position 649 ein C oder U. Nach der 16S rRNS Sequenz ähnlichster Organismus war *Chamaesiphon* sp. PCC 7430 mit einer Übereinstimmung von 91,4%. Weiter folgten *Nostoc muscorum* PCC 7120 mit 91,2%, *Oscillatoria* sp. PCC 7112 mit 91,1% und *Anabaenopsis* sp. PCC 9215 mit 91,0%.

3.3.5 *Oscillatoria* sp. PCC 7112

Die von dieser *Oscillatoria* sp. identifizierten 1447 Basen (*E. coli*-Positionen 14-1502) wiesen nur 90,4-90,7% Ähnlichkeit mit den bisher bekannten Sequenzen von *Oscillatoria* spp. (etwa 1000 Basen lange Teilsequenzen von PCC 6304 und PCC 7515, fast vollständige Sequenz von *O. agardhii* [NIVA-CYA 18]) auf, wobei diese auch untereinander maximal zu 89,8% ähnlich sind. Zu der untersuchten Art am ähnlichsten waren die 16S rRNS-Sequenzen von *Lyngbya* sp. PCC 7419 (92,5%), von *Trichodesmium* NIBB 1067 (92,4%) und von *Arthrospira* PCC 7345 (91,8%).

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | |
|----|----------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | <i>Leptolyngbya</i> sp. | VRUC 135 | 90,3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Klon SAR6 | | 88,1 | 88,3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | <i>P. marinus</i> | SSW 5 | 87,2 | 87,0 | 98,2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Klon SAR 139 | | 87,3 | 87,8 | 96,8 | 96,9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Klon SAR 100 | | 87,8 | 88,5 | 96,7 | 97,0 | 99,5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6301 | 88,3 | 90,5 | 90,8 | 89,9 | 91,1 | 91,7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | <i>Phormidium</i> sp. | N182 | 88,7 | 89,5 | 88,0 | 87,2 | 88,3 | 88,8 | 89,0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Klon SAR 7 | | 87,6 | 88,2 | 96,9 | 97,2 | 97,8 | 97,8 | 90,5 | 88,2 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | <i>S. lividus</i> | CCCY7C-S | 91,2 | 90,3 | 90,0 | 89,6 | 90,2 | 90,6 | 91,9 | 89,5 | 89,6 | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | <i>M. holsatica</i> | NIES 43 | 88,6 | 88,5 | 95,5 | 95,5 | 95,7 | 96,1 | 91,0 | 88,3 | 95,3 | 90,5 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | <i>S. elongatus</i> | | 89,8 | 89,6 | 89,0 | 88,5 | 89,7 | 90,1 | 90,0 | 87,0 | 89,0 | 98,9 | 90,4 | | | | | | | | | | | |
| 13 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7942 | 88,4 | 90,5 | 90,5 | 90,1 | 91,4 | 92,0 | 99,6 | 89,0 | 90,5 | 92,1 | 91,0 | 89,9 | | | | | | | | | | |
| 14 | <i>P. marinus</i> | PCC 9511 | 88,2 | 88,0 | 99,6 | 98,3 | 96,8 | 96,8 | 90,7 | 88,3 | 97,2 | 90,3 | 95,7 | 89,0 | 90,8 | | | | | | | | | |
| 15 | <i>Chroococcus</i> sp. | PC 9340 | 89,6 | 89,5 | 88,0 | 87,8 | 88,9 | 89,4 | 88,5 | 88,3 | 88,1 | 90,4 | 88,2 | 89,4 | 88,8 | 88,2 | | | | | | | | |
| 16 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7001 | 88,3 | 88,4 | 95,7 | 96,0 | 96,3 | 96,6 | 91,0 | 89,0 | 95,7 | 90,9 | 97,0 | 90,2 | 91,1 | 96,0 | 88,4 | | | | | | | |
| 17 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 6307 | 88,6 | 88,6 | 95,9 | 96,0 | 96,1 | 96,5 | 91,4 | 88,4 | 95,6 | 91,1 | 99,4 | 90,9 | 91,3 | 96,1 | 88,2 | 97,5 | | | | | | |
| 18 | <i>Synechococcus</i> sp. | WH 7805 | 86,4 | 87,3 | 95,9 | 96,9 | 97,4 | 97,6 | 90,9 | 87,6 | 96,8 | 90,0 | 95,4 | 89,0 | 91,2 | 96,2 | 88,2 | 95,9 | 95,9 | | | | | |
| 19 | <i>Synechococcus</i> sp. | WH 8101 | 87,9 | 88,6 | 96,4 | 96,9 | 98,3 | 98,2 | 91,7 | 89,0 | 97,4 | 91,1 | 96,1 | 90,2 | 91,7 | 96,7 | 89,3 | 97,2 | 96,7 | 97,0 | | | | |
| 20 | <i>Synechococcus</i> sp. | WH 8103 | 87,2 | 87,7 | 96,5 | 96,9 | 99,2 | 99,0 | 91,0 | 88,2 | 97,7 | 89,9 | 95,4 | 89,3 | 91,1 | 96,8 | 88,6 | 96,0 | 95,8 | 97,8 | 98,0 | | | |
| 21 | <i>Prochlorococcus</i> sp. | MIT 9313 | 88,0 | 88,8 | 97,5 | 98,0 | 97,1 | 97,4 | 91,3 | 88,9 | 97,0 | 90,3 | 96,3 | 89,4 | 91,5 | 97,7 | 88,5 | 96,4 | 96,5 | 97,2 | 97,2 | 97,2 | | |
| 22 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7335 | 90,1 | 90,3 | 89,0 | 87,8 | 88,7 | 89,2 | 90,2 | 92,3 | 89,4 | 90,9 | 90,0 | 88,8 | 90,1 | 89,3 | 89,7 | 90,6 | 90,1 | 87,8 | 90,1 | 88,6 | 89,5 | |
| 23 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 | 89,7 | 89,9 | 88,6 | 87,9 | 88,8 | 89,1 | 89,6 | 88,8 | 88,6 | 90,1 | 88,1 | 89,6 | 89,7 | 88,6 | 90,6 | 88,4 | 88,7 | 88,1 | 89,0 | 88,4 | 88,4 | 89,0 |

Tabelle 3.4: Ähnlichkeitsmatrix der verschiedenen *Synechococcus*-Stämme und der nächsten Verwandten der beiden sequenzierten Stämme (grau hinterlegt). Werte in Prozent.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | |
|----|--------------------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | <i>M. wesenbergii</i> | NIES 112 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | <i>Pleurocapsa</i> sp. | PCC 7516 | 88,6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | <i>Prochloron</i> sp. | | 89,0 | 91,3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | <i>N. muscorum</i> | PCC 7120 | 88,9 | 88,6 | 90,2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | <i>Chroococciopsis</i> | PCC 7203 | 87,9 | 88,0 | 88,4 | 90,2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | <i>Trichodesmium</i> sp. | NIBB 1067 | 88,9 | 88,3 | 90,0 | 90,9 | 88,4 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | <i>Arthrospira</i> sp. | PCC7345 | 89,1 | 89,0 | 90,4 | 91,0 | 89,1 | 92,1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | <i>Chamaesiphon</i> sp. | PCC 7430 | 89,5 | 88,8 | 89,1 | 89,9 | 88,9 | 89,7 | 90,5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | <i>Microcoleus</i> sp. | PCC 7420 | 90,4 | 88,6 | 90,2 | 90,7 | 90,5 | 91,3 | 91,1 | 90,0 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | <i>G. membranacea</i> | PCC 6501 | 91,6 | 90,0 | 91,2 | 89,7 | 88,4 | 90,1 | 90,1 | 89,8 | 91,1 | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | <i>Synechocystis</i> sp. | PCC 6803 | 91,7 | 90,2 | 90,5 | 90,4 | 88,4 | 89,3 | 90,0 | 91,8 | 90,3 | 92,5 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | <i>M. viridis</i> | NIES 102 | 99,3 | 88,8 | 88,9 | 89,3 | 88,1 | 89,0 | 89,1 | 89,4 | 90,6 | 91,8 | 92,0 | | | | | | | | | | | |
| 13 | <i>Anabaenopsis</i> sp. | PCC 9215 | 89,3 | 88,7 | 89,4 | 95,6 | 89,4 | 90,1 | 89,8 | 90,3 | 90,7 | 89,5 | 90,4 | 89,5 | | | | | | | | | | |
| 14 | <i>Cyanospira</i> sp. | PCC 9501 | 89,4 | 88,5 | 90,2 | 96,0 | 89,6 | 90,0 | 90,5 | 90,5 | 91,0 | 89,7 | 90,4 | 89,5 | 98,0 | | | | | | | | | |
| 15 | <i>Nodularia</i> sp. | PCC 9350 | 88,3 | 88,1 | 89,5 | 95,1 | 89,8 | 89,6 | 90,0 | 89,8 | 90,4 | 89,2 | 89,3 | 88,4 | 96,7 | 96,8 | | | | | | | | |
| 16 | <i>Oscillatoria</i> sp. | PCC 7112 | 88,5 | 89,2 | 89,9 | 91,1 | 89,8 | 92,4 | 91,8 | 90,0 | 90,6 | 90,5 | 89,4 | 88,6 | 89,3 | 89,4 | 89,3 | | | | | | | |
| 17 | <i>Chroococcus</i> sp. | PCC 9340 | 89,9 | 91,1 | 92,6 | 90,1 | 88,1 | 90,3 | 90,7 | 89,6 | 90,6 | 92,9 | 91,2 | 90,0 | 89,4 | 89,9 | 89,3 | 90,7 | | | | | | |
| 18 | <i>C. epiammum</i> | PCC 9333 | 88,8 | 87,5 | 88,9 | 91,2 | 89,4 | 89,5 | 90,3 | 91,4 | 90,9 | 90,0 | 89,2 | 89,0 | 91,0 | 90,7 | 90,8 | 91,1 | 89,7 | | | | | |
| 19 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7335 | 88,0 | 88,7 | 88,3 | 88,5 | 88,2 | 88,5 | 89,3 | 90,1 | 87,2 | 88,3 | 88,5 | 88,3 | 88,3 | 88,2 | 88,4 | 89,2 | 89,7 | 89,0 | | | | |
| 20 | <i>Eubalthece</i> sp. | MPI 95AH10 | 89,7 | 90,0 | 89,6 | 88,6 | 87,2 | 88,1 | 89,2 | 88,4 | 90,8 | 90,4 | 90,9 | 90,1 | 88,2 | 88,1 | 88,3 | 88,7 | 90,6 | 88,7 | 87,8 | | | |
| 21 | <i>Cyanothece</i> sp. | PCC 7424 | 90,7 | 89,9 | 89,5 | 88,2 | 88,7 | 88,9 | 89,6 | 88,2 | 90,7 | 93,4 | 91,3 | 91,1 | 88,3 | 87,9 | 88,0 | 90,1 | 91,5 | 89,9 | 88,6 | 89,7 | | |
| 22 | <i>Lyngbya</i> sp. | PCC 7419 | 88,7 | 89,1 | 90,3 | 90,5 | 89,7 | 92,3 | 95,2 | 91,1 | 91,2 | 90,2 | 90,4 | 88,7 | 89,7 | 90,3 | 89,6 | 92,5 | 90,7 | 90,3 | 89,6 | 88,8 | 89,5 | |
| 23 | <i>Synechococcus</i> sp. | PCC 7002 | 90,4 | 90,8 | 90,7 | 89,9 | 87,2 | 89,0 | 90,2 | 89,7 | 89,5 | 90,0 | 92,5 | 90,8 | 89,6 | 89,7 | 89,5 | 90,1 | 90,6 | 88,8 | 89,0 | 90,5 | 90,0 | 89,7 |

Tabelle 3.5: Ähnlichkeitsmatrix der 16S rRNS für die drei weiteren sequenzierten Organismen (grau hinterlegt) und ihre nächsten Verwandten (Werte in Prozent).

4 Diskussion

4.1 Hybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden

Die Anwendung Meerrettichperoxidase-markierter Sonden wurde bereits früher als Alternative zu fluoreszenzmarkierten Sonden beschrieben, wenn Zellen oder die Proben, in denen Zellen detektiert werden sollten, Autofluoreszenz aufwiesen (Amann *et al.*, 1992; Zarda, 1994; Schönhuber, 1995; Amann *et al.*, 1997). Der Nachweis der Meerrettichperoxidase, und damit der gebundenen Sonden, erfolgte nämlich nicht über Fluoreszenzanregung, sondern indirekt über die Zugabe eines geeigneten, chromogenen Substrats, das innerhalb der Zellen präzipitierte. Eine Unterscheidung positiver und negativer Hybridisierungsergebnisse ist dadurch lichtmikroskopisch möglich. Das ebenfalls diskutierte Ziel des sensitiveren Nachweises gegenüber direkt fluoreszenzmarkierten Sonden (Amann *et al.*, 1992) konnte aber – zumindest mit den zur Verfügung stehenden nichtfluoreszierenden Substraten – nicht erreicht werden (Zarda, 1994). Für diese Arbeit stand ein neuartiges, fluoreszierendes Substrat für die Meerrettichperoxidase zur Verfügung, dessen Eignung für die Signalverstärkung bei Ganzzellhybridisierungen verschiedener Bakterien getestet wurde. Nichtfluoreszierender Nachweis und Signalverstärkung mit fluoreszierendem Substrat wurden für die spezifische Detektion von Cyanobakterien weiterentwickelt.

4.1.1 Nichtfluoreszierende Detektion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zwei chromogenen Substrate TETON und DAB-Substrat verwendet. Mit beiden war es möglich, spezifisch die sondenvermittelte Meerrettichperoxidaseaktivität durch einen Farbniederschlag innerhalb positiver Zellen nachzuweisen. Erreicht wird dieser Niederschlag durch oxidative Polymerisierung der Substratmoleküle mit Wasserstoffperoxid als Cosubstrat und Meerrettichperoxidase als Katalysator. Aspekte der Sensitivität des nichtfluoreszierenden Nachweises werden in Kapitel 4.1.4 diskutiert.

Beide Substrate eigneten sich auch für den Nachweis in einer sukzessiven Doppelhybridisierung, wenn, wie festgestellt wurde, die Detektion nach der ersten Hybridisierung mit DAB-Substrat und nach der zweiten mit TETON erfolgte, weil der

TETON-Niederschlag sich im Gegensatz zum DAB-Niederschlag während einer zweiten Hybridisierung in Ethanol bzw. im Hybridisierungspuffer aufgrund des Formamidanteils wieder löste.

4.1.2 Nachweis über Chemilumineszenz

Chemilumineszierende Substrate wurden bereits früher erfolgreich für den Nachweis Meerrettichperoxidase-markierter Sonden bei Membranhybridisierungen eingesetzt (Trebesius, 1995; Meier, 1997; Snaidr, 1997; Juretschko *et al.*, 1999). Meerrettichperoxidase-markierte Sonden sind hier eine Alternative zu Digoxigenin-markierten, die ebenfalls bei Membranhybridisierungen eingesetzt werden können. Das Digoxigenin wird anschließend in einem ersten Schritt mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper-alkalische Phosphatase-Konjugat inkubiert. Alkalische Phosphatase dient dann in einem zweiten Schritt als Katalysator für die Umsetzung eines ebenfalls chemilumineszierenden Substrats. Dieses von Boehringer Mannheim angebotene System besitzt zwar eine etwas höhere Sensitivität, Vorteile der Meerrettichperoxidase-markierten Sonden sind aber die kürzere Nachweiszeit, da der Inkubationsschritt mit enzymmarkierten Antikörpern wegfällt, und das bessere Signal-Hintergrund-Verhältnis (Zarda, 1994). Nicht erfolgreich waren hingegen die Versuche, ganze Zellen, die mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden hybridisiert wurden, mit Hilfe mikroskopischer Verfahren nach der Inkubation mit einem chemilumineszierenden Substrat zu detektieren. Gleichwohl konnten Signale durch Auflegen eines Röntgenfilms durchaus aufgefangen werden (Zarda, 1994), d.h., prinzipiell fand eine Umsetzung des Substrats auch in den ganzen Zellen statt. Ein zu hoher Lichtverlust innerhalb des optischen Systems wurde als Hauptgrund für den nicht gelungenen mikroskopischen Nachweis angesehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Detektionssystem mit einer photonensensitiven Kamera verwendet, die einzelne Photonen, also die kleinsten Quantitäten, in denen Licht auftreten kann, detektieren konnte. Voraussetzung für die spezifische Erfassung eines Sondersignals ist aber die ausreichende Anzahl an ausgesandten Photonen, die deutlich über der im System natürlicherweise vorkommenden liegen muß, um dieses Signal aus dem Hintergrundrauschen treten zu lassen. Während sich bei der Detektion durch Exposition eines Röntgenfilms – unter Verlust an Auflösung – die Signale vieler Zellen addieren, muß bei einem mikroskopischen Nachweis der Umsatz innerhalb einer einzelnen Zelle hoch sein. Durch Kombination der photonensensitiven Kamera auf der Detektionsseite und eines neuen, sensitiveren Substrates war es nun möglich, größere Einzelzellen und Kolonien kleinerer Zellen mikroskopisch

nachzuweisen. Denkbar als Anwendung wäre die Untersuchung der Verteilung bestimmter Bakterienpopulationen in autofluoreszierenden Biomatten, gleichwohl dürfte für Routineanwendungen im Vergleich zu Standardhybridisierungstechniken der Aufwand zu hoch und die Auflösung zu schlecht sein.

4.1.3 Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA)

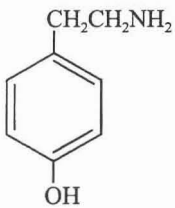


Abbildung 4.1:
Strukturformel von
Tyramin

Ursprünglich wurde diese Technik für den sensitiveren Nachweis in ELISAs (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays) entwickelt (Bobrow *et al.*, 1989). Meerrettichperoxidase, gekoppelt an einen Antikörper gegen das nachzuweisende Immunglobulin G von Mäusen, fungierte dabei als Reporterenzym und katalysierte in einem Schritt vor der eigentlichen Detektion die Radikalisierung des phenolischen Rings von biotinyliertem Tyramin. Die Koppelung von Tyramin und Biotin bzw. anderen Markermolekülen erfolgt über die Aminogruppe von Tyramin (Abbildung 4.1) unter Ausbildung einer Amidbindung. Im weiteren werden die substituierten Tyramine als Tyramide bezeichnet. Die in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase

gebildeten Tyramidradikale reagierten, so wurde postuliert (Bobrow *et al.*, 1989), unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit den elektronenreichen der im Ansatz vorhandenen Aminosäurereste wie Tyrosin und Tryptophan und stellten das konjugierte Biotin für die Anlagerung von modifiziertem Streptavidin zur Verfügung. Dieses Streptavidin war nun gekoppelt an Meerrettichperoxidase (oder alternativ an alkalische Phosphatase), die ihrerseits in einem letzten Schritt nach der Zugabe eines geeigneten chromo- oder fluorogenen Substrates die eigentliche Detektionsreaktion katalysierte. Die entscheidende Rolle spielte bei dieser CARD („CAtalyzed Reporter Deposition“) genannten Methode die Fähigkeit der Meerrettichperoxidase, phenolische Systeme zu radikalisieren (Zaitzu und Ohkura, 1980). Bei einer hohen Konzentration an Phenolen wurde dabei deren Dimerisierung katalysiert. Standen bei niedriger Konzentration nicht genügend Partner zur Verfügung, nahm die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit der festen Phase zu, sprich mit den elektronenreichen, im Ansatz vorhandenen Aminosäuren (Bobrow *et al.*, 1989). Mit dieser Methode konnte bei membrangebundenen Immunoassays eine bis zu 200fache Signalverstärkung erreicht werden (Bobrow *et al.*, 1991). Vier Jahre später wurde über die Anwendung von CARD zur *in situ*-Hybridisierung berichtet (Kerstens *et al.*, 1995). Die Detektion einer Sonde erfolgte über ein

Nachweissystem, das auf Meerrettichperoxidase als Reporterenzym basierte. Die Meerrettichperoxidase katalysierte die Anlagerung von biotinyliertem Tyramid in der Umgebung der Sondenbindungsstelle. Das dadurch eingebrachte Biotin wurde schließlich mit fluoreszenz- oder enzymmarkiertem Avidin nachgewiesen. Als alternative Nachweismethode wurden fluoreszenzmarkierte Tyramide verwendet, bei denen ein weiterer Detektionsschritt entfallen kann (Raap *et al.*, 1995; Van Gijlswijk *et al.*, 1997). Tyramide, die mit Fluorescein, Tetramethylrhodamin, Coumarin und mittlerweile auch Cy3 markiert sind, werden von der Firma NEN™ Life Science Products in ihren sogenannten „TSA™-Direct“-Kits (Tyramide Signal Amplification) angeboten. Mit diesen Kits können biotinylierte Sonden oder Antikörper, die entsprechend den herkömmlichen Verfahren in Hybridisierungs- oder immunochemischen Reaktionen zum Nukleinsäure- bzw. Antigennachweis eingesetzt worden sind, sehr sensitiv nachgewiesen werden.

Bei der in dieser Arbeit evaluierten Anwendung der Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA), wurden nach Urdea *et al.* (1988) direkt mit Meerrettichperoxidase gekoppelte, 16S rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden eingesetzt. Schematisch ist der Ablauf in Abbildung 4.2 dargestellt. Da die verwendeten Sonden direkt mit Meerrettichperoxidase statt Biotin markiert waren, entfiel der Inkubationsschritt mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase, was zum einen die Zeit, die zur Durchführung der Detektion notwendig war, verkürzte, zum anderen aber auch etwaige Kreuzreaktionen mit evtl. vorhandenem endogenem Biotin ausschloß.

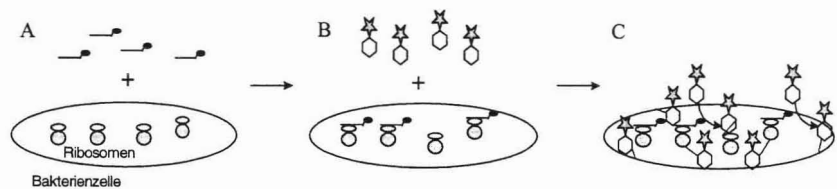


Abbildung 4.2: Prinzip der Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Oligonukleotidsonden und anschließender Detektion mit TSA. A, Hybridisierung mit 16S rRNS-gerichteten Sonden. B, Inkubation mit Fluorochrom-Tyramid als Substrat. C, kovalente Bindung des aktivierten Substrats an die Zelle.

Hybridisierungen mit anschließender Signalverstärkung durch TSA konnten auf Objektträgern, auf Filtern und in Flüssigkeit durchgeführt werden. Die erhaltenen Signale waren sowohl spezifisch als auch deutlich stärker als die Signale von Hybridisierungen mit einfach fluoreszenzmarkierten Sonden der gleichen Spezifität.

4.1.3.1 Spezifität der Tyramid-Signal-Amplifikation

Die hellen spezifischen Signale nach Tyramid-Signal-Amplifikation konnten stets gebundener Sonde zugeordnet werden. Weder die Inkubation mit Fluorochrom-Tyramid alleine, noch die Inkubation nach einer Hybridisierung mit einer theoretisch nicht bindenden Sonde, zeigte anschließend den positiven Hybridisierungen entsprechende Signale, auch wenn eine leichte Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz festzustellen war. Einer weiteren Erhöhung dieser Hintergrundfluoreszenz bzw. der unspezifischen Anfärbung von Nichtzielzellen in Gemischen mit Zielzellen, die vor allem bei längeren Inkubationszeiten auftraten, konnte durch Zugabe von Dextransulfat zur Substratlösung entgegengewirkt werden (Van Gijlswijk *et al.*, 1996). Die Autoren vermuteten, daß die Erhöhung der Viskosität in der Substratlösung durch Dextransulfat ausschlaggebend für die verbesserte Lokalisierung der Signale war.

4.1.3.2 Quantifizierung der Signalstärken bei *E. coli*-Zellen mit Hilfe der Bildverarbeitung

Bei den Analysen mit dem Bildverarbeitungssystem wurden Signale von Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen, mit unterschiedlicher Fixierung (Ethanol bzw. Paraformaldehyd) und mit oder ohne Lysozymbehandlung verglichen. Schwächere und stärkere Signale unterschieden sich dabei so deutlich, daß nicht mit einheitlichen Aufnahmeparametern gearbeitet werden konnte. Statt dessen wurde mit verschiedenen Zeiten bei konstanten Werten für Helligkeit und Kontrast gearbeitet und die mit Hilfe des Quantifizierungsprogramms erhaltenen Werte für die Signalstärke bei geringeren Zeiten auf die längsten Belichtungszeiten extrapoliert. Daß ein linearer Zusammenhang zwischen Zeit und Signalstärke besteht, der dieses Verfahren erlaubte, war bereits früher gezeigt worden (Trebesius, 1995). Ein Ausbleichen der Signale während einer maximalen Aufnahmezeit von sechs Sekunden und Citifluor als Einbettmedium (Florijn *et al.*, 1995) war vernachlässigbar.

Da sich sowohl die Art der Fixierung und Vorbehandlung als auch die Methode der Hybridisierung auf die scheinbare Größe von Zellen aus der gleichen Kultur auswirkten, wurde als Maß für die Signalstärke die Helligkeit pro Zelle und nicht pro Flächeneinheit gewählt. Die Zellen aus Kultur I und II (siehe 3.1.3.2), die mit Paraformaldehyd fixiert, mit Lysozym vorbehandelt und mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden hybridisiert wurden, waren

fast doppelt so groß wie die Zellen in allen anderen Versuchen. Der überwiegende Anteil dieser bei Auflichtfluoreszenz gemessenen Größenzunahme dürfte auf die hohe Signalstärke zurückzuführen sein, die durch Ausstrahlung über die Zellgrenzen hinaus den Eindruck größerer Zellen erweckte. Letztendlich schien aber für die Abschätzung des Verstärkungsfaktors das Heranziehen der gesamten Helligkeit, die in Form von Fluoreszenzmolekülen in eine Zelle eingebracht wurde, sinnvoller als die Verwendung der Helligkeit pro Fläche, die wegen der Flächenzunahme kleiner ausgefallen wäre, aber eben auch nicht die wahre Signalverstärkung widerspiegelt hätte.

Ein Vergleich der Hybridisierungssignale fluoreszenzmarkierter Sonden bei standardmäßig mit Paraformaldehyd fixierten Zellen zeigte, daß nach Lysozymbehandlung bei beiden Kulturen die Signalstärke auf jeweils etwa 60% absank. Dieser Signalverlust dürfte durch einen Verlust an Zielmolekülen, sprich ribosomaler RNS, verursacht worden sein, der als Folge der Vorbehandlung aufgetreten war. Im Gegensatz dazu war bei der Übernachtskultur erst nach Lysozymbehandlung ein meßbares Signal zu erreichen. Das spricht für eine Veränderung der Zellhülle bei älteren Zellen. Während bei ihnen die Zellwand durch Lysozym für die Sonden erst ausreichend zugänglich geworden war, wurden bei den beiden anderen Kulturen die Zellwände durch die gleiche Lysozymbehandlung so durchlässig, daß auch Ribosomen bzw. rRNS-Moleküle verloren wurden.

Meerrettichperoxidase-markierte Sonden sind im Vergleich zu direkt fluoreszenzmarkierten Sonden etwa zehnmals größer (MW etwa 50.000 bzw. 6.000; Amann *et al.*, 1992). Entsprechend sind vermehrt Probleme beim Durchtritt durch die Zellhülle zu erwarten. Durch geeignete Fixierung, z.B. mit Ethanol, oder durch Vorbehandlung Paraformaldehyd-fixierter mit Lysozym war aber, zumindest bei gramnegativen Bakterien, eine ausreichende Zugänglichkeit gewährleistet (Zarda, 1994). In der Tat konnten mit beiden Verfahren annähernd gleiche Signalstärken mit TSA erreicht werden. Weniger geeignet, aber immer noch zugänglich, waren Paraformaldehyd-fixierte Zellen ohne Vorbehandlung. Der im Vergleich zu Paraformaldehyd-fixierten Zellen mit Lysozymbehandlung auf 69% (Kultur I) bzw. sogar 47% (Kultur II) abgesunkene Wert zeigt, daß wegen erschwerter Zugänglichkeit zwar weniger, aber noch genügend Meerrettichperoxidase-markierte Sonden gebunden hatten, die anschließend über TSA detektierbar waren. In diesem Licht betrachtet, dürften die negativen Hybridisierungsergebnisse von Paraformaldehyd-fixierten Zellen ohne weitere Behandlung (Amann *et al.*, 1992; Zarda, 1994) auch von der mangelnden Sensitivität des

nichtfluoreszierenden Nachweises (siehe 4.1.4) herrühren und nicht nur von der Unzugänglichkeit der Zellen.

Je nachdem, welche der Kulturen (I oder II) nach der Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden in ihrer Signalstärke mit den Ergebnissen der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden verglichen wurde, konnten Verstärkungen zwischen 14- und 32fach gemessen werden. Daß das Potential der Verstärkung aber nicht ausgeschöpft wurde, zeigte der Vergleich mit den Zellen aus der Übernachtskultur. Bei ihr war eine Verstärkung um den Faktor 86 erreicht worden. Dafür war aber die sehr niedrige Signalstärke bei der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden verantwortlich; die Signalstärke nach der Amplifikation war in etwa gleich hoch wie die der Zellen aus den Kulturen I und II nach der gleichen Methode. Das dürfte darauf hindeuten, daß bei der Verstärkungsreaktion bereits eine Sättigung eingetreten war, beispielsweise durch die Besetzung aller potentiellen Bindungspositionen. Die Tatsache, daß eine Vorbehandlung mit Lysozym, wie oben beschrieben, die Signalstärke nach der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden abnehmen ließ, deutet auf einen Verlust an Zielmolekülen hin. Geht man nun davon aus, daß auch bei der Hybridisierung der gleich behandelten Zellen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden diese niedrige Zahl zugrunde lag, und vergleicht daraufhin die Signalstärken der Lysozym-behandelten Zellen mit gleicher angenommener Ribosomenzahl, so erhält man Werte von 34fach (Kultur I) und 57fach (Kultur II). NEN™ Life Science Products, der Hersteller des verwendeten TSA-Kits, gibt eine mögliche Verstärkung chromogener oder fluoreszierender Signale von bis zu 1.000fach an – allerdings ohne experimentelle Belege. Bei bisher beschriebenen Anwendungen wurden aber eher im Bereich der hier bestimmten Verstärkung liegende Werte gemessen: 30fach bei einem Immunoassay zum Nachweis eines *Herpes simplex* Virus-Antigens unter Verwendung von biotinyliertem Tyramid und einer nichtfluoreszierenden Detektionsreaktion (Bobrow *et al.*, 1989), bis zu 200fach bei einem membrangebundenen Immunoassay (Bobrow *et al.*, 1991), 15fach bei einer Immunofärbung von Zelloberflächenmarkern mit Cy3-Tyramid als Substrat (Chao *et al.*, 1996), 25fach mit biotinylierten Oligonukleotidsonden, bzw. sechsfach mit direkt Meerrettichperoxidase-markierten Sonden und Cy3-Tyramid als Substrat bei *in situ*-Hybridisierungen zur Bestimmung der Genexpression des Histons 4 in HeLa-Zellen (Schmidt *et al.*, 1997) und sieben- bis zwölffach bei der Identifizierung von Bakterien mit biotinylierten 16S rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden und Fluorescein-Tyramid als Substrat (Lebaron *et al.*, 1997).

4.1.3.3 Quantifizierung über das Durchflußzytometer

Am Durchflußzytometer wurden die Signalstärken von Paraformaldehyd-fixierten und mit Lysozym vorbehandelten Zellen gemessen. Die Hybridisierungen mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden in Flüssigkeit ergaben dabei ein uneinheitliches Bild: Ein Fünftel der Zellen war deutlich weniger gefärbt als der Durchschnitt, und auch die restlichen vier Fünftel hatten nur eine etwa zehnmal höhere Signalstärke als die gleichen Zellen nach der standardmäßigen Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden, ebenfalls in Flüssigkeit. Es kann nur darüber spekuliert werden, ob vielleicht die Zugänglichkeit der Zellen für die größeren Meerrettichperoxidase-markierten Sonden durch die Bildung von Zellniederschlägen während der dreistündigen Hybridisierung soweit erniedrigt war, daß entsprechend weniger Sonden binden konnten, oder ob der Inkubationsschritt mit Fluorescein-Tyramid bei Zellen in Flüssigkeit nicht so effektiv ist wie bei auf Objektträgern immobilisierten Zellen.

4.1.3.4 Anwendbarkeit in Umweltproben

Vergleiche der Detektionsraten von Hybridisierungen mit Cy3- und Meerrettichperoxidase-markierter Sonde EUB338 bei ethanolfixierten Belebtschlamm- bzw. Teichwasserproben ergaben Unterschiede von bis zu 50% zuungunsten der Kombination Meerrettichperoxidase-markierte Sonde/Nachweis über TSA. Wie oben beschrieben, ist die Größe der enzymmarkierten Sonde ein kritischer Punkt für die Penetration der Zellhüllen. Während viele der untersuchten gramnegativen Organismen nach Ethanolfixierung zugänglich waren, zeigte sich für grampositive Organismen oder Vertreter der Archaea mit ungleichmäßigen Färbungen ein anderes Bild (Zarda, 1994; diese Arbeit). So dürfte es schwierig sein, für komplexe mikrobielle Populationen geeignete Fixierungs- und Vorbehandlungsmethoden zu finden, die zum einen bei schwer zugänglichen Bakterien eine Hybridisierung mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden erlauben, zum anderen aber noch nicht zur Lyse der restlichen Zellen in der Population führen. Ergebnisse von Hybridisierungen mit Sonden für größere Gruppen sollten deshalb immer mit Vorsicht genossen werden. Daß aber nicht unbedingt Probleme auftreten müssen, zeigen Hybridisierungsergebnisse von Böden mit verschiedenen gruppenspezifischen Sonden (Chatzinotas *et al.*, 1998). Anteile der mit den jeweiligen Sonden erfaßbaren Zellen waren nämlich für fluoreszenzmarkierte Sonden und Meerrettichperoxidase-markierte Sonden in Kombination mit TSA in etwa gleich hoch. Eine entscheidende Verbesserung erbrachte die Anwendung der letztgenannten Methode für die Detektion von grampositiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNS in den untersuchten Böden, die mit fluoreszenzmarkierten

Sonden aufgrund niedriger Signalstärken und Hintergrundfluoreszenz der Bodenpartikel erschwert bzw. unmöglich war (Chatzinotas *et al.*, 1998).

4.1.3.5 Andere Anwendungen für TSA bei Bakterien

Daß die Tyramid-Signal-Amplifikation bei Bakterien universell einsetzbar und nicht auf die Verwendung 16S rRNS-gerichteter Sonden beschränkt ist, zeigten folgende Beispiele: TSA wurde in Kombination mit Digoxigenin-markierten Polynukleotidsonden zum Nachweis von mRNA in Listerien (Wagner *et al.*, 1998) oder in Kombination mit Meerrettichperoxidase-markierten Oligonukleotidsonden zur *in situ*-Detektion von ColE1-verwandten Plasmiden in *E. coli*-Zellen (Juretschko *et al.*, 1999) benutzt. Erste Hybridisierungsergebnisse sprachen auch für eine Nachweisbarkeit der tmRNA (Lee *et al.*, 1978; Williams und Bartel, 1996) in ganzen Zellen von *E. coli* und Laktokokken über die Sondendetektion mit TSA (W. Schönhuber und S. Kulakauskas, unveröffentlichte Daten).

4.1.4 Vergleich nichtfluoreszierender Nachweis/Tyramid-Signal-Amplifikation

Bei Ganzzellhybridisierungen von Cyanobakterien mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden wurde deutlich, daß die beiden verwendeten Nachweisverfahren unterschiedliche Sensitivität besitzen. So war bei einigen Vertretern die Detektion der gebundenen Meerrettichperoxidase-markierten Sonde nur mit TSA, nicht aber mit einem nichtfluoreszierenden Substrat wie TETON möglich. Allgemein ist zwar der Nachweis von Fluorochromen sensitiver als von Chromogenen, weil für eine Detektion weniger Moleküle notwendig sind. Allerdings ist schwer verständlich, warum eine Verlängerung der Inkubationszeit bei der Umsetzung des chromogenen Substrates nicht zu einem Farbniederschlag führte. Prinzipiell sollte die Meerrettichperoxidase als Katalysator in der Lage sein, solange Substratmoleküle umzusetzen, bis deren Anzahl auch zur nichtfluoreszierenden Detektion ausreicht. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet sich, wenn man die unterschiedliche Art der Umsetzung des Substrats bzw. der Anhäufung der Substratmoleküle in der Zelle betrachtet. Bei der Tyramid-Signal-Amplifikation führt die Radikalisierung des Tyramids theoretisch direkt zu einer kovalenten Bindung des Tyramids an die Zelle, das so zum Nachweis zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu katalysiert die Meerrettichperoxidase bei den nichtfluoreszierenden Substraten eine oxidative Polymerisierung der Substratmoleküle, die dadurch innerhalb der Zelle präzipitieren. Wenn nun, bedingt durch die niedrige Zahl an gebundenen Meerrettichperoxidase-markierten Sonden, die Bildungsrate der zur Polymerisierung notwendigen Moleküle niedrig ist und von deren Diffusionsrate übertroffen

wird, ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß genügend Moleküle zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden sind und durch Polymerisierung präzipitieren, und kann nicht durch die Dauer der Inkubation beeinflusst werden.

4.2 Hybridisierungen von Cyanobakterien

4.2.1 *Cyanobakterienspezifische Sonden*

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, cyanobakterienspezifischen Sonden dienten vornehmlich der Weiterentwicklung und Evaluierung der Ganzzell- bzw. *in situ*-Hybridisierung von Cyanobakterien mit Meerrettichperoxidase-markierten 16S rRNS-gerichteten Sonden. Anhand von Referenzstämmen mit bekannten 16S rRNS-Sequenzen wurden Hybridisierungsbedingungen gefunden, die einen spezifischen Einsatz der Meerrettichperoxidase-markierten Sonden in Kombination mit dem nichtfluoreszierenden Nachweis bzw. der Tyramid-Signal-Amplifikation bei Cyanobakterien erlaubten.

4.2.1.1 *Austesten durch Membranhybridisierungen*

Bei den Membranhybridisierungen lagen 16S rDNS-Moleküle denaturiert und frei zugänglich zur Hybridbildung mit den getesteten Sonden vor. Die Hybridbildung war damit nur von der Komplementarität von Sonden- und Zielsequenz abhängig. Der Einfluß, den bei Ganzzellhybridisierung die Zugänglichkeit der Zellhülle und die Sekundärstruktur der ribosomalen RNS bzw. in den Ribosomen gebundene Proteine auf die erfolgreiche Hybridbildung haben, konnte daher ausgeschlossen werden. Die erhaltenen Hybridisierungsergebnisse sind allein von der Entsprechung von Sonden- und Zielsequenz abhängig. Es zeigte sich erneut, daß einzelne nichtgepaarte Basen innerhalb des potentiellen Hybrids ausreichen können, um eine Diskriminierung zu erreichen (Manz *et al.*, 1996). Daß eine einzelne, randständige AC-Fehlpaarung eine Hybridbildung nicht verhindern konnte, ist ebenfalls im Einklang mit früheren Ergebnissen (Neef *et al.*, 1996) und nicht weiter verwunderlich, wenn man bedenkt, daß immer noch ein vollständig kanonisch gepaartes Hybrid mit einer Länge von 17 Basen bestand.

4.2.1.2 *Ganzzellhybridisierungen*

Die durch die Membranhybridisierungen erhaltenen Bedingungen, die dort für eine Unterscheidung von Ziel- (also solchen mit vollständig komplementärer Zielregion) und

Nichtzielorganismen (mit nicht vollständig komplementärer Zielregion) ausreichend waren, wurden auf ihre Eignung für die Ganzzellhybridisierung geprüft. Dabei war zu beachten, daß zum einen DNS-DNS-Hybride, wie sie bei der Membranhybridisierung vorkommen, weniger stabil sind als die RNS-DNS-Hybride bei der Ganzzellhybridisierung (Wahl *et al.*, 1987), was eine Erhöhung der Stringenz erfordern würde. Zum anderen gibt es aber Befunde, daß für ein und dieselbe Sonde bei *in situ*-Hybridisierungen eine niedrigere Stringenz bei gleichbleibender Spezifität ausreichend war (Manz *et al.*, 1992; Neef, 1997). Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, konnten für drei der vier getesteten Sonden, mit Ausnahme der Sonde CYA361, spezifische, in der Intensität mit der Sonde EUB338 vergleichbare Signale erhalten werden. Die in den Membranhybridisierungen bestimmten Stringenzen für die Diskriminierung von Nichtzielorganismen waren somit auf Ganzzellhybridisierungen übertragbar.

Die Sonde CYA361 zeigte bei Ganzzellhybridisierungen nur sehr schwache oder überhaupt keine Signale. Probleme mit der Zugängigkeit der Zellhüllen bzw. ein zu niedriges Niveau an Zielmolekülen konnten ausgeschlossen werden, weil die Sonde EUB338 – detektiert entweder nichtfluoreszierend oder über Tyramid-Signal-Amplifikation – mit den gleichen Organismen durchweg gute Signale lieferte. Ebenfalls nicht in Frage kamen, aufgrund der Ergebnisse der Membranhybridisierungen, eine falsche Sondensequenz, eine unzureichende Markierung der Sonde oder falsche Hybridisierungsbedingungen. So bleibt als Erklärung für schlechte Anwendbarkeit der Sonde CYA361 nur die Unzugänglichkeit der Sondenbindungsstelle *in situ*, die entweder durch die Sekundärstruktur der ribosomalen RNS oder durch Wechselwirkungen der RNS mit ribosomalen Proteinen bedingt sein kann (Amann *et al.*, 1995). Eine systematische Untersuchung der *in situ*-Zugänglichkeit der 16S rRNS von *E. coli* wurde mittlerweile von Fuchs *et al.* (1998) durchgeführt, in der die gesamte 16S rRNS mit Hilfe überlappender Oligonukleotidsonden abgedeckt wurde. Die erhaltenen Hybridisierungssignale wurden in sechs verschiedene Intensitätsklassen eingeteilt und so die einzelnen Regionen der 16S rRNS hinsichtlich ihrer Zugänglichkeit kartiert. Die niedrigere Signalstärke bei der Sonde CYA361 wäre dahingehend in Übereinstimmung mit einer bei *E. coli* ebenfalls eingeschränkten Zugänglichkeit der um ein Nukleotid verschobenen Sondenbindungsregion (Position 360), an der die Signalstärke der entsprechenden Sonde bei *E. coli* um 23% gegenüber der Signalstärke bei EUB338 abfiel. Die Beobachtung bei *E. coli* deckt sich ebenfalls mit der Signalstärke der Sonde CYA762. Die um ein Nukleotid verschobene Region (Position 763) bei *E. coli* liegt bezüglich ihrer Signalstärke 19% höher als die von EUB338. Bei den untersuchten Cyanobakterien war die Signalstärke mit der Sonde CYA762 durchwegs etwas besser als mit

der Sonde EUB338. Keine Übereinstimmungen ergaben sich bei den Sonden CYA664 und CIV/V1342. Beide hatten in etwa gleiche Signalstärken wie die Sonde EUB338, wohingegen die entsprechenden Sondenbindungsregionen (Positionen 665 bzw. 1338 und 1346) bei *E. coli* sehr schwer bzw. gar nicht zugänglich waren. Daß *E. coli* bezüglich der Unzugänglichkeit der Helices 23a und 24a, an die die Sonde CYA664 bindet, aber eher die Ausnahme bildet, zeigen Veröffentlichungen zu Ganzzellhybridisierungen anderer Bakterien, bei denen ebenfalls gegen diese Region gerichtete Sonden eingesetzt wurden (Amann *et al.*, 1991; Schleifer *et al.*, 1992; Spring *et al.*, 1992; Polz *et al.*, 1994; Amann *et al.*, 1996; Neef, 1997; Snaird, 1997; Snaird *et al.*, 1997). Auch für den nach Fuchs *et al.* (1998) bei *E. coli* unzugänglichen Bereich um Helix 48 (Bindungsregion der Sonde CIV/V1342) gibt es Beispiele erfolgreicher Ganzzellhybridisierungen (Erhart, 1997; Neef, 1997).

Ein Nachweis der nach der Hybridisierung gebundenen Sonden erfolgte entweder nichtfluoreszierend oder, wenn diese Methode nicht sensitiv genug war, mit TSA. Wie schon bei der Membranhybridisierung war es nicht möglich, eine einzelne, randständige Fehlpaarung zu diskriminieren. Einzelne, interne Fehlpaarungen konnten dagegen weitestgehend diskriminiert werden (Abbildung 3.9). Eine vollständige Diskriminierung war stets mit dem nichtfluoreszierenden Nachweis möglich, während es bei TSA in manchen Fällen zu einem Signal von Nichtzielzellen kam, das aber deutlich schwächer ausfiel als bei einem vollständig gepaarten Hybrid beim gleichen Organismus. So war z. B. bei *Synechocystis* sp. PCC 6803 trotz einer internen, destabilisierenden AC-Fehlpaarung anstelle einer GC-Paarung mit TSA eine schwache Bindung der Sonde CYA762 zu detektieren, bei *Pleurocapsa* sp. PCC 7516 unter den gleichen Voraussetzungen dagegen nicht. Mit der Sonde CIV/V1342 war mit einer Ausnahme (*Leptolyngbya* sp. PCC 7376) eine AC-Fehlpaarung gegenüber einer AU-Paarung zu diskriminieren. Bei der Sonde CYA664 kam es bei TSA wegen einer wenig destabilisierenden UG-Fehlpaarung (Stahl und Amann, 1991) zu einem schwachen Signal bei entsprechenden Nichtzielorganismen. Diese Probleme sind vermutlich auf die hohe Sensitivität des TSA-Nachweises zurückzuführen. Eine geringe Anzahl an unspezifisch gebundenen Sondenmolekülen, die für einen nichtfluoreszierenden Nachweis nicht ausreichend ist, wird durch die Tyramid-Signal-Amplifikation bereits detektierbar. Mit einem nichtfluoreszierenden Substrat scheint dementsprechend auch die Diskriminierung bei einzelnen Fehlpaarungen einfacher zu gelingen als bei fluoreszenzmarkierten Sonden, bei denen oft nicht- oder mit anderen Fluorochromen markierte Kompetitorsonden eingesetzt werden müssen (Manz *et al.*, 1992; Meier, 1997; Neef, 1997), um eine Unterscheidung zu erreichen. Versuche mit

unmarkierten Kompetitoroligonukleotiden in Kombination mit Meerrettichperoxidase-markierten Sonden und TSA zur Diskriminierung einzelner Fehlpaarungen beim Nachweis von tmRNS (Lee *et al.*, 1978; Williams und Bartel, 1996) in ganzen Zellen waren dagegen nicht erfolgreich (W. Schönhuber und S. Kulakauskas, unveröffentlichte Daten). Bei der Konstruktion von Sonden, die enzymmarkiert angewendet und mit TSA nachgewiesen werden sollen, sollte demnach von vornherein bedacht werden, daß mindestens zwei Fehlpaarungen notwendig sind, um Unspezifitäten auszuschließen, bzw. daß Gruppen, die sich nur um eine Base innerhalb der Sondenbindungsregion unterscheiden, zusammen nachgewiesen werden könnten, sich aber evtl. durch Vergleich der Hybridisierung mit einer vollständig komplementären Sonde aufgrund der unterschiedlichen Signalstärke unterscheiden lassen.

4.2.2 Cyanobakterien in Umweltproben

Durch Hybridisierung mit enzymmarkierten Sonden und anschließendem nichtfluoreszierenden Nachweis gelang es erstmals, symbiontisch lebende Cyanobakterien *in situ* mit rRNS-gerichteten Sonden zu identifizieren (Zarda, 1994; Schönhuber, 1995). In dieser Arbeit konnten jetzt auch freilebende Vertreter der Cyanobakterien *in situ* detektiert werden. Bei Wasserproben aus dem IJsselmeer waren Vertreter von *Microcystis* sp. und *Aphanizomenon* sp. mit der gleichen Methode spezifisch zu hybridisieren (W. Schönhuber, unveröffentlicht). *In situ*-Hybridisierungen an Schnitten einer Biomatte aus einem hochalpinen See zeigten mit den Sonden CYA762 und CYA664, entsprechend ihrer breiten bzw. engeren theoretischen Spezifität, für die Sonde CYA762 eine Vielzahl angefärbter Zellen unterschiedlicher Morphologie, während mit der Sonde CYA664 eine weitaus geringere Anzahl morphologisch relativ homologer Zellen detektiert wurde (Schönhuber *et al.*, 1999). Eine entscheidende Verbesserung der Auflösung des Nachweises gelang durch den Einsatz von TSA in Kombination mit einem Laser Scanning Mikroskop auf der Dokumentationsseite (Schönhuber *et al.*, 1999). Im Rahmen einer Diplomarbeit konnten Zellen von *Prochlorothrix hollandica* (Burger-Wiersma *et al.*, 1989) in Wasserproben aus niederländischen Seen mit spezifischen Sonden hybridisiert werden. Der niedrige Ribosomengehalt machte eine Detektion der sondenvermittelten Enzymaktivität über TSA notwendig (S. Eix, *persönliche Mitteilung*).

4.2.3 Ganzzellhybridisierungen von *Prochlorococcus marinus*

Prochlorococcus spp. (Chisholm *et al.*, 1992) sind die dominanten oxygenen, phototrophen Organismen in tropischen und subtropischen Regionen der Weltmeere (Chisholm *et al.*, 1988;

Olson *et al.*, 1990; Campbell und Vault, 1993) und tragen entscheidend zur photosynthetisch aktiven Biomasse und zur Primärproduktion bei (Chisholm *et al.*, 1988; Campbell und Vault, 1993; Goericke und Welschmeyer, 1993; Vault *et al.*, 1995). Zwei zunächst aufgrund ihrer unterschiedlich hohen Autofluoreszenz gefundene Populationen (Campbell und Vault, 1993; Partensky *et al.*, 1996) konnten aufgrund ihrer 16S rRNS-Sequenzen in eine Hochlicht- und eine Niedriglicht-adaptierte Gruppe eingeteilt werden, (Moore *et al.*, 1998; Urbach *et al.*, 1998; Abbildung 3.11).

Der für die Untersuchung zur Verfügung stehende Stamm PCC 9511 (Rippka *et al.*, 1997; R. Rippka, *persönliche Mitteilung*) konnte anhand seiner 16S rRNS-Sequenz als Mitglied der Hochlicht-adaptierten Linie bestimmt werden (Abbildung 3). Dies war überraschend, weil die axenische Kultur PCC 9511 aus der vermeintlich selben SARG-Kultur isoliert worden war wie der Typstamm *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 (Chisholm *et al.*, 1992; R. Rippka, *persönliche Mitteilung*). Die ursprüngliche SARG-Kultur wurde aus einer Tiefe von 120 m aus der Sargassosee isoliert (Chisholm *et al.*, 1992) und entsprechend fiel die 16S rRNS-Sequenz von *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 nach vergleichender Analyse nicht in die Linie der Hochlicht-adaptierten Stämme (Moore *et al.*, 1998; Urbach *et al.*, 1998; diese Arbeit). Bei *Prochlorococcus marinus* PCC 9511 wird dagegen die 16S rRNS-Sequenzübereinstimmung mit den Hochlicht-adaptierten Stämmen auch durch die Form der Thylakoide, den Chlorophyll *b*₂-Gehalt und das Fehlen eines Phycoerythrins (Hess *et al.*, 1996) bestätigt (R. Rippka, *persönliche Mitteilung*). Der Typstamm CCMP 1375 stand in Form der Kultur SS120 zur Verfügung (Urbach *et al.*, 1998; N. West, *persönliche Mitteilung*), so daß je ein Vertreter der Hochlicht- bzw. Niedriglicht-adaptierten *Prochlorococcus*-Stämme auf ihre Hybridisierbarkeit untersucht werden konnte.

Beiden Vertretern war eine in etwa gleich hohe Autofluoreszenz zu eigen, was zeigte, daß eine Einteilung in Hochlicht- und Niedriglicht-adaptierte Stämme basierend auf der Stärke der Autofluoreszenz schwierig sein kann. Für Vertreter beider Linien war in Kultur gezeigt worden, daß sich die Pigmentzusammensetzung mit der Lichtintensität verändern kann (Partensky *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1995) und in Feldstudien konnte eine Zunahme der Autofluoreszenz auch innerhalb der beiden getrennten *Prochlorococcus*-Populationen mit der Tiefe, also bei abnehmender Lichtintensität, gezeigt werden (Campbell und Vault, 1993; Partensky *et al.*, 1996). Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Sonden waren wegen der Autofluoreszenz bei den untersuchten Kulturen nicht möglich. Neue Untersuchungen von

Worden und Mitarbeitern (1998) zeigten ebenfalls Probleme der Detektion von *Prochlorococcus* sp. mit fluoreszenzmarkierten Sonden auf. Als Alternative sind in dieser Arbeitsgruppe Peptidnukleinsäuren als Ersatz für Oligonukleotide in Entwicklung (Worden *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde ein spezifischer Nachweis der beiden untersuchten *Prochlorococcus*-Stämme (PCC 9511 und SS120) durch die Kombination von Meerrettichperoxidase-markierten Sonden und der Signalverstärkung mittels TSA erreicht. Unterschiede in den Hybridisierungsergebnissen mit der Sonde PS1439 lieferten erste Hinweise auf eine mögliche Diskriminierbarkeit zweier *Prochlorococcus*-Stämme aufgrund der 16S rRNS. Während bei der Kultur PCC 9511 fast alle Zellen durch die Sonde PS1439 angefärbt werden konnten, war bei der Kultur SS120 nur ein Teil der Zellen detektierbar, obwohl durch Hybridisierung mit der Sonde CYA664 gezeigt worden war, daß fast alle Zellen in beiden Kulturen zugänglich für enzymmarkierte Sonden waren. Nun gibt es drei Möglichkeiten zur Erklärung dieser Ergebnisse:

1. Die vereinzelt Signale bei der Kultur SS120 waren wegen zu niedriger Stringenz unspezifisch, was bedeuten würde, an der Sondenbindungsstelle liegt ein Unterschied der beiden Stämme vor. Gegen eine unspezifische Bindung spricht allerdings die Signalstärke, die mit der Sonde PS1439 im Vergleich zu der Sonde CYA664 erreicht wurde. In Kapitel 3.2.3.3 konnte demonstriert werden, daß selbst bei einzelnen Fehlpaarungen innerhalb des Hybrids die Signalstärke gegenüber einem vollständig gepaartem Hybrid abnimmt. Dies war hier nicht der Fall.
2. Die Kultur SS120 ist keine Reinkultur, sondern enthält auch andere Bakterien (Chisholm *et al.*, 1992). Nur die von der Sonde PS1439 erfaßten Zellen können als *Prochlorococcus* sp. bezeichnet werden, die von der Sonde CYA664 erfaßten Zellen schließen auch andere Bakterien ein. Allerdings ist die theoretische Spezifität der Sonde CYA664 auf Cyanobakterien und Chloroplastensequenzen beschränkt, zu allen anderen bekannten Bakterien weist sie mindestens zwei Fehlpaarungen auf. Daß zwei Fehlpaarungen bei der Hybridisierung diskriminiert würden, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Zusätzlich entsprach der Anteil autofluoreszierender Zellen in der Kultur SS120 in etwa dem Anteil der mit der Sonde CYA664 detektierbaren Zellen. Beides spricht dafür, daß mit der Sonde CYA664 tatsächlich die *Prochlorococcus*-Zellen in der Kultur angefärbt wurden.

3. Die Diskrepanz zwischen den Hybridisierungsergebnissen der beiden Sonden rührt von unterschiedlichen *Prochlorococcus*-Populationen in der Kultur SS120 her. Eine dieser Populationen wurde, wie *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, von der Sonde PS1439 erfaßt, die andere nicht. Diese Hypothese würde den eingangs erwähnten Befund stützen, daß offensichtlich aus ursprünglich einer Kultur zwei verschiedene Stämme isoliert werden konnten.

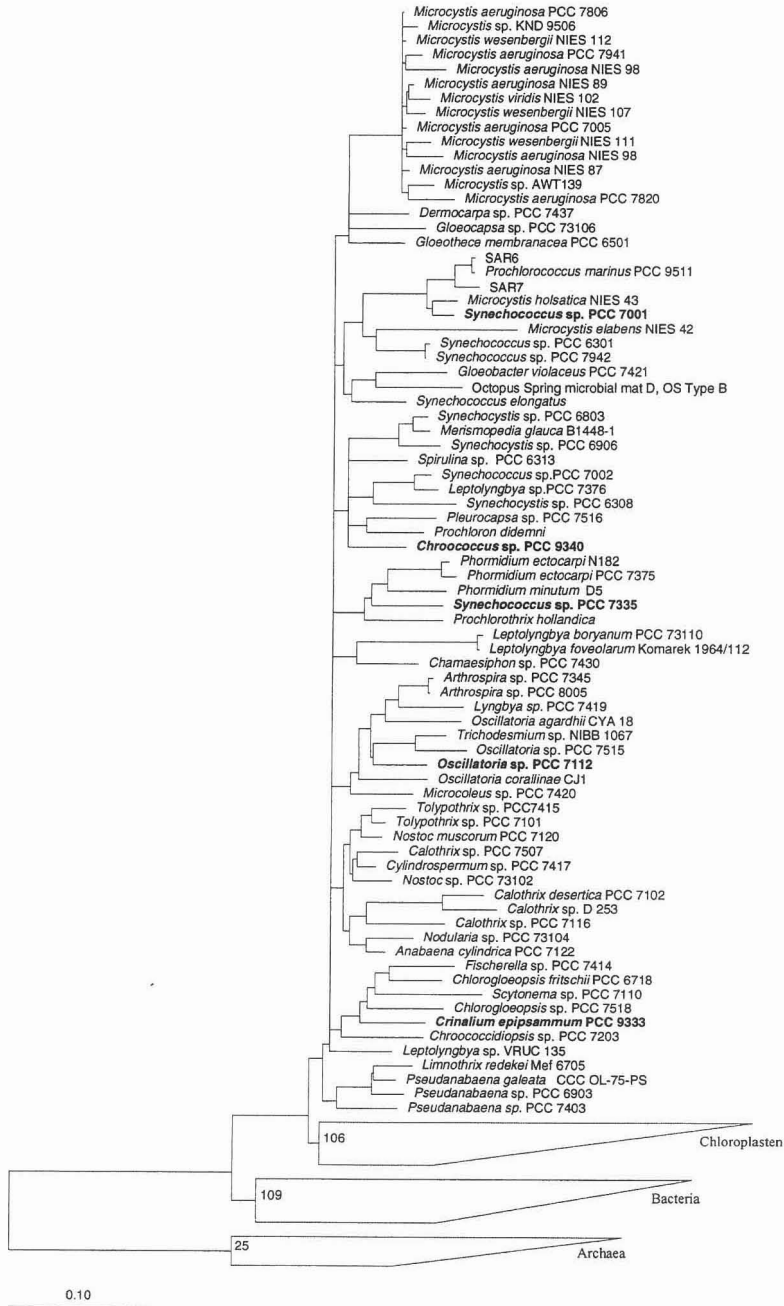
Sicher sind weitere Untersuchungen nötig, um die Zusammensetzung der verschiedenen *Prochlorococcus*-Kulturen vollständig aufzuklären, aber prinzipiell wurde gezeigt, daß über die *in situ*-Hybridisierung die Möglichkeit besteht, Cyanobakterienkulturen auf ihre Reinheit zu überprüfen bzw. die Isolierung neuer Stämme von der Sammlung am Standort bis zum Erhalt der Reinkultur überwachend zu begleiten.

Noch stehen Versuche mit Umweltproben aus. Sollten sich aber die Detektier- und Diskriminierbarkeit von *Prochlorococcus* spp. auf Zellen, die an ihrem natürlichen Standort fixiert wurden, übertragen lassen, wäre erstmals eine direkte Aufklärung der Populationszusammensetzung Hoch- und Niedriglicht-adaptierter Stämme in greifbare Nähe gerückt. Eine sondenvermittelte Detektion wäre auch für den Nachweis von *Prochlorococcus marinus* in oberflächennahen Wasserschichten erstrebenswert, weil dort aufgrund des niedrigen Pigmentgehalts die bisher übliche, indirekte Detektion anhand von Autofluoreszenz und Streulicht erschwert bzw. verhindert wird (Partensky *et al.*, 1996; Zubkow *et al.*, 1998).

4.3 Vergleichende 16S rRNS-Sequenzanalyse von Cyanobakterien

Von fünf Stämmen aus der Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria wurde in dieser Arbeit die Sequenz des 16S rRNS-Gens bestimmt. Mittels computergestützter Sequenzanalyse wurden ihre Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gruppe der Cyanobakterien untersucht und phylogenetische Stammbäume rekonstruiert. Eine erste Einordnung der Stämme zeigt Abbildung 4.3 in der Übersicht.

Abbildung 4.3: Phylogenetischer Stammbaum von Cyanobakterien basierend auf 16S rRNS-Sequenzen. Zugrunde liegt der Stammbaum aus Abbildung 3.8, die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen wurden mit ARB Parsimony in diesem Baum eingerechnet. Der Balken entspricht 10% errechnetem Sequenzunterschied.



4.3.1 *Synechococcus* spp.

Die Gattung *Synechococcus* (Waterbury und Rippka, 1989) ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein provisorisches Taxon innerhalb der Ordnung Chroococcales (Waterbury und Rippka, 1989) bzw. der Sektion I (Rippka *et al.*, 1979; Rippka und Herdman, 1992), das später in mehrere Gattungen einschließlich der Gattung *Synechococcus* zerfallen wird. Nach der Definition umfaßt die „Übergattung“ („super genus“) oder *Synechococcus*-„Gruppe“ einzellige, kokkoide bis stäbchenförmige, nicht mehr als 3 µm große Cyanobakterien ohne strukturierte Hüllen, die sich durch Zellteilung in einer Ebene und Anwesenheit von peripheren, konzentrischen Thylakoiden auszeichnen (Waterbury und Rippka, 1989). Sie ist aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften, Charakterisierung der Isolierungsorte der Stämme, G+C-Gehalt der DNS und An- oder Abwesenheit von Phycoerythrin in sechs sogenannte „Stammcluster“ („strain cluster“) eingeteilt, die als provisorische Gattungen gedacht sind (Waterbury und Rippka, 1989). Im Katalog der Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria sind dagegen nur fünf Cluster (1-5) aufgeführt (Rippka und Herdman, 1992).

Entsprechend ihrer Eigenschaften werden die beiden sequenzierten *Synechococcus*-Stämme dem *Cyanobium*-Cluster bzw. Cluster 5 (PCC 7001) und dem marinen Cluster C bzw. Cluster 3 (PCC 7335) zugerechnet. Die vergleichende 16S rRNS-Analyse von *Synechococcus* sp. PCC 7001 erbrachte eine mehr oder weniger stabile Einordnung in eine Entwicklungslinie mit dem anderen bereits sequenzierten Vertreter des *Cyanobium*-Clusters (Cluster 5), *Synechococcus* sp. PCC 6307 (vorgeschlagen als Typstamm für *Cyanobium gracile* (Rippka und Herdman, 1992) und somit namengebend für die zu schaffende Gattung) aus der Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria. Die ebenfalls in diese Linie fallende Sequenz von *Microcystis* sp. NIES 43 dürfte Resultat einer falschen Identifizierung des Organismus sein, nachdem Vertreter von *Microcystis* spp. in einem anderen Teil des Baumes eine monophyletische Gruppe bilden (Turner, 1997; M. Herdman, *persönliche Mitteilung*). *Synechococcus* sp. PCC 7335 dagegen fällt in eine Linie mit in den Datenbanken als *Phormidium* sp. N182 und *Phormidium* sp. D5 bezeichneten Cyanobakterien. Die Klassifizierung dieser Stämme erfolgte entsprechend der botanischen Literatur nach rein phänotypischen Merkmalen. Beide können nach Rippka und Herdman (1992) der *Leptolyngbya*-Gruppe zugeordnet werden (M. Herdman und R. Rippka, *persönliche Mitteilung*). Diese *Leptolyngbya*-Gruppe wiederum steht innerhalb der Sektion III (Rippka und Herdman, 1992), so daß Organismen aus den verschiedenen Sektionen einander näher verwandt sind als die Vertreter der *Synechococcus*-Gruppe untereinander. Die Stellung von *Synechococcus* sp. PCC 7335 relativ zu *Synechococcus* sp. PCC 7002, der auch zum Cluster 3

gerechnet wird, läßt ebenfalls fraglich erscheinen, ob Organismen aus dem Cluster 3 einer gemeinsamen Gattung zugeordnet werden können. Laut Ludwig und Mitarbeitern (1998) wäre eine Übereinstimmung von etwa 95% eine praktikable Grenze für die Beschreibung einer Gattung. Die Sequenzähnlichkeit zwischen beiden Organismen beträgt allerdings nur 89%. Letztendlich zeigt sich auch über die vergleichende 16S rRNS-Analyse die provisorische Stellung der *Synechococcus*-Gruppe. Während die 16S rRNS-Sequenzen die Zuordnung von *Synechococcus* sp. PCC 7001 zum Cluster 5 der *Synechococcus*-Gruppe und damit in die zu schaffende Gattung *Cyanobium* bestätigen, widerspricht der Stammbaum in Abbildung 4.4 der Etablierung einer Gattung für Cluster 3.

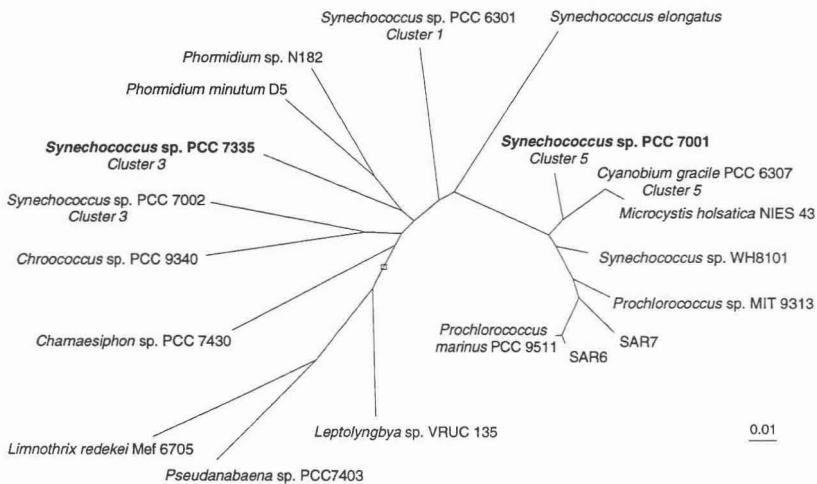


Abbildung 4.4: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNS-Sequenzdaten mit den verschiedenen *Synechococcus*-Stämmen. Bei den Stämmen aus der Pasteur Culture Collection (PCC) sind die Cluster angegeben, denen sie innerhalb der *Synechococcus*-Gruppe zugeordnet sind. Maximum-Likelihood-Baum, berechnet mit fast vollständigen Sequenzen. Der Balken entspricht 1% errechnetem Sequenzunterschied.

4.3.2 *Chroococcus* sp. PCC 9340

In der traditionellen botanischen Literatur waren *Chroococcus* und *Gloeocapsa* aufgrund der Beschaffenheit ihrer Hüllen getrennte Gattungen (Geitler, 1932). Wegen erheblicher Zweifel, ob dieses ein Merkmal für eine Unterscheidung auf Gattungsebene ausreichen könnte, wurde von Rippka und Mitarbeitern (1979) nur *Gloeocapsa* als eigene Gattung anerkannt. Waterbury und Rippka schufen 1989 die *Gloeocapsa*-Gruppe (analog zur *Synechococcus*-Gruppe), um *Gloeocapsa* (*sensu* Rippka *et al.*, 1979) mit den von Potts und Mitarbeitern (1983) beschriebenen, großzelligen *Chroococcus*-Isolaten zusammenfassen zu können. Die *Gloeocapsa*-Gruppe steht innerhalb der Ordnung Chroococcales (Waterbury und Rippka, 1989) bzw. Sektion I (Rippka *et al.*, 1979; Rippka und Herdman, 1992) und enthält Cyanobakterien, die sich in zwei oder drei rechtwinklig zueinander stehenden Ebenen teilen. Die daraus resultierenden, regelmäßigen Zellaggregate werden durch vielschichtige Hüllen zusammengehalten. Im Katalog der Pasteur Culture Collection wurde *Chroococcus* wieder als Gattung vorgeschlagen und ist mit fünf Vertretern aufgeführt, die sich außer aufgrund der Beschaffenheit der Hüllen auch durch die Größe von *Gloeocapsa* unterscheiden lassen (Rippka und Herdman, 1992). In phylogenetischen Bäumen, die auf den 16S rRNS-Sequenzdaten basieren, fallen die in dieser Arbeit sequenzierte *Chroococcus* sp. PCC 9340 und *Gloeocapsa* sp. PCC 73106, von der eine etwa 900 Basen lange Teilsequenz bekannt ist, in verschiedene Entwicklungslinien (Abbildung 4.5). Die 16S rRNS-Sequenzdaten unterstützen somit die Existenz zweier getrennter Gattungen *Chroococcus* und *Gloeocapsa*. Sowohl Organismen aus dem kürzlich beschriebenen „*Halotheca*“-Cluster (Garcia-Pichel *et al.*, 1998) als auch *Pleurocapsa* sp. PCC 7516 stehen *Chroococcus* sp. PCC 9340 näher als *Gloeocapsa* sp. PCC 73106. Allerdings sollte die vergleichende 16S rRNS-Analyse der anderen Vertreter der beiden Gattungen folgen, um sicherzustellen, daß die beiden vorgeschlagenen Gattungen tatsächlich auch auf 16S rRNS-Ebene ein einheitliches Bild ergeben und die Trennung erhalten bleibt.

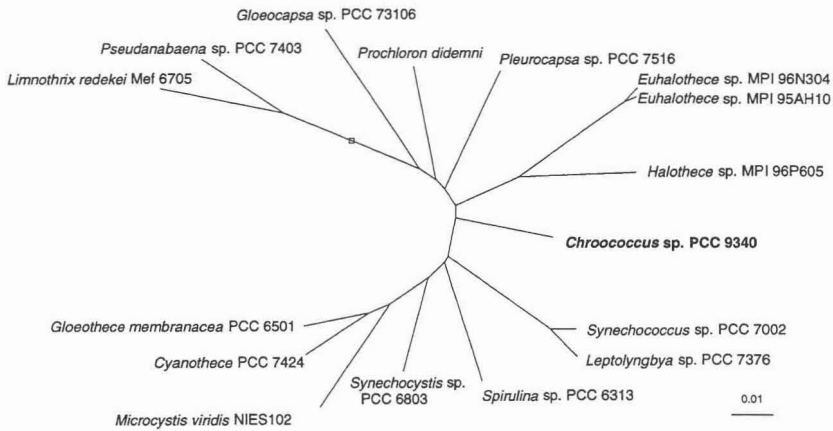


Abbildung 4.5: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNS-Sequenzdaten mit den zwei bisher sequenzierten Vertretern aus der *Gloeocapsa*-Gruppe. Maximum-Likelihood-Baum, berechnet mit fast vollständigen Sequenzen. Die Sequenz von *Gloeocapsa* sp. PCC 73106 wurde über ARB Parsimony eingerechnet. Der Balken entspricht 1% errechnetem Sequenzunterschied.

4.3.3 *Crinalium epipsammum* PCC 9333

Die Gattung *Crinalium* und die Gattung *Oscillatoria*, die weiter unten beschrieben wird, stehen innerhalb der Ordnung Oscillatoriales (Castenholz, 1989) bzw. der Sektion III (Rippka *et al.*, 1979), in der filamentöse Cyanobakterien zusammengefaßt werden, die sich ausschließlich in einer Ebene teilen und nur vegetative Zellen ohne Heterocysten (auf die Stickstofffixierung spezialisierte Zellen) und Akineten (Überdauerungsformen) bilden (Holt *et al.*, 1994).

Vertreter der Gattung *Crinalium* sind die einzigen filamentösen Cyanobakterien, deren Trichome einen elliptischen Querschnitt aufweisen. Ansonsten besitzen sie ähnliche Merkmale wie Vertreter der Gattung *Oscillatoria* (Holt *et al.*, 1994). Im Katalog der Pasteur Culture Collection ist der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Stamm PCC 9333 der einzige Vertreter der Gattung (Rippka und Herdman, 1992). Mittlerweile sind aber weitere Stämme der

Gattung *Crinalium* in Reinkultur gebracht worden (R. Rippka, *persönliche Mitteilung*). Eine Sequenzierung dieser Stämme sollte folgen. Damit könnte gezeigt werden, ob die Gruppierung in einer gemeinsamen Gattung aufgrund des einen morphologischen Unterschieds auch auf Ebene der 16S rRNS-Daten unterstützt wird.

Weitere Sequenzen könnten auch dabei helfen, eine stabile Einordnung der 16S rRNS-Sequenz von *Crinalium epipsammum* PCC 9333 zu erreichen. Mit den bisher zur Verfügung stehenden Daten war diese abhängig vom verwendeten Berechnungsverfahren, so daß letztendlich im Konsensusbaum (Ludwig *et al.*, 1998) vier Abstammungslinien auf einen gemeinsamen Ursprung gesetzt wurden (Abbildung 4.6). Eine Verwandtschaft mit *Chamaesiphon* sp. PCC 7430, der die höchste Sequenzübereinstimmung (91,4%) aufwies, erschien bei diesen Berechnungen gegeben. Wurden allerdings mehr Sequenzen für die Rekonstruktionen eingesetzt, verlor *Chamaesiphon* sp. PCC 7430 seine Position neben *Crinalium epipsammum* PCC 9333 (W. Schönhuber, unveröffentlichte Daten; Abbildung 4.3). Über die Schwierigkeit, *Chamaesiphon* sp. PCC 7430 in eine bestimmte Entwicklungslinie einzuordnen, war vorher schon diskutiert worden (W. Ludwig, *persönliche Mitteilung*; M. Herdman, *persönliche Mitteilung*). Eine nähere Verwandtschaft zur Gattung *Oscillatoria*, wie die Ähnlichkeit in verschiedenen phänotypischen Merkmalen nahelegt, wird durch die vergleichende 16S rRNS-Analyse allerdings nicht unterstützt.

4.3.4 *Oscillatoria* sp. PCC 7112

In der Gattung *Oscillatoria* werden filamentöse Cyanobakterien der Ordnung Oscillatoriales (siehe 4.3.3) zusammengefaßt, deren Einzelzellen breiter als lang, also scheibenförmig sind. Von der ähnlichen Gattung *Lynghya* unterscheiden sie sich durch Beweglichkeit und wenig ausgeprägte bzw. fehlende Hüllen (Rippka, 1988). Rippka und Herdman (1992) unterteilten die Gattung bzw. Gruppe in fünf Cluster, wobei der Stamm PCC 7112 zum Cluster 2 gezählt wurde. Bereits die Ergebnisse früherer Sequenzanalysen zeigten, daß die Gattung *Oscillatoria* nicht monophyletischen Ursprungs ist (Wilmotte, 1994; Turner, 1997). Auch hier besteht die Notwendigkeit, die *Oscillatoria*-Gruppe in verschiedene Gattungen aufzuteilen (Turner, 1997, M. Herdman, *persönliche Mitteilung*). Der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Stamm *Oscillatoria* sp. PCC 7112 (vorgeschlagen als Typstamm für die Art *Oscillatoria nigro-viridis* [Rippka und Herdman, 1992]) wies etwa 10% Sequenzunterschied zu allen anderen bekannten Sequenzen von *Oscillatoria*-Stämmen auf, die ihrerseits untereinander auch nie mehr als 90% ähnlich sind. Die Sequenz von *Oscillatoria* sp. PCC 7112 fiel in eine Abstammungslinie mit

Trichodesmium sp. NIBB 1067, *Arthrospira* sp. PCC 7345, *Arthrospira platensis* PCC 8005 und *Lyngbya* PCC 7419, die zu ihr Ähnlichkeiten von über 90% aufwiesen (Abbildung 4.6). Eine ebenfalls in diese Linie fallende Sequenz von *Oscillatoria agardhii* NIVA-CYA 18 (in der Pasteur Culture Collection als *Oscillatoria* sp. PCC 7821 bezeichnet und zum Cluster 5 gehörend [Rippka und Herdman, 1992]) hat eine größere phylogenetische Distanz als die vorgenannten Organismen. Noch weiter entfernt steht ein weiterer fast vollständig sequenzierter *Oscillatoria*-Stamm aus der Sammlung von Algenkulturen, Göttingen (SAG 8.92 CJ1), der mit *Microcoleus* sp. PCC 7420 und *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7203 in eine Entwicklungslinie fällt. Interessant wäre auch hier, mehrere Sequenzen von Organismen aus den einzelnen Clustern vergleichen zu können, um die Konstanz der Cluster bezüglich der 16S rRNS-Daten zu überprüfen.

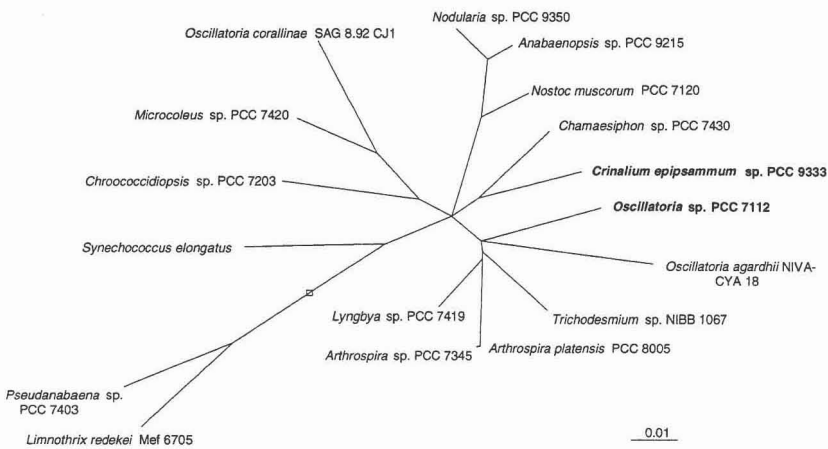


Abbildung 4.6: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNS-Sequenzdaten mit den beiden sequenzierten Stämmen aus der Sektion III. Konsensusbaum der drei verschiedenen Rekonstruktionsverfahren (siehe 2.6.2). Der Balken entspricht 1% errechnetem Sequenzunterschied.

4.3.5 Ausblick

Wie die vergleichende Sequenzanalyse der 16S rRNS bei Cyanobakterien auch in dieser Arbeit zeigte, läßt sich aufgrund der bisher vorgeschlagenen Klassifizierungsmerkmale für Cyanobakterien nicht unbedingt ein taxonomisches System verwirklichen, das mit der phylogenetischen Ähnlichkeit der Organismen einhergeht. Viele dieser Eigenschaften scheinen für eine Unterscheidung von Stämmen zwar nützlich, aber hinsichtlich einer Beschreibung von Gattungen hinfällig zu sein. Vielleicht sollte umgekehrt, ausgehend von der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S rRNS – in Ermangelung eines zum gegenwärtigen Zeitpunkt besser geeigneten und praktikableren phylogenetischen Markers –, versucht werden, weitere phänotypische bzw. genotypische Eigenschaften zu finden, die neben der Sequenzanalyse eine vollständige Beschreibung von Gattungen im Sinne des polyphasischen Ansatzes (Wayne *et al.*, 1987; Vandamme *et al.*, 1996) erlauben.

Eine erste Auswahl der zu untersuchenden Organismen könnte dabei mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode der *in situ*-Hybridisierung von Cyanobakterien erfolgen. Durch den unterschiedlichen Konservierungsgrad einzelner Basen bzw. Basenabschnitte innerhalb der Sequenz der 16S rRNS-Moleküle unterschiedlicher Organismen ist es möglich, Sonden zu entwickeln, die spezifisch für Gruppen verschiedener taxonomischer Ebenen sind (Amann *et al.*, 1995). Werden nach dem sogenannten multiplen Sondenkonzept (Ludwig *et al.*, 1997) diese Sonden nacheinander eingesetzt, sollte eine Identifizierung von der Domäne Bacteria bis hinunter auf Artebene möglich sein (Ludwig *et al.*, 1998). Ausgehend vom bestehenden Datensatz an 16S rRNS-Sequenzen von Cyanobakterien sollte es mit Hilfe neu konstruierter Sonden gelingen, erste Zuordnungen bereits vor der Sequenzierung zu erhalten, die sich dann im Sinne einer raschen Aufklärung der Diversität in den Stammsammlungen zunächst auf an den Sondenbindungsstellen abweichende, d. h. „neue“ Organismen beschränken könnte.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Einzelzellen von Cyanobakterien mittels 16S rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden identifiziert. Dabei waren wegen der starken Autofluoreszenz der Zellen, die eine Detektion mit direkt fluoreszenzmarkierten Sonden verhinderte, andere Methoden der Hybridisierung anzuwenden beziehungsweise zu entwickeln. Im Mittelpunkt standen dabei mit Meerrettichperoxidase markierte Sonden, die nach erfolgter Hybridisierung in einem weiteren Schritt in den hybridisierten Zellen detektiert werden konnten.

Diese Detektion erfolgte zum einen nichtfluoreszierend mit geeigneten chromogenen Substraten, die in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid als Cosubstrat innerhalb hybridisierter Zellen durch oxidative Polymerisierung einen Farbniederschlag bildeten und so positive Hybridisierungsergebnisse anzeigten. In einer zweiten Detektionsmethode wurde die Fähigkeit der Meerrettichperoxidase ausgenutzt, phenolische Reste zu radikalisieren: Tyramid, das mit einem Fluorochrom gekoppelt war, reagierte als Radikal innerhalb der Zellen mit elektronenreichen Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan und band so das Fluorochrom kovalent an die Zelle. Da nun jedes über die Sonde gebundene Molekül Meerrettichperoxidase mehrere Tyramide umsetzen konnte, kam es im Vergleich zu direkt fluoreszenzmarkierten Sonden zu einer Signalverstärkung. Durch digitale Mikroskopie und Durchflußzytometrie wurden Verstärkungsfaktoren zwischen zehnfach und etwa 80fach bestimmt.

Zunächst wurde die nichtfluoreszierende Identifizierungsmethode entwickelt und erfolgreich angewandt. Auch die Signalverstärkung der zweiten, auf Tyramid basierenden Methode reichte aus, die Signale eindeutig über die Autofluoreszenz der Cyanobakterien zu heben. Für einige Vertreter der Cyanobakterien war die Tyramid-Signal-Amplifikation sogar die einzige Möglichkeit des Nachweises gebundener Sonden, weil die Zahl der Ribosomen bzw. rRNS-Moleküle nicht ausreichte, um mit dem weniger sensitiven, nichtfluoreszierenden Nachweis ein Signal zu erhalten.

Mit Hilfe neuentwickelter, cyanobaktérienspezifischer Sonden wurden Fixierungsmethoden und Vorbehandlungen systematisch an zahlreichen Reinkulturen der Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria untersucht, um Aussagen über die Spezifitäten und Anwendbarkeit der Ganzzell- bzw. *in situ*-Hybridisierung für Cyanobakterien treffen zu können.

Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit von fünf Vertretern der Cyanobakterien die 16S rRNS-Sequenzen bestimmt und die Organismen vergleichend analysiert.

6 Anhang

16S rRNS Sequenzen

Chroococcus sp. PCC 9340

```

0      UGAUCAUGGC UCAGGAUGAA CGCUGGCGGU AUGCCUAAAC CAUGCAAGUC
50     GAACGGACUC UUCGGAGUUA GUGGCGGACG GGUGAGUAAC GCGUGAGAAU
100    CUGCCUUGAG GAUGGGGACA ACAGCGGGAA ACUCGUGCUA AUACCCAAUA
150    AGCUGAAAAG UGAAAGAUUU AUCGCCUGAA GAGGAGCUCG CGUCUGAUUA
200    GCUAGUUGGU GGAGUAAAAG UUUACCAAGG CGACGAUCAG UAGCUGGUCU
250    GAGAGGAUGA GCAGCCACAC UGGGACUGAG ACACGGCCCA GACUCCUACG
300    GGAGGCAGCA GUGGGGAUUU UUCGCAAUG GGCGAAGCC UGACGGAGCA
350    AUACCGCGUG AGGGAGGAAG GCUUUUGGU UGUAAACUC AAAACUUAGG
400    GAAGAAGAAA GUGACGGUAC CUAAUUAAG CAUCGGCUAA CUCCGUGCCA
450    GCAGCCCGCG UAAGACGGAG GAUGCAAGCG UUAUCCGGAA UUAUUUGGCG
500    UAAAGCGUCC GCAGGUGGCU UUUCAAGUC GAAGUCAAG ACUGGAGCUU
550    AACUCCAGGA AGGCAGUGGA AACUGAGGAG CUAGAGUUCG GUAGGGUAG
600    AGGGAAUUCG CAGUGUAGCG GUGAAAUGCG UAGAGAUUGG GAAGAACACC
650    AGUGGCGAAG GCGCUCUACU GGGCCGAAAC UGACACUCAG GGACGAAAGC
700    UAGGGGAGCG AAAGGAUUA GAUACCCUCG UAGUCCUAGC UGUAAACGAU
750    GGAUACUAGG CGUAGCUUGU AUCGACCCGA GCUUGCCGA AGCAAACGCG
800    UUAAGUAUCC CGCCUGGGGA GUACGCACGC AAGUGUGAAA CUCAAAGGAA
850    UUGACGGGGG CCCGCACAAG CGGUGGAGUA UGUGGUUUAU UUCGAUGCAA
900    CGCGAAGAAC CUUACCAGGG CUUGACAUUC GGCGAUUCUG CUUGAAAGAG
950    GAGAGUGCCC AUUGGGAGCG CCGUACAGG UGGUGCAUGG CUGUCGUCAG
1000   CUCGUGUCGU GAGAUGUUGG GUUAAGUCCC GCAACGAGCG CAACCCUCGU
1050   CCUUAAGUUC CAUCAUUAAG UUGGGAAACU UAGGGAGACU CCGCGUGACA
1100   AACCGGAGGA AGGUGGGGAU GACGUCAAAG CAGCAUGCCC CUUACGUUCU
1150   GGGCUACACA CGUACUACAA UGGUAGGGAC AAAGGGCAGC AAACUCGAGA
1200   GGGUAAAGCA AUCCCAUCA ACCCAGCCUC AGUUCAGAUU GCAGGCUGCA
1250   ACUCGCCUGC AUGAAGGAGG AAUCGCUAGU AAUCGCAGGU CAGCAUACUG
1300   CGGUAAAUUC GUUCCCGGGC CUUGUACACA CCGCCGUCU CACCAUGGAA
1350   GCUGACCAUG CCCGAAGUCG UUAUCCUAA CCGAAGGAGG GGGUAGCCGA
1400   AGGCAGGGUU AGUGACUGGG GUGAAGUCGU AACA

```

Crinalium epiammum PCC 9333

```

0      UGAUCAUGGC UCAGGAUGAA CGCUGGCGGU CUGCUUAAAC CAUGCAAGUC
50     GAACGGRUGU AGCAAUACAU UAGUGGCGGA CGGGUGAGUA ACGCGUGAGA
100    AUCUGGCCUUU AGGUUCCGGA CAACCACUGG AAACGGUGGC UAAUACCGGA
150    UGUGCCGAAA GGUAAAAGGU UUAACCGCUG AAGAUGAGCU CGCGUCUGAU
200    UAGCUAGUUG GUGUGGUAAG AGCGACCAA GGCACGAUC AGUAGCUGGU
250    CUGAGAGGAU GAUCAGCCAC ACUGGGACUG AGACACGGCC CAGACUCCUA
300    CGGGAGGCAG CAGUGGGGAA UUUUCCGCAA UGGCGAAAAG CCUGACGGAG
350    CAAGACCCG UGAGGGAGGA AGGCUCUUGG GUCGUAACCC UCUIUUCUCU
400    GGGAAUAAGA AAGUGAAGGU ACCAGAGGAA UCAGCAUCGG CUAACUCCGU
450    GCCAGCAGCC GCGGUAAUAC GGAGGAUGCA AGCGUUAUCC GGAUUGAUUG
500    GGCGUAAAAG GUCCGUAGGU GGUGAUUCA GUCGAUUGUU AAAGAGCGGG
550    GCUUAACCCC GUAGAAGCAG UGGAACUGA AUUACUAGAG AGAGGUAGGG
600    GUAGAGGGAA UUCCCGGUGU AGCGGUGAAA UGCGUAGAGA UCGGGAAGAA
650    CACCAGUGGC GAAAGCGCUC UACUGGACCU CAUCUGACAC UGAGGGACGA
700    AAGCUAGGGG AGCGAAAAGG AUUAGAUACC CCUGUAGUCC UAGCCGUAAA
750    CGAUGGAUAC UAGGUGUUGU CUGUAUCGAC CCGACAGUG CCGUAGCUAA

```

6 Anhang

| | | | | | |
|------|-------------|------------|------------|------------|-------------|
| 800 | CGCGUUAAGU | AUCCCGCCUG | GGGAGUACGC | ACGCAAGUGU | GAAACUCAAA |
| 850 | GGAAUUGACG | GGGGCCCGCA | CAAGCGGUGG | AGUAUUGUGU | UUAUUUCGAU |
| 900 | GCAACGCGAA | CAACCUUACC | AGGGCUUGAC | AUGUCUGGAA | UCUUCGUGAA |
| 950 | AGCGAGGAGU | GCCUUCGGGA | ACCAGAACAC | AGGUGGUGCA | UGGCUUCUGU |
| 1000 | CAGCUCGUGU | CGUGAGAUGU | UGGGUUAAGU | CCCGCAACGA | GCGCAACCCU |
| 1050 | CGUCCUAAAGU | UGCCAGCAUU | AAGUUGGGCA | CUCUGAGGAG | ACUGCCGGUG |
| 1100 | ACAAACCGGA | GGAAGGUGGG | GAUGACGUCA | AGUCAGCAUG | CCCCUUACGU |
| 1150 | CCUGGGCUAC | ACACGUACUA | CAAUGCUACG | GACAAAGGGC | AGCCAACCCAG |
| 1200 | CGAUGGUGAG | CAAAUCCEAU | AAACCGUGGC | UCAGUUCAGA | UUGCAGGCUG |
| 1250 | CAACUCGCCU | GCAUGAAGGU | GGAAUCGCUA | GUAAUCGCCG | GUCACCAUAC |
| 1300 | GGCGGUGAAU | UCGUUCCEGG | GCCUUGUACA | CACCCGCCGU | CACACCAUGG |
| 1350 | GAGCUGGUCA | UGCCCGAAGU | CGUUACCEUA | ACCUGUAAAG | GAGGGGGAUG |
| 1400 | CCGAAGGCAG | GGCUGGUGAC | UGGGGUGAAG | UCGUAAACAG | GUA |

Osillatoria sp. PCC 7112

| | | | | | |
|------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 0 | UGAUC AUGGC | UCAGGAUGAA | CGCUGGCGGU | CUGC UUAACA | CAUGCAAGUC |
| 50 | GAACGGAGUA | GAAAUACUUA | GUGGCGGACG | GGUGAGUAA | GCGUGAGAAU |
| 100 | CUGCCUUCAG | GACGGAGACA | ACAGUUGGAA | ACGACUCUA | AGCCCGAUG |
| 150 | AACCGAAAGG | GAAAAUUAUU | AUAGCCUGAA | GAUGAGCUCG | CGUCCGAUUA |
| 200 | CGUAGUUGGC | GGAGUAAAAG | CCCACCAAGG | CGACGAUCGG | UAGCUGGUUCU |
| 250 | GAGAGGACGA | UCAGCCACAC | UGGGACUGAG | ACACGGCCCA | GACUCCUACG |
| 300 | GAGGGCAGCA | GUGGGGAAUU | UUCCGCAAU | GGCGAAAGCC | UGACGGAGCA |
| 350 | AGACCGCGUG | GGGGAAGAAG | GCUCUUGGGU | UGUAAAACCC | UUUUCUCUGG |
| 400 | GAAGAAAGUU | GUGAAAGCAA | CCUGACGGUA | CCAGAGGAAU | CAGCAUCGGC |
| 450 | UAACUCCGUG | CCAGCAGCCG | CGGUAAGACG | GAGGAUGCAA | GCGUUAUCCG |
| 500 | GAAUGAUUGG | GCGUAAAAGCG | UCCGCAGGUG | GCAGUUCAG | UCUGCUGUCA |
| 550 | AAGACCGGGG | CUUAACUUCG | GAAAGGCAGU | GGAAACUGAA | CAGCUAGAGU |
| 600 | AUGGUAGGGG | CAGAAGGAAU | UCCUGGUGUA | GCGGUGAAAU | GCCUAGAGAU |
| 650 | CAGGAAGAAC | AUCGGUGGCG | AAGGCGCUCU | GCUGGACCAU | ACUGCACUCA |
| 700 | GGGACGAAAG | CUAGGGGAGC | GAAUUGGAAU | AGAUACCCCA | GUAGUCCUAG |
| 750 | CCGUAAACGA | UGGAUACUAG | GUGUUGUCUG | UAUCGACCCG | GACAGUGCCG |
| 800 | UAGCUAACGC | GUUAAGUAUC | CCGCCUGGGG | AGUACGCACG | CAAGUGUGAA |
| 850 | ACUCAAGGA | AUUGACGGGG | GCCCGCACAA | GCGGUGGAGU | AUGUGGUUUA |
| 900 | AUUCGAUGCA | ACGCGAAGAA | CCUUAACCAG | ACUUGACAUG | UCGCGAAUCU |
| 950 | UCUGGAAACA | GAGGAGUGCC | UUCGGGAGCG | CGAACACAGG | UGGUAGCUGG |
| 1000 | CUGUCGUCAG | CUCGUGUCGU | GAGAUGUUGG | GUUAAGUCC | GCAACGAGCG |
| 1050 | CAACCCUCGU | GUUUAGUUGC | CAUCAUUAAG | UUGGGCACUC | UAAACAGACU |
| 1100 | GCCGGUGACA | AACCGGAGGA | AGGUGGGGAA | GACGUCAAGU | CAGCAUGCCC |
| 1150 | CUUACGUUCU | GGGCUACACA | CGUACUACAA | UGGUAGGGAC | AGAGGGCAGC |
| 1200 | CAACCCGCGA | GGGCGAGCUA | AUCCGUAAA | CCCUGCCUCA | GUUCAGAUUG |
| 1250 | CAGGCUGCAA | CUCGCCUGCA | UGAAGGCGGA | AUCGCUAGUA | AUCGCAGGUC |
| 1300 | AGCAUACUGC | GGUGAAUCCG | UUCCCGGGCC | UUGUACACAC | CGCCCGUCAC |
| 1350 | ACCAUGGAAG | UUGGCCACGC | CCGAAGUCAU | UACUCUAAAC | UUUCGAGGAG |
| 1400 | GAGGAUGCCG | AAGGCAGGGC | UGAUGACUGG | GGUGAAGUCG | UAACAGG |

Synechococcus sp. PCC 7001

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | UAGAGUUUGA | UCAUGGCUCA | GGAUGAACGC | UGGCGGCGUG | CUUAACACAU |
| 50 | GCAAGUCGAA | CGCACCUUCG | GGUGAGUGGC | GGACGGGUGA | GUAAACGCGU |
| 100 | AGAAUCUGCC | CCAAGGAGGG | GGAAUACGGC | UGGAAACGGC | GCUAAUACC |
| 150 | CCAUUUGCCG | AGAGGUGAAA | CGAGUUAUCG | CCUUGGGAUG | AGCUCGCGUC |
| 200 | UGAUUAGCUA | GUUGGUGGGG | UAAGAGCCUA | CCAAGGCAUC | GAUCAGUAGC |
| 250 | UGGUCUGAGA | GGAUGAUCAG | CCACACUGGG | ACUGAGACAC | GGCCAGACU |
| 300 | CCUACGGGAG | GCAAGCAGUG | GGAAUUUUC | GCAAUGGGCG | AAAGCCUGAC |
| 350 | GGAGCAACGC | CBCGUGAGGG | AUGAAGGCCU | CUGGCCUGUA | AACCUUUTUU |

400 CUCAAGGAAG AAGAUCUGAC GGUACUUGAG GAAUAAGCCA CGGCUAAUUC
450 CGUGCCAGCA GCCGCGGUA UACGGGAGUG GCAAGCGUUA UCCGGAAUUA
500 UUGGGCGUAA AGCGUCCGCA GCGCGCCUUG AAAGUCUGUU GUUAAAGCGU
550 GGAGCUUAA UCCAUUUCAG CAAUGGAAAC UAGAAGGCUA GAGUGUGGUA
600 GGGGCAGAGG GAAUUCGCG UGUAGCGGUG AAAUGCGUAG AUUUCGGGAA
650 GAACACCAGU GCGGAAGGCG CUCUGCUGGG CCAUAACUGA CGCUCAUGGA
700 CGAAAGCCAG GGGAGCGAAA GGGAUUAGAU ACCCCUGUAG UCCUGGCCGU
750 AAACGAUGAA CACUAGGUGU CGGGGGAAUC GACCCCCUCG GUGUCGUAGC
800 CAACCGUUA AGUGUCCGC CUGGGGAGUA CGCACGCAAG UGUGAAAUCU
850 AAAGGAAUUG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG UGGAGUAUGU GGUUUAUUC
900 GAUGCAACCG CGAAGAAACU UACCAGGGUUG UGACAUCUCG CGAAUCCCUU
950 GGAACUUGG GAGUCUUCU GGGAGCGCAG AGACAGGUGG UGCAUGGCCU
1000 UCGUCAGCUC GUGUCGUGAG AUGUUGGGUU AAGUCCCGCA ACGAGCGCAA
1050 CCCACGUCUU UAGUUGCCAG CAUUGAGUUG GGCACUCUAG AGAGACCGCC
1100 GGUGAUAAAC CGGAGGAAGG UGUGGAUGAC GUCAAGUCAU CAUGCCCUU
1150 ACAUCCUGGG CUACACAGU ACUACAAUGC UACGGACAAA GGGCAGCAAA
1200 CUCGCGAGAG CUAGCAAUC CCAUAAACCG UGGCUCAGUU CAGAUCGUAG
1250 GCUGCAACUC GCCUACGUGA AGGAGGAAUC GCUAGUAAUC GCAGGUCAGC
1300 AUACUGCCGU GAAUACGUUC CCGGGCCUUG UACACACCGC CCGUCACACC
1350 AUGGAAGUUG GCCACGCCCG AAGUCGUUAC UCCAACCCUU GUGGAGGAGG
1400 ACGCCAAGG UGGGCCUGAU GACUGGGUG AAGUCGUAAC AAGGUAA

Synechococcus sp. PCC 7335

0 UGAUCAUGGC UCAGGAUGAA CGCUGGCGGC GUGCUAACA CAUGCAAGUC
50 GAACGGACCU UUCUGGAGGU UAGUGGCGGA CCGGUGAGUA ACGGUGAGG
100 AUCUGCCUUA AGGAUGGGGA CAACAGGGAG AAAUUCUCG UAACACCCGA
150 UGUGCCGAGA GGUGAAAUAU UAAUAGCCUG UAGAUGAGCU CGCGUCUGAU
200 UAGCUAGUUG GUGGGUAAA GGUUACCAA GGCAGCAGUC AGUAGCUGGU
250 CUGAGAGGAC GAUCAGCCAC ACUGGGACUG AGACACGGCC CAGACUCCUA
300 CGGGAGGCAG CAGUGGGGAA UUUUCCGCA UGGGCGCAAG CCUGACGGAG
350 CAACGCCGCG UGAGGGAGGA AGGCCUGUGG GUUGUAAACC UCUIUUCUCA
400 GGGAAAGAAGA UUCUGACGGU ACCUGAGGAA UCAGCAUCGG CUAACUCCGU
450 GCCAGCAGCC GCGGUAGAGC GGAGGAUGCA AGCGUUAUCC GGAUUUAUUG
500 GCGUAAAGC GUCCGUAGGC GGUUUAGAAA GUCAGUUGUU AAAGCCACA
550 GCUCAACUGU GGAUGGGCAA UUGAAAACUAC UAGACUAGAG AGUGGUAGGG
600 GUAGAGGGAA UUCUAGUGU AGCGGUGAAA UGCGUAGAUU UUAGGAAGAA
650 CACCAGUUGC GAAGCGCUC UACUGGGCCA UUACUGACGC UGAUGGACGA
700 AAGCUAGGGG AGCGAAAAGG AUUAGAUACC CCUGUAGUCC UAGCUGUAAA
750 CGAUGGACAC UAGGUGUUGC GCGUUAUCG CCGUACAGUA UCGAAGCAAA
800 CGCGUUAAGU GUCCCGCCUG GGGAGUACGC ACGCAAGUGU GAAACUCAAA
850 GGAUUGACG GGGGCCGCA CAAGCGGUGG AGUAUGUGGU UUAUUCGAU
900 GCAACCGGAA GAACCUUACC AGGGAUUGAC AUCCUACGAA GACUUUUGAA
950 AGAGAGUUGU GCCUUCGGGA ACGUAGAGAC AGGUGGUGCA UGGCUGUCGU
1000 CAGCUCUGU CGUGAGAUU UGGGUUAAGU CCCGCAACGA GCGCAACCCU
1050 CGUCCUAGU UGCCAUCAU AAGUUGGGCA CUUUAAGGAG ACUGCCGGUG
1100 ACAAACCGGA GGAAGGUGG GAUGACGUCA AGUCAUCAUG CCCCUCACU
1150 CCUGGGCUAC ACACGUACUA CAUUGCAACG GACAAAAGGC AGCCAACUAG
1200 CGAUAGUGAG CUAUCCCAU AAACCGUUGC UCAGUUCAGA UUGCAGGCGU
1250 CAACUCGCCU GCAUGAAGGC GGAUUCGUA GUAUUCGAG GUCAGCAUAC
1300 UGCGGUGAAU ACGUUCGCG GCCUUGUACA CACCGCCGU CACACCAUGG
1350 AAGUUGCCA CGCCGGAAGU CGUUAACCCA ACCUUGUGG AGGGGGACGC
1400 CGAAGGCAGG GCUGAUGACU GGGUGAAGU CGUAACA

7 Literaturverzeichnis

- Amann, R., H. Lemmer und M. Wagner.** 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 205-215.
- Amann, R., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig und K.-H. Schleifer.** 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *Journal of Bacteriology* **178**: 3496-3500.
- Amann, R., N. Springer, W. Ludwig, H.-D. Görtz und K.-H. Schleifer.** 1991. Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**: 161-164.
- Amann, R., N. Springer, W. Schönhuber, W. Ludwig, E. N. Schmid, K.-D. Müller und R. Michel.** 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of Acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 115-121.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux und D. A. Stahl.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1919-1925.
- Amann, R. I., L. Krumholz und D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770.
- Amann, R. I., W. Ludwig und K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Amann, R. I., B. Zarda, D. A. Stahl und K. H. Schleifer.** 1992. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3007-3011.
- Bobrow, M. N., T. D. Harris, K. J. Shaughnessy und G. J. Litt.** 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification - Application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **125**: 279-285.
- Bobrow, M. N., K. J. Shaughnessy und G. J. Litt.** 1991. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: II. Application to membrane immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **137**: 103-112.

- Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter und H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**: 107-127.
- Burger-Wiersma, T., L. J. Stal und R. M. Luuc.** 1989. *Prochlorothrix hollandica* gen. nov., sp. nov., a filamentous oxygenic photoautotrophic procaryote containing chlorophylls *a* and *b*: assignment to *Prochlorotrichaceae* fam. nov. and order Prochlorales Florenzano, Balloni, and Materassi 1986, with emandation of the ordinal description. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 250-257.
- Campbell, L. und D. Vault.** 1993. Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific ocean near Hawaii (station ALOHA). *Deep-Sea Research* **40**: 2043-2060.
- Castenholz, R. W.** 1992. Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). *Journal Phycology* **28**: 737-745.
- Castenholz, R. W.** 1989. Subsection III. Order Oscillatoriales. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Band 3: 1771-1780. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Chao, J., R. DeBasio, Z. Zhu, K. A. Guiliano und B. Schmidt.** 1996. Immunofluorescence signal amplification by the enzyme-catalyzed deposition of a fluorescent reporter substrate (CARD). *Cytometry* **23**: 48-53.
- Chatzinotas, A., R. A. Sandaa, W. Schönhuber, R. Amann, F. L. Daae, V. Torsvik, J. Zeyer und D. Hahn.** 1998. Analysis of broad-scale differences in microbial communities of two pristine forest soils. *Systematic and Applied Microbiology* **21**: 579-587.
- Chavez, F. P., K. R. Buck, K. H. Coale, J. H. Martin, G. R. Ditullio, N. A. Welschmeyer, A. C. Jacobson und R. T. Barber.** 1991. Growth rates, grazing, sinking, and iron limitation of equatorial Pacific phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **36**: 1816-1833.
- Chisholm, S. W., S. L. Frankel, R. Goericke, R. J. Olson, B. Palenik, J. B. Waterbury, L. West-Johnsrud und E. R. Zettler.** 1992. *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Archives Microbiology* **157**: 297-300.
- Chisholm, S. W., R. J. Olson, E. R. Zettler, R. Goericke, J. B. Waterbury und N. A. Welschmeyer.** 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**: 340-343.
- DeLong, E. F., G. S. Wickham und N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.
- El-Gammal, S. M. A. und M. A. Sadek.** 1988. Enzymic saccharification of some pretreated agricultural wastes. *Zentralblatt Mikrobiologie* **143**: 55-62.

- Erhart, R.** 1997. *In situ* Analyse mikrobieller Biozönosen in Abwasserreinigungsanlagen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. Doktorarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Fitch, W. M. und E. Margoliash.** 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**: 279-284.
- Florenzano, G., W. Balloni und R. Materassi.** 1986. Nomenclature of *Prochloron didemni* (Lewin 1977) sp. nov., nom. rev., *Prochloron* (Lewin 1976) gen. nov., nom. rev., Prochloraceae fam. nov., Prochlorales ord. nov., nom. rev. in the class Photobacteria Gibbons and Murray 1978. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**: 351-353.
- Florijn, R. J., J. Slats, H. J. Tanke und A. K. Raap.** 1995. Analysis of antifading reagents for fluorescence microscopy. *Cytometry* **19**: 177-182.
- Fox, G. E., K. J. Pechman und C. R. Woese.** 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**: 44-57.
- Fuchs, B.** 1996. Molekularbiologische Untersuchungen an durchflußzytometrisch sortierten Mikroorganismen. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schippel, W. Ludwig und R. Amann.** 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4973-4982.
- Garcia-Pichel, F., U. Nübel und G. Muyzer.** 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives Microbiology* **169**: 469-482.
- Geitler, L.** 1932. Cyanophyceae. In Rabenhorst (Hrsg.): Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Band XIV: Akademischer Verlag, Leipzig.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer und K. G. Field.** 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen und N. R. Pace.** 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* **170**: 720-726.
- Giovannoni, S. J., S. Turner, G. J. Olsen, S. Barns, D. J. Lane und N. R. Pace.** 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* **170**: 3584-3592.
- Goericke, R. und D. J. Repeta.** 1992. The pigments of *Prochlorococcus marinus*: the presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prokaryote. *Limnology and Oceanography* **37**: 425-433.

- Goericke, R. und N. A. Welschmeyer.** 1993. The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research* **40**: 2283-2294.
- Hess, W. R., F. Partensky, G. W. van der Staay, J. M. Garcia-Fernandez, T. Borner und D. Vaultot.** 1996. Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll *a/b* antenna in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 11126-11130.
- Holt, J. G., M. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley und S. T. Williams** (Hrsg.). 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. Auflage. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Jukes, T. H. und C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. *In* N. H. Murano (Hrsg.): *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.
- Juretschko, S., W. Schönhuber, S. Kulakauskas, D. S. Ehrlich, K. H. Schleifer und R. Amann.** 1999. In situ detection of *Escherichia coli* cells containing ColE1-related plasmids by hybridization to regulatory RNA II. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 1-8.
- Kerstens, H. M. J., P. J. Poddighe und A. G. J. M. Hanselaar.** 1995. A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **43**: 347-352.
- Kretz, K., W. Callen und V. Hedden.** 1994. Cycle sequencing. *PCR Methods and Applications* **3**: 107-111.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In* E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.): *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Lane, D. J., D. A. Stahl, G. J. Olsen, D. J. Heller und N. R. Pace.** 1985. A phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S ribosomal RNA sequences. *Journal of Bacteriology* **163**: 75-81.
- Lathe, R.** 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data - theoretical and practical considerations. *Journal of Molecular Biology* **183**: 1-12.
- Lebaron, P., P. Catala, C. Fajon, F. Joux, J. Baudart und L. Bernard.** 1997. A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3274-3278.
- Lee, S. Y., S. C. Bailey und D. Apirion.** 1978. Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA. *Journal of Bacteriology* **133**: 1015-1023.
- Lewin, R. A.** 1977. *Prochloron*, type genus of the Prochlorophyta. *Phycologia* **16**: 217.
- Lewin, R. A.** 1981. The prochlorophytes. *In* M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel (Hrsg.): *The prokaryotes*. Band 1: 257-266. Springer-Verlag, Berlin.

- Li, W. K. W. und A. M. Wood. 1988. Vertical distribution of North Atlantic ultraphytoplankton: Analysis by flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Deep-Sea Research* **35**: 1615-1638.
- Llobet-Brossa, E., R. Rossello-Mora und R. Amann. 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2691-2696.
- Ludwig, W., R. Amann, E. Martinez-Romero, W. Schönhuber, S. Bauer, A. Neef und K. H. Schleifer. 1998. rRNA-based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant and Soil* **204**: 1-19.
- Ludwig, W. und K. H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **15**: 155-173.
- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner und K. H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt und K.-H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**: 1097-1106.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner und K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 593-600.
- Meier, H. 1997. Nachweis von Fäkalstreptokokken mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden zur Anwendung in der hygienischen Trinkwasserkontrolle. Doktorarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Moore, L. R., R. Goericke und S. W. Chisholm. 1995. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine Ecology Progress Series* **116**: 259-275.
- Moore, L. R., G. Rocap und S. W. Chisholm. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**: 464-467.
- Murray, V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **17**: 8889.
- Muyzer, G., E. C. de Waal und A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Muyzer, G., A. Teske, C. O. Wirsen und H. W. Jannasch. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives Microbiology* **164**: 165-172.

- Neef, A.** 1997. Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doktorarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Neef, A., A. Zaglauer, H. Meier, R. Amann, H. Lemmer und K. H. Schleifer.** 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter - conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4329-4339.
- Neilan, B. A., D. Jacobs, T. Del Dot, L. L. Blackall, P. R. Hawkins, P. T. Cox und A. E. Goodman.** 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 693-697.
- Nelissen, B., R. De Baere, A. Wilmotte und R. De Wachter.** 1996. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *Journal of Molecular Evolution* **42**: 194-200.
- Nelissen, B., Y. Van de Peer, A. Wilmotte und R. De Wachter.** 1995. An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 1166-1173.
- Nicholson, W. L. und P. Setlow.** 1990. Sporulation, germination and outgrowth. In C. R. Harwood und S. M. Cutting (Hrsg.): *Molecular biological methods for Bacillus*. Band 391-450. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace und D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews in Microbiology* **40**: 337-365.
- Olsen, G. J., H. Matsuda, R. Hagstrom und R. Overbeek.** 1994. FastDNAml: A tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Computer Applications in the Biosciences* **10**: 41-48.
- Olson, R. J., S. W. Chisholm, E. R. Zettler, M. A. Altabet und J. A. Dusenberry.** 1990. Spatial and temporal distribution of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research* **37**: 1033-1051.
- Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane und G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology* **9**: 1-55.
- Palenik, B. und R. Haselkorn.** 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll *b*-containing prokaryotes. *Nature* **355**: 265-267.
- Palinska, K. A., W. Liesack, E. Rhiel und W. E. Krumbein.** 1996. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. *Archives Microbiology* **166**: 224-233.

- Partensky, F., J. Blanchot, F. Lantoine, J. Neveux und D. Marie.** 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I* **43**: 1191-1213.
- Partensky, F., N. Hoepffner, W. K. W. Li, O. Ulloa und D. Valout.** 1993. Photoacclimation of *Prochlorococcus* sp. (Prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean Sea. *Plant Physiology* **101**: 285-296.
- Polz, M. F., D. L. Distel, B. Zarda, R. Amann, H. Felbeck, J. A. Ott und C. M. Cavanaugh.** 1994. Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4461-4467.
- Potts, M., R. Ocampo-Friedmann, M. A. Bowman und B. Tözüm.** 1983. *Chroococcus* S24 and *Chroococcus* N41 (cyanobacteria): morphological, biochemical and genetic characterization and effects of water stress on ultrastructure. *Archives of Microbiology* **135**: 81-90.
- Raap, A. K., M. P. C. van de Corput, R. A. W. Vervenne, R. P. M. van Gijlswijk, H. J. Tanke und J. Wiegant.** 1995. Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Human Molecular Genetics* **4**: 529-534.
- Rippka, R.** 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* **167**: 28-67.
- Rippka, R., T. Coursin, C. Lichtlé, F. Partensky, J. Houmard und M. Herdman.** 1997. *Prochlorococcus* sp. PCC 9511, an axenic, marine, chlorophyll *b/c*-containing oxyphotobacterium. IXth International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes. Vienna, Austria.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman und R. Y. Stanier.** 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of Genetic Microbiology* **111**: 1-61.
- Rippka, R. und M. Herdman.** 1992. Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria. Catalogue and Taxonomic Handbook. Institut Pasteur. Paris
- Rudi, K., O. M. Skulberg, F. Larsen und K. S. Jakobsen.** 1997. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2593-2599.
- Saitou, N. und M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: A method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (Hrsg.).** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467.
- Schleifer, K. H., W. Ludwig und R. Amann.** 1993. Nucleic acid probes. In M. Goodfellow und O. McDonnell (Hrsg.): *New bacterial systematics*. Band 463-510. Academic Press, London, New York.

- Schleifer, K.-H., R. Amann, W. Ludwig, C. Rothemund, N. Springer und S. Dorn.** 1992. Nucleic acid probes for the identification and in situ detection of pseudomonads. *In* E. Galli, S. Silver und B. Witholt (Hrsg.): Pseudomonads: Molecular Biology and Biotechnology. Band 127-134. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Schmidt, B. F., J. Chao, Z. G. Zhu, R. L. Debiasio und G. Fisher.** 1997. Signal amplification in the detection of single-copy DNA and RNA by enzyme-catalyzed deposition (CARD) of the novel fluorescent reporter substrate Cy3.29-tyramide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**: 365-373.
- Schönhuber, W.** 1995. Enzymmarkierte Sonden zur *in situ* Hybridisierung von Pflanzen-Bakterien-Symbiosen. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko und R. Amann.** 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3268-3273.
- Schönhuber, W., B. Zarda, S. Eix, R. Rippka, M. Herdman, W. Ludwig und R. Amann.** 1999. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1259-1267.
- Snaidr, J.** 1997. Phylogenie und *in situ* Identifizierung von Bakterien im Belebtschlamm von biologischen Abwasserreinigungsanlagen. Doktorarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig und K.-H. Schleifer.** 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2884-2896.
- Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer und N. Petersen.** 1992. Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 116-122.
- Stahl, D. A. und R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes. *In* E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.): Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Band 205-248. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- Stahl, D. A., R. Devereux, R. I. Amann, B. Flesher, C. Lin und J. Stromley.** 1989. Ribosomal RNA based studies of natural microbial diversity and ecology. *In* T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R. Morita und A. Uchida (Hrsg.): Recent advances in microbial ecology. Band 669-673. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Stahl, D. A., D. J. Lane, G. J. Olsen und N. R. Pace.** 1984. Analysis of hydrothermal vent associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* **224**: 409-411.
- Stahl, D. A., D. J. Lane, G. J. Olsen und N. R. Pace.** 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1379-1384.

- Stanier, R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel und G. Cohen-Bazire.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* **35**: 171-205.
- Sternberg, C., L. Eberl, L. K. Poulsen und S. Molin.** 1997. Detection of bioluminescence from individual bacterial cells - a comparison of two different low-light imaging systems. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **12**: 7-13.
- Strunk, O., O. Gross, B. Reichel, M. May, S. Hermann, N. Stuckmann, B. Nonhoff, T. Ginhart, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.-H. Schleifer und W. Ludwig.** ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>. Department of Microbiology, Technische Universität München, Munich Germany.
- Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, M. J. Johnson, K. Itakura und R. B. Wallace.** 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. *In* D. Brown und C. F. Fox (Hrsg.): *Developmental biology using purified genes*. Band 683-693. Academic Press, Inc., New York.
- Tandeau de Marsac, N.** 1977. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **130**: 82-91.
- Thomas, C. A. und B. M. Dancis.** 1973. Ring stability. *Journal of Molecular Biology* **77**: 43-55.
- Trebesius, K.** 1995. Entwicklung und Anwendung sensitiver *in situ* Techniken zum Nachweis ribosomaler RNS in ganzen bakteriellen Zellen. Doktorarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Turner, S.** 1997. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Systematics and Evolution* **11**: 13-52.
- Turner, S., E. F. DeLong, S. J. Giovannoni, G. J. Olsen und N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic analysis of microorganisms and natural populations by using rRNA sequences. *In* Y. Cohen und E. Rosenberg (Hrsg.): *Microbial mats. Physiological ecology of benthic microbial communities*. Band 390-401. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Urbach, E., D. L. Robertson und S. W. Chisholm.** 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* **355**: 267-270.
- Urbach, E., D. J. Scanlan, D. L. Distel, J. B. Waterbury und S. W. Chisholm.** 1998. Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus marinus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution* **46**: 188-201.
- Urdea, M. S., B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne und T. Horn.** 1988. A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* **16**: 4937-4956.

- Valout, D., D. Marie, R. J. Olson und S. W. Chisholm.** 1995. Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean. *Science* **268**: 1480-1482.
- Valout, D., J. Neveux, R. F. C. Mantoura und C. A. Llewellyn.** 1990. Winter presence of prochlorophytes in the surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* **35**: 1156-1164.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters und J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**: 407-438.
- Van Gijlswijk, R. P. M., J. Wiegant, A. K. Raap und H. J. Tanke.** 1996. Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **44**: 389-392.
- Van Gijlswijk, R. P. M., H. J. M. A. A. Zijlmans, J. Wiegant, M. N. Bobrow, T. J. Erickson, K. E. Adler, H. J. Tanke und A. K. Raap.** 1997. Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**: 375-382.
- Veldhuis, M. J. W. und G. W. Kraay.** 1990. Vertical distribution and pigment composition of a picoplanktonic prochlorophyte in the subtropical North Atlantic: a combined study of HPLC-pigment analysis and flow cytometry. *Marine Ecology Progress Series* **68**: 121-127.
- Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi und K.-H. Schleifer.** 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 792-800.
- Wagner, M., M. Schmid, S. Juretschko, K. H. Trebesius, A. Bubert, W. Goebel und K. H. Schleifer.** 1998. In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 159-168.
- Wahl, G. M., S. L. Berger und A. R. Kimmel.** 1987. Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods in Enzymology* **152**: 399-407.
- Wallner, G., R. Amann und W. Beisker.** 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136-143.
- Wallner, G., R. Erhart und R. Amann.** 1995. Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1859-1866.
- Waterbury, J. B.** 1992. The cyanobacteria - isolation, purification, and identification. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.): *The prokaryotes*. Band 2: 2058-2078. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Waterbury, J. B.** 1989. Subsection II. Order Pleurocapsales Geitler 1925, emend. Waterbury & Stanier 1978. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Band 3: 1746-1770. Williams & Wilkins, Baltimore.

- Waterbury, J. B. und R. Rippka.** 1989. Subsection I. Order Chroococcales Wettstein 1924, emend. Rippka et al., 1979. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Band 3: 1728-1746. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Waterbury, J. B. und R. Y. Stanier.** 1978. Patterns of growth and development in Pleurocapsalean cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **42**: 2-44.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr und H. G. Trüper.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 463-464.
- Whitton, B. A.** 1989. Genus I. *Calothrix* Agardh 1824. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Band 3: 1791-1793. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Williams, K. P. und D. P. Bartel.** 1996. Phylogenetic analysis of tm RNA secondary structure. *RNA* **2**: 1306-1310.
- Wilmotte, A.** 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In D. A. Bryant (Hrsg.): The molecular biology of cyanobacteria. Band 1-25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Wilmotte, A., J. M. Neefs und R. De Wachter.** 1994. Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain NIBB 1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. *Microbiology* **140**: 2159-2164.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- Worden, A. Z., S. W. Chisholm und B. J. Binder.** 1998. Application of rRNA-targeted peptide nucleic acids in marine photosynthetic picoplankton. Eighth International Symposium on Microbial Ecology (ISME-8). Halifax, Canada.
- Zaitso, K. und Y. Ohkura.** 1980. New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: Rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Analytical Biochemistry* **109**: 109-113.
- Zarda, B.** 1994. Gold-, enzym- und fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren zur licht- und elektronenmikroskopischen *in situ*-Identifizierung von Mikroorganismen. Doktorarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
- Zarda, B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R. I. Amann und J. Zeyer.** 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Archives of Microbiology* **168**: 185-192.
- Zubkow, M. V., M. A. Sleigh, G. A. Tarran, P. H. Burkill und R. J. G. Leakey.** 1998. Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50°N to 50°S. *Deep-Sea Research* **45**: 1339-1355.

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1995 bis März 1997 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München und von April 1997 bis Juli 1998 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Rudolf Amann durchgeführt.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Amann, der ausreichend Freiraum bei der Bearbeitung des Themas ließ, in kritischen Situationen aber stets helfend mit Rat und Tat zur Seite stand

Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu arbeiten und für das richtungweisende Knüpfen des Kontakts nach Paris

Frau Dr. R. Rippka und Herrn Dr. M. Herdman vom Institut Pasteur in Paris für das geduldige Auskunftsgeben über Cyanobakterien und die Offenheit für eine auf ihrem Gebiet neue Methode, die zu einer Zusammenarbeit führte, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre

Herrn Dr. W. Ludwig für die Bereitschaft, seine eh schon knappe Zeit auch noch den, für ihn etwas exotischeren, Cyanobakteriensequenzen zu opfern

Frau Dr. N. West und Herrn Dr. D. Scanlan für die Zusammenarbeit in Sachen *Prochlorococcus*

Herrn Dr. L. Eberl für die Hilfe bei den Aufnahmen mit der photonensensitiven Kamera

Frau Dr. I. Itean, Frau T. Coursin, Frau Dr. A. Wilmotte und Herrn Dr. F. Haes für die Überlassung von Sequenzdaten vor deren Veröffentlichung

Frau R. Appel und Herrn Dr. F. Garcia-Pichel, deren Unterstützung in Bremen die Entfernung zu Paris kleiner werden ließ

Meinen Kollegen in München, die zwar verlassen aber sicher nicht vergessen wurden, und den neu gewonnenen Kollegen in Bremen für freundschaftliche Atmosphäre und gutes Arbeitsklima

Herrn F. O. Glöckner und Herrn B. Fuchs für die Zusammenarbeit an ARB-Rechnern bzw. Durchflußzytometern und die vielfältigen, nicht ausschließlich fachlichen Diskussionen