

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Molekulare Identifizierung
von
Neisseriaceae und Moraxellaceae
mittels
ribosomaler DNA Sequenzierung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius–Maximilians–Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Christian J. Singer

aus München

Würzburg, April 2005

Referent: Professor Dr. med. Matthias Frosch
Koreferent: Professor Dr. Joachim Morschhäuser
Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 2006

Der Promovend ist Arzt

Für Margarethe & Thomas

Inhalt

| | | |
|-------------|--|----|
| 1 | Einleitung | 01 |
| 2 | Material und Methoden | 07 |
| 2.1 | Material | 07 |
| 2.1.1 | Geräte und Laboreinrichtungen | 07 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterial | 07 |
| 2.1.3 | Lösungen und Chemikalien | 08 |
| 2.1.4 | Enzyme | 09 |
| 2.1.5 | Synthetische Oligonukleotide | 09 |
| 2.1.5.1 | Amplifikations- u. Sequenzierungsprimer der 16S-rDNA | 09 |
| 2.1.5.2 | Amplifikations- u. Sequenzierungsprimer der 23S-rDNA | 09 |
| 2.1.6 | Längenstandard | 09 |
| 2.1.7 | Nährmedien | 10 |
| 2.1.8 | Bakterienstämme | 10 |
| 2.1.9 | Software und Internetanwendungen | 14 |
| 2.2 | Methoden | 14 |
| 2.2.1 | Mikrobiologische Methodik | 14 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung der Bakterienstämme | 14 |
| 2.2.1.2 | Gram-Färbung | 15 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden | 15 |
| 2.2.2.1 | 16S- und 23S-rDNA Sequenzierung | 15 |
| 2.2.2.1.1 | DNA Präparation | 15 |
| 2.2.2.1.2 | Polymerasekettenreaktion | 16 |
| 2.2.2.1.2.1 | 16S-rDNA PCR | 17 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 2.2.2.1.2.2 | 23S-rDNA PCR | 17 |
| 2.2.2.1.3 | Agarosegelelektrophorese | 18 |
| 2.2.2.1.4 | Ethanol-Ammoniumacetat-Fällung | 18 |
| 2.2.2.1.5 | Automatisierte Sequenzierung | 19 |
| 2.2.3 | Auswertung der Sequenzdaten | 19 |
| 2.2.4 | Datensammlung für das RIDOM-Projekt | 20 |
| 2.2.5 | Software-Entwicklung | 21 |
| 2.2.5.1 | Programmierung der Datenbank RIDOM_Tool | 21 |
| 3 | Ergebnisse | 23 |
| 3.1 | Vergleichende Sequenzanalyse | 23 |
| 3.2 | Sequenz-Alignment der 16S- und 23S-rDNA | 26 |
| 3.3 | Evaluation generierter Sequenzen mit GenBank | 29 |
| 3.4 | Die Datenbank RIDOM_Tool | 30 |
| 3.4.1 | Benutzeroberfläche und Bedienerführung | 30 |
| 3.4.2 | Export und Import von Daten | 34 |
| 4 | Diskussion | 35 |
| 5 | Zusammenfassung | 41 |
| 6 | Summary | 42 |
| 7 | Bibliographie | 43 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 53 |
| 9 | Anhang | 57 |

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellen

| | | |
|----------|--|----|
| Tab. 1–1 | Ausgewählte <i>Neisseriaceae</i> und <i>Moraxellaceae</i> | 06 |
| Tab. 2–1 | Untersuchte Isolate der Genera <i>Neisseriaceae</i> und <i>Moraxellaceae</i> | 10 |
| Tab. 3–1 | Spezies mit höchster Intraspezies-Variation auf dem 16S-/23S-Gen | 23 |
| Tab. 3–2 | Analyse der Polymorphismen | 24 |
| Tab. 3–3 | Gattungen mit höchster Intraspezies-Variation auf dem 16S-/23S-Gen | 26 |
| Tab. 3–4 | Interspezies-Variationen innerhalb eines Genus | 26 |
| Tab. 9–1 | Systemvoraussetzungen für die Software RIDOM_Tool | 57 |

Abbildungen

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 1–1 | RIDOM Arbeitsablauf (schematisch) | 03 |
| Abb. 2–1 | Primer-Zielregionen auf der 16S- und 23S-rDNA | 17 |
| Abb. 3–1 | 16S DNA Sequenz-Alignment Baum | 27 |
| Abb. 3–2 | 23S DNA Sequenz-Alignment Baum | 28 |
| Abb. 3–3 | Programmstruktur von RIDOM_Tool (schematisiert) | 31 |
| Abb. 3–4 | Hauptmenü der Datenbank RIDOM_Tool | 32 |
| Abb. 3–5 | Formular „Sequenz Form“ | 33 |
| Abb. 9–1 | Interspezies- und Intraspezies-Variationen aller untersuchten Isolate | 58 |

1 Einleitung

„Diseases desperate grown, by desperate appliance are relieved“ William Shakespeare (Hamlet)

Robert Koch's historische Postulate haben bis in die heutige Zeit ihre Berechtigung in der Diagnostik von Mikroorganismen. Mangelnde Trennschärfe phänotypischer Merkmale oder Stoffwechselforgänge limitieren jedoch in einigen Fällen deren Identifikation und Diagnostik (72). Seit der Entwicklung von *in-vitro* Amplifikationstechniken bedienen sich neuere Verfahren mit dem Vergleich genetischer Charakteristika (56, 59). Vor allem bei den nachfolgend aufgeführten Bedingungen können sie eine hilfreiche Ergänzung oder gar notwendige Alternative zu den herkömmlichen phänotypischen Methoden sein:

- Erschwerte oder unmögliche Kultivierung des Mikroorganismus
- Langsames Wachstum oder schwere Differenzierbarkeit unter Kulturbedingungen
- Potentielle Gefahr für das Laborpersonal bei Kultivierung
- Kein etabliertes, auf phänotypischen Kriterien basierendes Verfahren
- Quantifizierung vom Ausmaß der Infektion (z. B. „Virusload“).

Definierte Vorgehensweisen, ähnlich denen phänotypischer Methoden, sind auch für molekularbiologische Techniken zur Identifikation neuer pathogenen Mikroorganismen etabliert (22). Die wichtigsten Strukturen des Genoms, die sich bisher als Ziel für die molekulare Diagnostik bewährt haben, sind:

- DNA Sequenzanteile, die für einen toxischen oder virulenten Faktor kodieren
- DNA Abschnitte eines spezifischen Antigens
- Spezifische DNA Plasmid Sequenzregionen
- Ribosomale RNA kodierende Regionen
- Kurze, nicht-kodierende Sequenzabschnitte, die meist Spezies-spezifisch sind.

Die ribosomale DNA, kodierend für die ribosomale RNA, ist besonders geeignet zur Identifikation, da sie in allen Lebewesen von vitaler Bedeutung ist und damit ubiquitär

vorkommt. Die ribosomale DNA ist oft in mehrfacher Kopie auf dem Genom vorhanden, womit ihre Detektion erleichtert und damit die Sensitivität angewandter Verfahren erhöht wird. Sie enthält konservierte, variable und stark-variable Regionen. Eingesetzte Primer können in gewünschter Spezifität an diese Gegebenheit angepasst werden. Zudem können diese Regionen auch als molekulare Uhr für einen Organismus verstanden werden und somit die Grundlage für phylogenetische Studien bilden (29, 51, 61, 88). Mikroorganismen, die nicht kultivierbar oder nicht eindeutig identifizierbar sind, können dadurch zumindest in einen stammesgeschichtlichen, phylogenetischen Kontext zu den bestehenden Organismen eingeordnet werden.

Voraussetzung für den molekularen Ansatz zur Identifikation ist der Vergleich der generierten Datensätze mit den schon bestehenden einer Sequenzdatenbank. In praxi soll die vergleichende Sequenzanalyse einer vordefinierten Region zur Identifikation des Organismus führen. Hierbei wird ein genau festgelegter Sequenzbereich des Genoms eines unbekanntes Mikroorganismus sequenziert und mit einer ausreichend großen Anzahl von Referenzsequenzen aus einer Datenbank verglichen. Die Referenzsequenz, die die größte Übereinstimmung mit der untersuchten Sequenz zeigt, weist auf das zutreffende Taxon hin. Existierende Sequenzdatenbanken und ihre Analyse-Werkzeuge, wie z. B. das *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *GenBank* oder das *Ribosomal Database Project* (RDP) sind zur Identifikation klinisch relevanter Mikroorganismen jedoch bisher nicht optimiert (5, 27, 47). Die meisten Sequenzen sind unter phylogenetischen Gesichtspunkten bestimmt. Oft fehlen die Sequenzinformationen zu humanmedizinisch relevanten Keimen. Zusammenfassend bergen die dort archivierten Sequenzdaten einige weitere Nachteile für die Identifikation und Diagnostik:

- Ältere, aufgrund früherer Methodenstandards fehlerbehaftete Sequenzeinträge
- Keine Qualitätskontrollfilter bestehender und neu zugefügter Sequenzeinträge
- Nicht charakterisierte Sequenzeinträge
- Fehlerhafte Einordnung von Sequenzen auf Basis veralteter Nomenklatur
- Fehlen von Typstämmen klinisch wichtiger Mikroorganismen.

Zudem sind die Resultate dieser Datenbanken nicht anwenderfreundlich aufbereitet. Einen neuen benutzerfreundlichen Ansatz, der die bestehenden Schwierigkeiten bisheriger Datenbanken umgehen soll, verfolgt das von Dag Harmsen, am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, ins Leben gerufene Projekt „**R**ibosomal **D**ifferentiation of **M**icroorganisms“ kurz RIDOM genannt (30, 31). Abbildung 1–1 illustriert den Ablauf der molekularen Diagnostik anhand der vergleichenden partiellen rDNA-Sequenzanalyse. Der unbekannte Erreger wird isoliert, die DNA extrahiert und ein genau definierter rDNA-Sequenzabschnitt vervielfältigt. Das Produkt der Polymerasekettenreaktion ist Substrat für die automatisierte *Taq*-Cycle-Sequenzierung mit der die Sequenz des Abschnitts bestimmt wird. Diese kann nun über eine „World Wide Web“ (WWW)-Schnittstelle mit den Datensätzen der RIDOM-Datenbank verglichen werden.

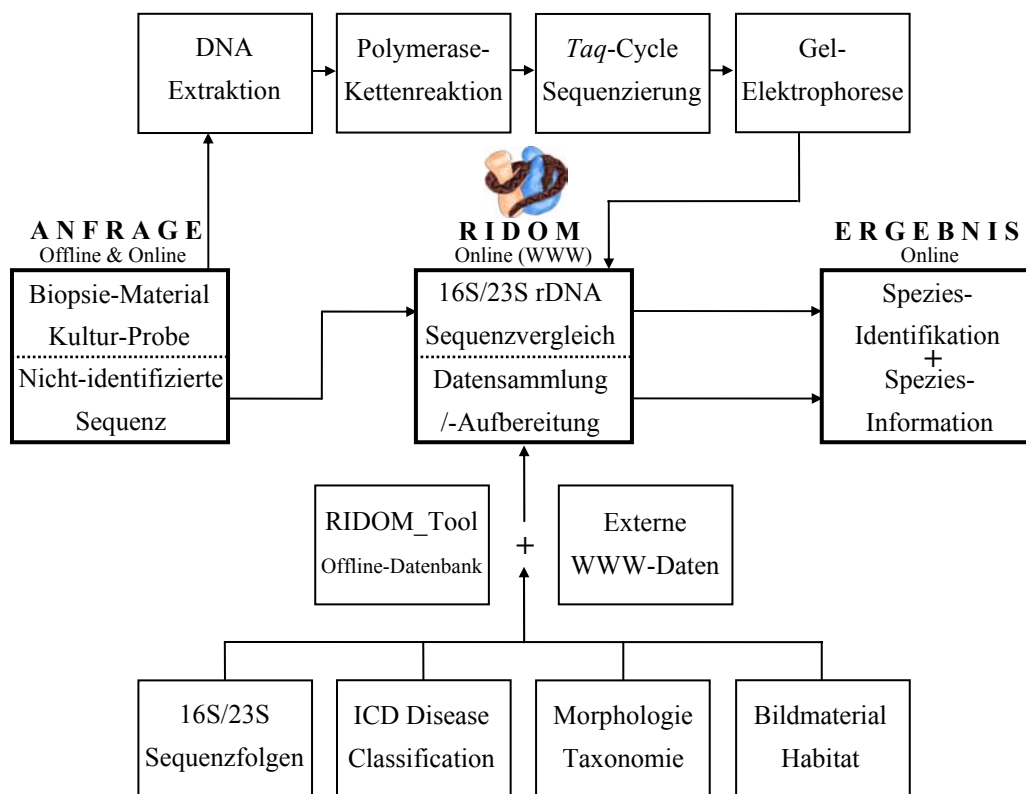


Abb. 1–1 RIDOM-Arbeitsablauf (schematisch): Ausgehend von der Probe bzw. der Sequenzfolge des nicht identifizierten Erregers wird online mit der WWW-Datenbank RIDOM eine vergleichende 5′-16S-rDNA- bzw. 5′-23S-rDNA-Sequenzanalyse durchgeführt. Das Ergebnis besteht in der Identifikation der Ausgangssequenz und wird ergänzt durch spezies-relevante Informationen, die u. a. offline durch die Datenbank RIDOM_Tool gesammelt wurden.

Die Datenbank liefert als Ergebnis des Sequenzvergleichs das Taxon, das die größte Übereinstimmung mit den Sequenzdaten des unbekanntes Erregers aufweist. Der identifizierte Keim kann in seinen taxonomisch-phylogenetischen Zusammenhang eingeordnet werden. Sind die Resultate nicht eindeutig, werden weitere molekularbiologische und auch konventionelle Differenzierungsschritte eingeleitet. Ferner hat der Benutzer aus Qualitätsgründen Zugriff auf die zugrunde liegenden Sequenz-Traces. Neben „Links“ zu anderen medizinischen Internet-Datenbanken werden dem Benutzer weiterführende Spezies-spezifische Informationen multimedial dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Isolate der Familien *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* untersucht. Damit wurden die ersten Referenzdatensätze aus der Gruppe der Bakterien zur Demonstration der Datenbank RIDOM erzeugt (28, 30). Die Familien *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* umfassen gramnegative, aerobe und unbewegliche Bakterien, die biochemisch weitgehend inaktiv sind und sowohl in Kokken- als auch in Stäbchenform vorkommen können (36, 58). Deshalb ist es oft schwierig, sie aufgrund phänotypischer Kriterien zu klassifizieren. Dieser Umstand hat nicht nur zu einer unbefriedigenden taxonomischen Einteilung, sondern auch zu einer mühsamen diagnostischen Erfassung vieler Arten geführt. Nach Bøvre bestanden die *Neisseriaceae* vormals aus den Genera *Neisseria*, *Kingella*, *Acinetobacter* und *Moraxella* (9, 34). Letzteres umfasste zudem die Subgenera *Moraxella* und *Branhamella* (8). Bezüglich ihrer genetischen Verwandtschaft wurden durch DNA-Hybridisierung und Analyse ribosomaler DNA-Sequenzen Fortschritte in der Neueinteilung der Familien erreicht. Die *Neisseriaceae* mit ihren drei Hauptgattungen *Neisseria*, *Kingella* und *Eikenella* werden zur β -Subklasse der Proteobakterien gruppiert. Die Genera *Acinetobacter*, *Moraxella*, und *Psychrobacter* wurden aus dem Genus *Neisseriaceae* entfernt und sind unter der Familie der *Moraxellaceae* in der μ -Subklasse der Proteobakterien zusammengefasst (63, 64, 75). Die Gattung *Neisseria* fasst eine Gruppe von eng verwandten, unbeweglichen und gramnegativen Diplokokken zusammen, deren hauptsächlich natürlicher Wirt der Mensch ist (44). Sie enthält Kommensalen wie *Neisseria lactamica*, *N. flavescens*, *N. cinerea*, *N. flava*, *N. mucosa*, *N. sicca* und *Neisseria polysaccharea*, die asymptomatisch die Schleimhäute besiedeln. Erkrankungen durch diese Kommensalen gelten immer häufiger als Ursache

opportunistischer Infektionen (7, 40). Die zwei ausschließlich humanpathogenen Vertreter *Neisseria gonorrhoeae* („Gonokokken“) und *Neisseria meningitidis* („Meningokokken“) sind weltweit von epidemiologischer Bedeutung. Die in Deutschland der Meldepflicht unterliegende Gonorrhoe steht trotz guter Therapierbarkeit in den Statistiken der Geschlechtserkrankungen bei fast allen Ländern an erster Stelle (83). Epidemieartige Ausbrüche der Meningokokken-Meningitis sind in tropischen und subtropischen Gebieten trotz umfangreicher Impfprogramme und Chemoprophylaxemaßnahmen gefürchtet. Die verschiedenen Serogruppen von *N. meningitidis* und deren unterschiedliche immunogene Wirkung erschwert zusätzlich die Entwicklung geeigneter Impfstoffe (62). Das Genus *Eikenella* mit der einzigen humanpathogenen Spezies *Eikenella corrodens* wird hauptsächlich aus der Mundflora des Menschen isoliert. Das Genus *Kingella* enthält die humanpathogene Spezies *Kingella kingae* (23).

Bei den *Moraxellaceae* unterscheidet man die drei Hauptgattungen *Moraxella*, *Branhamella* und *Acinetobacter*. Das Genus *Moraxella* umfasst verschiedene Arten, die auf Schleimhäuten vorkommen und gelegentlich in pathologischen Situationen beim Menschen nachgewiesen wurden (38). Die *Branhamella*-Arten gelten als Schleimhautparasiten von geringer Pathogenität und werden hauptsächlich beim Tier gefunden. Eine Ausnahme ist die beim Menschen vorkommende Spezies *Branhamella catarrhalis* (13, 18). Die Gattung *Acinetobacter* enthält ubiquitär vorkommende Keime, die sich gegenüber Umwelteinflüssen als sehr resistent erweisen. So sind u. a. *Acinetobacter baumannii* und *A. calcoaceticus* sehr verbreitete Saprophyten, die beim Menschen und gelegentlich beim Tier als wichtige Erreger von nosokomialen Infektionen (Hospitalismus) auftreten können (50, 78). Die wichtigsten humanpathogenen Vertreter der beiden Familien und deren Eigenschaften sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer vollständigen molekularen Differenzierung relevanter Spezies der Genera *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* angestrebt. Dabei wurden von insgesamt 94 Stämmen koherente variable Regionen auf dem rRNA Operon untersucht. Zur Anwendung kam die vergleichende Sequenzanalyse geeigneter hypervariabler partieller Abschnitte der 5'-16S-rDNA (457 bp) und

23S-rDNA (202 bp). Die Sequenzunterschiede sollten durch paarweise Vergleiche untersucht und damit Unterschiede auf Intraspezies- und Interspezies-Ebene herausgearbeitet werden.

Tab. 1-1 Ausgewählte *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae*: Eigenschaften und klinische Relevanz

| Spezies | Oxidase/ Katalase | Säure a. Glucose | NO ₃ /NO ₂ Reduktion | Penicillin- Sensitivität | Morph. | Klinische Relevanz |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|---|-----------------------------|--------|--------------------|
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | + / + | + | - / + | + ^b | Dk | Gonorrhoe |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | + / + | + | - / + | + ^b | Dk | Meningitis |
| <i>Eikenella corrodens</i> | + / - | - | + / + | + ^b | kS | N. I. |
| <i>Kingella kingae</i> | + / - | + | - / + | + ^b | kS | N. I. |
| <i>Moraxella catharralis</i> | + / + | - | - / - | + ^b | kS | N. I. |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | - / + | v | - / - | - | kS | N. I. |

Dk=Diplokokken **kS**=kokkoide Stäbchen **v**=variabel **b**=Ausnahme: β-Laktamase bild. Stämme **N. I.**=Nosokomiale Infekte

Die Sequenzdaten der untersuchten Stämme, sowie zugehörige taxonomische und krankheitsspezifische Informationen, wurden auf dem RIDOM Web Server hinterlegt. Außerdem wurden die partiellen 16S- und 23S-rDNA Sequenzabschnitte verwendet, um phylogenetische Beziehungen unter den Spezies der Familien *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* zu untersuchen. In Fällen, in denen die zur Unterscheidung notwendige Sequenzdiversität zwischen den einzelnen Spezies nicht gegeben war, wird ein polyphasischer Ansatz diskutiert, der weitere, zum Teil molekularbiologische Verfahren zur Diagnostik einbindet.

Um umfangreiche Datensätze komfortabel, „offline“ und dezentral von verschiedenen Personen verwalten zu können, sollte im zweiten Teil der Arbeit unter der Betriebssystemumgebung Windows die Datenbank RIDOM_Tool entwickelt werden. Damit soll netzunabhängig Bildmaterial, Literatur- und Sequenzinformation ganzer Genera archiviert werden können. Import- und Exportfunktionen zur Literaturbeschaffung, Zugang zur Datenbank *Medline* und anderen Internetressourcen sollten realisiert werden. Die dabei wichtigste Schnittstelle ist der automatisierte Export der gesammelten Information in die RIDOM Datenbank und damit ihre Verfügbarkeit über RIDOM im World Wide Web als Werkzeug zur molekularen Diagnostik.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laboreinrichtungen

| | |
|---|--|
| <i>Diascanner Polaroid SprintScan</i> | Polaroid, Offenbach |
| <i>Duran™ Laborglas</i> | Schott, Mainz |
| <i>Feinwaage Modell P1200</i> | Mettler-Toledo, Greifensee (CH) |
| <i>Gelelektrophoresekammer Minigel Twin (8-zählig)</i> | Biometra, Göttingen |
| <i>Pipettierhilfe für Mess-/Vollpipetten, Modell Easypet™</i> | Eppendorf, Hamburg |
| <i>Pipetten Serie Reference (variabel)</i> | Eppendorf, Hamburg |
| <i>Mischgerät (Vortexgerät) Reax 2000</i> | Heidolph, Schwabach |
| <i>Sequenzierautomat</i> | Applied Biosystems (Perkin Elmer), Weiterstadt |
| <i>ABI Prism™ 377 DNA Sequencer</i> | Applied Biosystems (Perkin Elmer), Weiterstadt |
| <i>Spannungsgerät Typ 3000 Xi</i> | Bio-Rad Laboratories, München |
| <i>Spiegelreflexkamera Nikon F-601</i> | Nikon, Düsseldorf |
| <i>Sterilwerkbank (mit Abzug) Modell BSB 6A</i> | Gelaire, Mailand (I) |
| <i>Thermocycler GeneAmp™ PCR System 2400</i> | Applied Biosystems (Perkin Elmer), Weiterstadt |
| <i>Thermomixer Modell 5436</i> | Eppendorf, Hamburg |
| <i>Tischzentrifuge Sepatech Biofuge™ 15</i> | Heraeus Instruments, Hanau |
| <i>Vakuumbzentrifuge SpeedVac™ Typ RC 10</i> | Savant Instruments, Unterhaching |

2.1.2 Verbrauchsmaterial

| | |
|---|--|
| <i>BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kit</i> | Applied Biosystems (ABI), Weiterstadt |
| <i>Centri-Sep™ Spin Columns</i> | Applied Biosystems (Perkin Elmer), Weiterstadt |
| <i>Farbdiafilm Kodak EPY 64 T</i> | Eastman Kodak, Stuttgart-Wangen |
| <i>Farbdiafilm Velvia Fujichrome RVP 135</i> | Fuji Photo Film, Düsseldorf |
| <i>JetSorb™ Gel Extraction Kit</i> | Genomed, Bad Oeynhausen |
| <i>Membranfilter RC 58 (0,2 µm)</i> | Schleicher & Schuell, Relliehausen |
| <i>Microbank Kryoröhrchen</i> | Mast Diagnostika, Reinfeld |
| <i>Parafilm™ Verschlussfolie</i> | American National Can (Norwalk, USA) |

| | |
|--|--------------------|
| <i>Pipettenspitzen, Serie Standartips</i> | Eppendorf, Hamburg |
| <i>Reaktionsgefäße (Standart 1,5 ml)</i> | Eppendorf, Hamburg |
| <i>Silicagel moisture indicating beads</i> | Serva, Heidelberg |

2.1.3 Lösungen und Chemikalien

Chemikalien und Lösungen wurden, soweit nicht unten aufgeführt, von den Unternehmen Merck (Darmstadt), Fresenius (Bad Homburg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

| | |
|--|---------------------------------------|
| <i>Agarose</i> | Carl Roth, Karlsruhe |
| <i>Ammoniumacetat</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Ammoniumpersulfat 10% (APS)</i> | Aldrich, Steinheim/Albuch |
| <i>Ampuwa (steriles, pyrogenfreies Aqua ad injectabilia)</i> | Fresenius, Bad Homburg |
| <i>Aqua destillata (Aqua dest.)</i> | Fresenius, Bad Homburg |
| <i>Blue Dextran/EDTA</i> | Applied Biosystems (ABI), Weiterstadt |
| <i>Borsäure</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Chloroform</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Desoxynukleotide (dNTPs) (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)</i> | Pharmacia, Freiburg |
| <i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i> | Sigma, Deisenhofen |
| <i>Ethanol 100%</i> | Fresenius, Bad Homburg |
| <i>Ethidiumbromid</i> | Biometra, Göttingen |
| <i>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</i> | Sigma, Deisenhofen |
| <i>Harnstoff</i> | Applichem, Darmstadt |
| <i>Isoamylalkohol</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Isopropanol</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Karbol-Fuchsin Lösung</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Magnesiumchlorid</i> | Perkin Elmer, Vaterstetten |
| <i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>N-acetyl-N,N,N-trimethylammonium- bromid (CTAB)</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Natriumchlorid</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>GeneAmp™ PCR Buffer II (10x Puffer) (100 mM Tris/HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)</i> | Perkin Elmer, Vaterstetten |
| <i>Phenol</i> | Merck, Darmstadt |
| <i>Sodium-Dodecyl-Phosphat (SDS)</i> | ICN Biomedicals, Frankfurt |

| | |
|-----------------------------------|---------------------|
| <i>TBE-Puffer (Tris-Borat)</i> | Biometra, Göttingen |
| <i>TE-Puffer (Tris-HCl, EDTA)</i> | Merck, Darmstadt |

2.1.4 Enzyme

| | |
|---------------------------------|---|
| <i>AmpliTaq™ DNA-Polymerase</i> | Applied Biosystems (Perkin Elmer), Weiterstadt |
| <i>Lysozym (Muramidase)</i> | Serva, Heidelberg |
| <i>Proteinase K</i> | Merck, Darmstadt |

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Die in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendeten Primer wurden von der Firma ARK Scientific GmbH, Darmstadt hergestellt. Die Oligonukleotidfolge und die Zielregionen der Primer werden im Folgenden aufgeführt. Es handelt sich jeweils um degenerierte Primer, die sich durch ein Gemisch von verschiedenen Basen an bestimmten Positionen auszeichnen und damit zur Analyse verschiedener Bakterienstämme einsetzbar sind. Neben den üblichen Abkürzungen wurden die folgenden Buchstabenkürzel verwendet: M = C/A, K = G/T, R = A/G, W = A/T, S = G/C, alle im molaren Verhältnis 1:1.

2.1.5.1 Amplifikations- und Sequenzierungsprimer der 16S-rDNA

| | |
|---------------|--|
| SSU bact 27f | 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3' (<i>E. coli</i> Position 8-27 16S-rDNA), (10) |
| SSU bact 519r | 5'- GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3' (<i>E. coli</i> Position 536-519 16S-rDNA) |

2.1.5.2 Amplifikations- und Sequenzierungsprimer der 23S-rDNA

| | |
|----------------|---|
| LSU bact 1399f | 5'- GAT GGG AAR CWG GTT AAT ATT CC -3' (<i>E. coli</i> Position 1399-1421 23S-rDNA) |
| LSU bact 1602r | 5'- CAC CTG TGT CGG TTT SGG TA -3' (<i>E. coli</i> Position 1602-1617 23S-rDNA) |

2.1.6 Längenstandart

| | |
|------------------------|--|
| <i>1 Kb DNA Ladder</i> | Life Technologies (BRL Bethesda Research Laboratories), Karlsruhe |
|------------------------|--|

2.1.7 Nährmedien

Die Zusammensetzung des eingesetzten Schokoladenagar enthält 5% defibriniertes Blut. Alle Lösungen wurden autoklaviert (25 Minuten, 120° Celsius). Beim Einsatz davon abweichender Nährmedien wurden die Empfehlungen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) berücksichtigt (16).

2.1.8 Bakterienstämme

Insgesamt wurden 94 Stämme der Genera *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* zur vergleichenden DNA-Sequenzanalyse untersucht (siehe Tabelle 2-1).

Tab. 2-1 Untersuchte Isolate der Genera *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae*: 5'-16S-rDNA (16S) und 5'-23S-rDNA (23S)

| Spezies | Stammsammlung | EMBL Accession Nummer (16S/23S) |
|----------------------------------|---|---|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | DSM ^f 30007 ^{T a} , LMG ^g 994 ^b | AJ247197/AF124611, AJ247198/N. D. ^d |
| <i>A. calcoaceticus</i> | DSM 30006 ^T | AJ247199/AF124612 |
| <i>A. haemolyticus</i> | DSM 6962 ^T , LMG 1033 | AJ247200/AF124613, AJ247201/N. D. |
| <i>A. johnsonii</i> | DSM 6963 ^T , LMG 10584 | AJ247202/AF124614, AJ247203/AF242446 |
| <i>A. junii</i> | DSM 6964 ^T , LMG 10577 | AJ247204/AF124615, -/- ^c |
| <i>A. lwoffii</i> | DSM 2403 ^T , LMG 1134, LMG 1138, LMG 1154, LMG 1299, LMG 1300 | AJ247205/AF124616, -/-, AJ247207/AJ242449, AJ247206/AJ242448, N. D./-, AJ247208/- |
| <i>A. radioresistens</i> | DSM 6976 ^T , LMG 10614 | AJ247209/AF124617, AJ247210/AJ242450 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | DSM 30191 ^T | AJ247211/AF124618 |
| <i>Eikenella corrodens</i> | DSM 8340 ^T , LMG 15557, Oslo ^h 31745/80 | AJ247212/AF124619 -/-, AJ247213/- |
| <i>Iodobacter fluviatilis</i> | DSM 3764 ^T | AJ247214/AF124620 |

Fortsetzung nächste Seite

Tab. 2-1 Untersuchte Isolate der Genera *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae*: (Fortsetzung)

| Spezies | Stammsammlung | EMBL Accession Nummer (16S/23S) |
|--|---|---|
| <i>Kingella denitrificans</i> | ATCC ⁱ 33394 ^T , NCTC ^j 10997 | N. D./AJ228757, AJ247215/AJ242451 |
| <i>K. kingae</i> | DSM 7536 ^T | AJ247216/AF124626 |
| <i>K. oralis</i> | ATCC 51147 ^T | AJ247217/AF124627 |
| <i>Moraxella (Branhamella) catharralis</i> | ATCC 25238 ^T , LMG 1133 | AJ247218/AJ228758, AJ247219/AJ242452 |
| <i>M. (B.) caviae</i> | ATCC 14659 ^T , CCUG ^k 355 | AJ247220/AF124637, –/N. D. |
| <i>M. (B.) cuniculi</i> | LMG 8382 ^T , CCUG 27179 | N. D./AJ228759, AJ247221/N. D. |
| <i>M. (B.) ovis</i> | LMG 8381 ^T , ATCC 33078 | AJ247222/AJ228760, –/– |
| <i>Moraxella (Moraxella) atlantae</i> | LMG 5133 ^T , CDC ^l 5118 | N. D./AF124638, N. D./AJ242453 |
| <i>M. (M.) bovis</i> | LMG 986 ^T , LMG 1006 | AJ247223/AF124639, AJ247224/AJ242454 |
| <i>M. (M.) canis</i> | LMG 11194 ^T | AJ247225/AF124640 |
| <i>M. (M.) caprae</i> | NCTC 12877 ^T | N. D./AF124641 |
| <i>M. (M.) equi</i> | LMG 5315 ^T , ATCC 25576 | AJ247226/AF124642, –/N. D. |
| <i>M. (M.) lacunata</i> ^o | ATCC 11748 ^T , ATCC 17956, ATCC 17967, LMG 1008 | AJ247228/AJ242455, –/AJ242456, AJ247227/AF124643, –/AJ242457 |
| <i>M. (M.) lincolnii</i> | LMG 5127 ^T | AJ247229/AF124644 |
| <i>M. (M.) nonliquefaciens</i> | DSM 6360 ^T , NCTC 7784, LMG 1045 | AJ247230/AF124645, –/–, AJ247231/N. D. |
| <i>M. (M.) osloensis</i> | LMG 5131 ^T , LMG 6916 | AJ247232/AF124646, AJ247233/N. D. |
| <i>Neisseria animalis</i> | NCTC 10212 ^T , ATCC 19573 | AJ247234/AF124628, –/– |
| <i>N. canis</i> | LMG 8383 ^T | AJ247235/AJ228761 |

Fortsetzung nächste Seite

Tab. 2-1 Untersuchte Isolate der Genera *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae*: (Fortsetzung)

| Spezies | Stammsammlung | EMBL Accession Nummer (16S/23S) |
|--|--|---|
| <i>Neisseria cinerea</i> | DSM 4630 ^T , LMG 8380 | AJ247236/AJ228762, -/- |
| <i>N. elongata</i> subsp. ^c <i>elongata</i> | LMG 5124 ^T | AJ247252/AJ228763 |
| <i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i> | NCTC 11050 ^T | AJ247253/AF124634 |
| <i>N. elongata</i> subsp. <i>nitroreducens</i> | ATCC 49377 ^T , ATCC 49378 | AJ247254/AF124635, -/- |
| <i>N. flava</i> | Berger ^m 122 | AJ247237/AF124629 |
| <i>N. flavescens</i> | ATCC 13115 ^T , LMG 5297 | N. D./-, N. D./AJ228764 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | DSM 9188 ^T , DSM 9189, Wue ⁿ 799, Wue 920 | AJ247238/AJ228765, AJ247239/-, -/-, -/- |
| <i>N. iguanae</i> | ATCC 51483 ^T | AJ247240/AF124630 |
| <i>N. lactamica</i> | DSM 4691 ^T , Berger 116 | AJ247241/AJ228766, -/- |
| <i>N. macacae</i> | ATCC 33926 ^T | AJ247243/AF124631 |
| <i>N. meningitidis</i> | DSM 10036 ^T , 2120, 25/634, 264/93, ATCC 13102, ATCC 35559, BZ163, H41/88, H44/76, MC58, Z2491, Z6422 | AJ247244/AJ228767, N. D./-, -/-, -/-, N. D./AJ242458, AJ247245/AJ242459, -/-, N. D./-, N. D./-, -/-, -/-, N. D./- |
| <i>N. mucosa</i> subsp. <i>heidelbergiensis</i> | ATCC 25999 ^T , Berger 114, LMG 5136 2 | AJ247258/AJ242462, -/-, AJ247260/N. D. |
| <i>N. mucosa</i> subsp. <i>mucosa</i> | ATCC 19696 ^T , Berger 112, DSM 4631 | AJ247257/AJ242460, -/-, AJ247255/AJ228768 |
| <i>N. perflava</i> | LMG 5284 ^T , Berger 120 | AJ247246/AF124632, -/- |
| <i>N. polysaccharea</i> | ATCC 43768 ^T | N. D./AJ228769 |
| <i>N. sicca</i> | LMG 5290 ^T | AJ247248/AJ228770 |
| <i>N. subflava</i> | LMG 5313 ^T | AJ247249/AJ228771 |
| <i>N. weaveri</i> [Anderson] | ATCC 51223 ^T | AJ247250/AJ228772 |
| <i>N. weaveri</i> [Holmes] | LMG 5135 ^T , ATCC 51462 | AJ247251/AF124633, -/- |

Fortsetzung nächste Seite

Tab. 2-1 Untersuchte Isolate der Genera *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae*: (Fortsetzung)

| Spezies | Stammsammlung | EMBL Accession Nummer (16S/23S) |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Oligella ureolytica</i> | LMG 6519 ^T | AJ247261/AF124621 |
| <i>O. urethralis</i> | DSM 7531 ^T , Oslo 1098 | AJ247262/AF124622, AJ247263/N. D |
| <i>Psychrobacter immobilis</i> | DSM 7229 ^T | AJ247264/AF124623 |
| <i>P. phenylpyruvicus</i> | Oslo A9911 | AJ247266/AJ242462 |
| <i>Suttonella indologenes</i> | DSM 8309 ^T | AJ247267/AF124625 |

^a T – Typstamm der Spezies

^b Stammsammlungsnummer – gleicher Stamm einer anderen Stammsammlung

^c Sequenz des Bakterienstamm wurde bestimmt, die Einreichung der Daten zu EMBL aber nicht vollzogen, da entweder eine Identität mit einer anderen Sequenz vorlag oder die Sequenz bereits eingereicht wurde

^d N. D. – Sequenz nicht bestimmt

^e subsp. – Subspezies

^f DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ)

^g LMG/BCCM – Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms)

^h Oslo – Oslo Strain Collection

ⁱ ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

^j NCTC – National Collections of Type Cultures, Colindale, Großbritannien

^k CCUG – Culture Collection University of Göteborg, Schweden

^l CDC – Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

^m Berger – *Neisseriaceae* Stammsammlung Prof. em. Dr. med. Ulrich Berger, Universität Heidelberg

ⁿ Wue – Stammsammlung Mikrobiologisches Institut der Universität Würzburg

^o *M. (M.) lacunata* ist in mindestens 2 Subspezies unterteilbar: *M. lacunata* subsp. *lacunata* (small colony variant, group II) und *M. lacunata* subsp. *liquefaciens* (large colony variant, group I), (57)

2.1.9 Software & Internetanwendungen

Die Auswertung und manuelle Editierung der DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe des *Sequence Navigator* (Version 1.01) vorgenommen. Zur automatischen Erstellung von Alignments wurde das Programm *MegAlign* aus dem *Lasergene* Softwarepaket (Version 1.6) benutzt (76). Das Programmpaket *Lasergene* wurde auch zur Generierung phylogenetischer Stammbäume verwendet. Über das Internet wurde auf das Programm *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) zugegriffen (54).

| | |
|--|--|
| <i>Microsoft Access 97 Datenbank RIDOM_TOOL</i> | Microsoft Corporation (Redmond, USA) |
| <i>Lasergene Softwarepaket: Edit Seq, MegAlign (Sequenzbearbeitung, Vers. 1.6)</i> | DNA Star, Madison (Wisconsin, USA) |
| <i>mSQL-Datenbank</i> | Hughes Technologies, Gold Coast (Queensland, AU) |
| <i>Reference Manager (Literaturdatenverwaltung, Version 8.01)</i> | Research Information Systems, Thomson ISI (Philadelphia, USA) |
| <i>Sequence Navigator (Sequenzanalyse, Version 1.01)</i> | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| <i>Genbank/ BLAST</i> | National Center for Biotechnology Information, NCBI (Bethesda, USA) |

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methodik

2.2.1.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden steril durchgeführt. Medien, Lösungen und Plastikgeräte wurden autoklaviert eingesetzt. Routinemäßig wurden die angelieferten Referenzstämme und Isolate in Petrischalen auf Schokoladenagar kultiviert. Nach Anweisung der jeweiligen Bezugsquellen erfolgte die Anzucht der Stämme in Brutschränken bei Temperaturen von 22° Celsius, 28° Celsius und 37° Celsius, sowie entsprechender Atmosphärenzusammensetzung (16). Nach einer Wachstumsphase von 24 Stunden wurden von jeder Kultur 2 Proben entnommen. Die Aufbewahrung dieser Proben erfolgte sowohl bei –80° Celsius als auch in flüssigem Stickstoff bei

–200° Celsius. Sie stellen die Referenz der institutseigenen Stammsammlung dar. Alle untersuchten Isolate wurden zusätzlich durch konventionelle biochemische Methoden identifiziert (48).

2.2.1.2 Gram-Färbung

Jedes Isolat wurde einer Differentialfärbung nach Gram unterzogen (24). Das Probenmaterial aus der Kulturschale des jeweiligen angezüchteten Stamms wurde mit einigen Tropfen Natrium-Chlorid auf einem Objektträger vermischt und hitzefixiert. Es folgte die Überschichtung mit basischem Kristallviolett. Durch den anschließenden Spülvorgang mit Lugolscher Lösung wurde ein Beizeffekt erreicht. Der Entfärbevorgang mit 96%-igem Äthylalkohol wurde mit Leitungswasser unterbrochen. Aufgetragenes Safranin wurde abgespült und das Präparat dann luftgetrocknet (48). Um die Präparate als digitale Bilddokumente in der RIDOM Datenbank zur Verfügung zu stellen, wurden sie bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Das Diapositiv wurde später mit dem Polaroid SprintScan erfasst und in ein digitales Bildformat (JPEG) umgewandelt.

2.2.2 *Molekularbiologische Methoden*

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht explizit angegeben, nach dem Labormanual von Sambrook et al. durchgeführt (69).

2.2.2.1 16S- und 23S-rDNA Sequenzierung (vorbereitende Arbeitsschritte)

2.2.2.1.1 DNA-Präparation

Die Isolation genomischer DNA erfolgte durch eine sogenannte Cetylhexatrimethylammoniumbromid (CTAB)-Extraktion. Bei dieser Methode werden störende Polysaccharide und Proteine durch Komplexbildung mit CTAB abgetrennt (2). Nukleinsäuren bleiben dabei unbeschadet. Proteine, die Nukleinsäuren schädigen können (Nukleasen), werden größtenteils denaturiert. Aus einer Übernachtskultur wurden mehrere Impfösen entnommen, in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und 30 Minuten bei 80° Celsius inkubiert. Es folgte die Zugabe von *Lysozym* (= *Muraminidase*) und ein Inkubationszeitraum von mindestens einer Stunde bei 37° Celsius. Dabei werden die Mukopolysaccharidstrukturen der

Bakterienzellwände gelöst. Zur nachfolgenden Lyse der Bakterienzellen wurde eine Mischung von 10%-igem SDS (Natriumdodecylsulfat) und *Proteinase K* bei 65° Celsius zugegeben. Um Proteine und Polysaccharide zu entfernen, wurde 5 M NaCl-Lösung und eine CTAB-/NaCl-Lösung hinzugegeben und 10 Minuten bei 65° Celsius inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz mit einer Mischung aus Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 24:1) versetzt und für 5 Minuten bei 12000 rpm die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der hochmolekularen DNA versetzte man diesen Überstand mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol. Nach 30 Minuten Zwischenlagerung bei -20° Celsius wurde anschließend 30 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Waschen der DNA erfolgte mit 70%-igem Ethanol. Nach abschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 rpm wurde das DNA-Pellet an der Luft bei 50° Celsius im Heizblock getrocknet und in 20 µL TE-Puffer resuspendiert.

2.2.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten zur Sequenzierung. In sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung der DNA, der Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer und der Synthese der DNA, wird der zwischen den Primern liegende Bereich amplifiziert (67, 71). Der 50 µl Reaktionsansatz zur PCR setzte sich wie folgt zusammen: 2 µl DNA-Probe, 2 µl Primer (5 pmol/ml), 1 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl Puffer II, 0,4 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und 36,6 µl Ampuwa. Die PCR wurde in sogenannter „Hot-Start“ Technik durchgeführt. Das bedeutet, alle Reagenzien, bis auf die hitzestabile *Taq*-Polymerase, wurden zusammengegeben. Die Reaktion wurde auf einem Temperaturniveau von 80° Celsius (10 Minuten) durch die Zugabe von Enzym begonnen. Ein Programm-Zyklus der 25-fach durchlaufen wurde, entsprach den folgenden Phasen: 45 Sekunden Denaturierung bei 94° Celsius, 1 Minute „Annealing“ bei 53° Celsius, 90 Sekunden Extension bei 72° Celsius. Eine finale Extensionsphase von 10 Minuten bei 72° Celsius beendete die Reaktion. Bei jedem PCR-Ansatz wurden zwei Kontrollen mitgeführt: ein Reaktionsansatz ohne Template-DNA als Negativkontrolle, sowie eine Positivkontrolle.

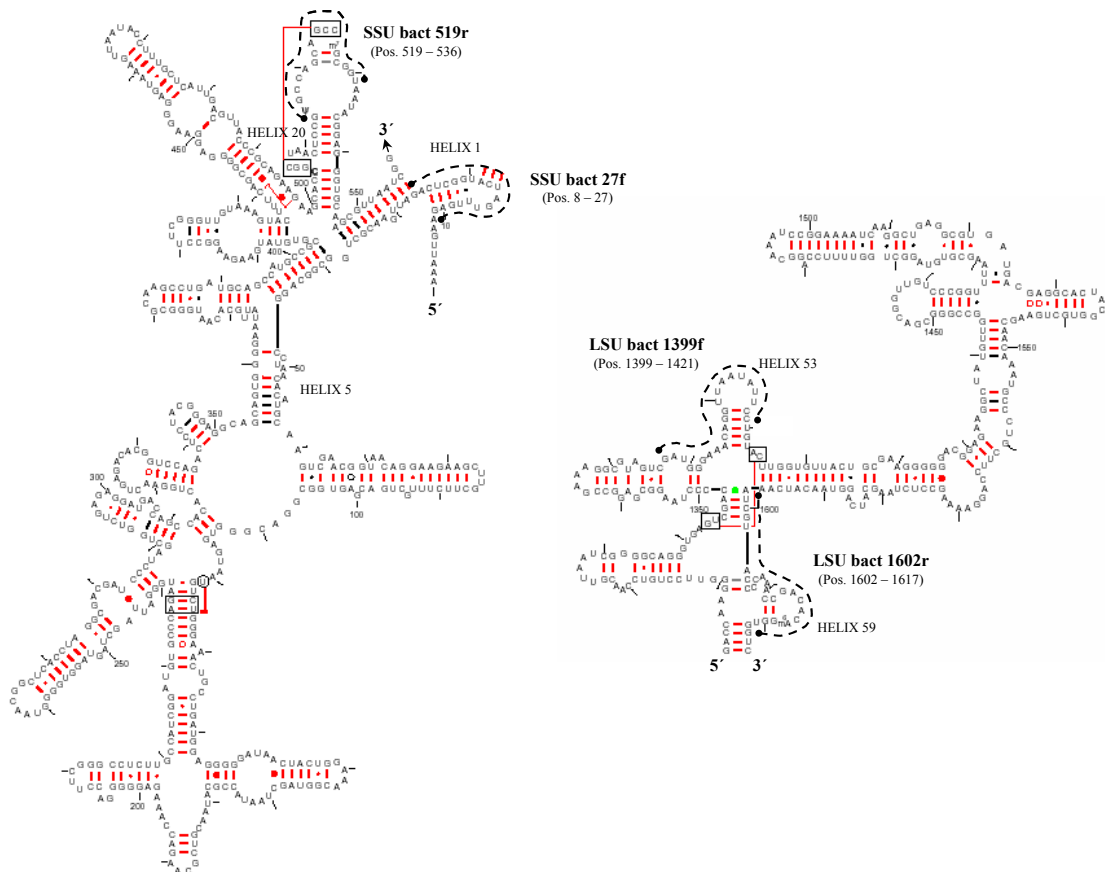


Abb. 2-1 Primer-Zielregionen auf der 16S- und 23S-rDNA: Modell der Sekundärstrukturen von 16S- und 23S-rRNA bei *E. coli* (25). Die gestrichelten Linien markieren die Bindungsregionen der Primer.

2.2.2.1.2.1 16S-rDNA PCR

Die Primer SSU bact 27f („forward“) und SSU bact 519r („reverse“) amplifizieren einen Teilabschnitt auf der ribosomalen 16S-Untereinheit der extrahierten und gereinigten Bakterien-DNA (*E. coli* Positionen 8 – 27 und 536 – 519 der 16S-rDNA). Die Primer-Zielregion ist in Abbildung 2-1 grafisch markiert. Die Benennung der Primer gibt die Position des 3'-Endes am Oligonukleotid auf der 16S-Untereinheit wieder. Bei einem Einsatz von 5 pmol pro Reaktion umfasst das PCR-Produkt einen Abschnitt von 457 bp (Basenpaaren) auf der ribosomalen 16S-Untereinheit (26).

2.2.2.1.2.2 23S-rDNA PCR

Die Zielregion auf der ribosomalen 23S-Untereinheit wurde durch die Oligonukleotide LSU bact 1399f und LSU bact 1602r erschlossen (*E. coli* Positionen 1399 – 1421 und

42 – 23 der 23S-rDNA). Der dort untersuchte Abschnitt umspannt eine Region von 202 bp und ist somit kürzer als die untersuchte Region auf der 16S-rDNA (26).

2.2.2.1.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur qualitativen Kontrolle und zur Quantifizierung der PCR-Ergebnisse erfolgte die Agarosegelelektrophorese im Minigel-System von Biometra (Abmessungen 45 x 80 x 5 mm). Der verwendete Agarosegehalt des Gels richtete sich nach der Molekülgröße der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 1,5% und 2,5%. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld beruht auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA reziprok zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 1 Kb DNA Leiter (Life Technologies) eingesetzt. Ein Aliquot (8 µl) des jeweiligen Ansatzes wurde mit 2 µl des Indikators Methylenblau versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. In 1-fach TBE-Laufpuffer wurde eine Spannung von 80 mV über einen Zeitraum von 20 Minuten angelegt, was einer optimalen Auftrennung im Agarosegel entsprach. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 10 Minuten in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) inkubiert und mit Wasser abgespült. Das Ethidiumbromid interkaliert in Guanin-Cytosin-Paarungen der DNA, wodurch Fluoreszenzlicht abgegeben wird (2). Anschließend konnten die Bandenmuster unter UV-Transillumination bei 312 nm sichtbar gemacht und so zur Dokumentation photographiert werden.

2.2.2.1.4 Ethanol-Ammoniumacetat Fällung

Die PCR-Produkte der Isolate wurden einer Fällungsreaktion unterworfen. Dabei wurde die wässrige Nukleinsäurephase (40 µl) mit dem gleichen Volumen einer 4M Ammoniumacetat-Lösung (pH 4,6) und dem 6-fachen Volumen an 96%-igem Ethanol (240 µl) versetzt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das kristalline Pellet in 1000 µl kühlem Ethanol (70%) gelöst und für 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt und das Pellet abschließend getrocknet und in Ampuwa verdünnt. Der Verdünnungsgrad des Pellet richtet sich nach der Bandenintensität in der Elektrophorese, relativ zum Marker.

2.2.2.1.5 Automatisierte Sequenzierung

Die durchgeführten DNA Sequenzierungen beruhen auf dem Prinzip des Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotid-Verfahren (70). Methodisch besteht die Sequenzierungsreaktion aus der Durchführung einer linearen PCR, bei der jeweils nur ein Oligonukleotid eingesetzt wird. Der Abbruch der Strangpolymerisation erfolgt zufällig durch ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten ddNTP. Dies hat zur Folge, dass es während der Polymerisation an jeder Nukleotidposition statistisch zum Abbruch kommt und daraus die DNA Sequenz ermittelt werden kann. Die 5'-16S-rDNA und die 5'-23S-rDNA PCR-Produkte wurden nach Anweisungen des Herstellers mit Hilfe des *Taq-cycle DyeDeoxy™ Terminator Kit* amplifiziert und im *ABI-Prism™ 377 Sequencer* elektrophoretisch getrennt und detektiert. Für jede Probe wurde die Sequenzierung mit jeweils einem „forward“-Primer und einem „reverse“-Primer durchgeführt. Die Primer SSU bact 27f und SSU bact 519r wurden für die 16S-rDNA verwandt. Bei der Sequenzierung der 23S-rDNA Abschnitte wurden die Primer LSU bact 1399f und LSU bact 1602r eingesetzt. Die 25 Zyklen dieser Sequenzierreaktion setzten sich aus einer Denaturierungsphase von 10 Sekunden bei 96° Celsius, einer „Annealing“-Phase von 5 Sekunden und einer Extensionsphase von 4 Minuten bei 60° Celsius zusammen. Die Temperaturen der „Annealing“-Phasen betragen sowohl bei den 16S-rDNA Primern als auch bei den 23S-rDNA Primern jeweils 53° Celsius. Alle Primer wurden mit einer Menge von 5 pmol eingesetzt. Zum Abschluss wurde das Reaktionsprodukt von den nicht-inkorporierten ddNTPs durch *Centri-Sep™ Spin-Columns* getrennt. Somit konnte die Nukleotidfolge des Produkts durch eine Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) im *ABI-Prism™ 377 Sequencer* bestimmt werden.

2.2.3 Auswertung der Sequenzdaten

Die durch den *ABI-Prism™ 377 Sequencer* ermittelten Rohsequenzen wurden mit der Software *Sequence Navigator* editiert und in der Datenbank RIDOM gesammelt. Eine Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse zwischen einzelnen Stämmen und die Erstellung von „Alignments“ der Speziesgruppen wurde mit dem Programm *MegAlign* realisiert. Dabei baut diese Software auf den Clustal Algorithmus nach der „Neighbor-joining“-Methode auf (68). Die numerische Taxonomie (Phänetik)

zugrundeliegend, wurden die untersuchten Taxa paarweise verglichen und davon Ähnlichkeits- und Distanzwerte abgeleitet.

2.2.4 Datensammlung für das RIDOM-Projekt

Die Auswahl der Mikroorganismen für die Online-Datenbank RIDOM orientierte sich an der aktuell verfügbaren Liste „*Bacterial Nomenclature up-to-date*“ der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (16). Alle dort aufgeführten validierten Taxa sind im „*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*“ validiert (vormals „*International Journal of Systematic Bacteriology*“, 1950-1999) und als Erstveröffentlichung erschienen. Gültige Taxa wurden zusammen mit ihren Synonymen eingetragen. Neben den Sequenzen enthält die Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen. Die Informationen basieren auf der Originalliteratur (4, 6, 33, 35) und dem „*Manual of Clinical Microbiology*“ der American Society of Microbiology (48). Bei Taxa, die bereits vor 1986 beschrieben waren, wurde zusätzlich das „*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*“ als Referenzliteratur genutzt (40). Die Beschreibung jedes einzelnen Taxons umfasst makro- und mikroskopische Morphologie, Physiologie, differentialdiagnostische Kriterien, Pathogenität und die Verbreitung des Mikroorganismus. Dabei verwendete Fachtermini entsprechen sowohl der „*International Nomenclature of Diseases*“ als auch der „*International Classification of Diseases*“ (15, 89). Sie können als Schlagwörter für Abfragen anderer Datenbanken, wie zum Beispiel *Medline*, verwendet werden. Die Erkrankungen sind hierarchisch entsprechend dem Organsystembefall in Anlehnung an die „*Medical Subject Headings (MeSH)-Tree-Structures*“ organisiert (49). Von jeder Spezies und Subspezies wurde zusätzlich jeweils ein mikro- und makroskopisches Diapositiv angefertigt und mit dem *Polaroid Sprint-Scan* digitalisiert. Mikroskopische Aufnahmen erfolgten nach Kulturaustrich auf Objektträger und Gram-Färbung. Makroskopisch sichtbare Kolonien wurden mit einer Spiegelreflexkamera fotografiert. Alle Rohdaten, wie Speziescharakterisierungen, bibliographische Verweise und digitalisierte Aufnahmen, wurden zunächst anhand der Datenbank RIDOM_Tool gesammelt und nach Weiterverarbeitung in die eigentliche *mySQL* Datenbank RIDOM exportiert.

2.2.5 Software-Entwicklung

2.2.5.1 Programmierung der Datenbank RIDOM_Tool

Datenbanken sind Systeme zur Speicherung großer Datenbestände, mit dem Ziel, optimale Informationsgewinnung bei sehr kurzen Zugriffszeiten zu ermöglichen. Ähnlich einer Tabellenkalkulation werden sämtliche Daten in Datenbanken immer in Form von Tabellen abgebildet. Dem Benutzer werden diese Daten in optisch aufbereitetem Format als Berichte präsentiert. Im Rahmen der umfangreichen Datensammlung und der Generierung von Basensequenzen wurde deshalb die Datenbank RIDOM_Tool geschaffen. Sie ermöglicht auf Isolate bezogene Informationen komfortabel zu verwalten. Die Anwendung sollte einfach bedienbar sein und dem Benutzer eine schnelle Einarbeitung ermöglichen. Dabei wurde die relationale Datenbank *Microsoft Access 97* unter dem Betriebssystem *Microsoft Windows 98* als Entwicklungsumgebung gewählt. *Microsoft Visual Basic* diente dabei als Programmiersprache. Konzeptionell bestehen relationale Datenbanken aus mehreren Tabellen. Die Datenmengen können dadurch gering gehalten werden, da dieselben immer wiederkehrenden Datenbestandteile nicht mehrfach in Tabellen gespeichert werden müssen. Jede Zeile einer Tabelle der relationalen Datenbank kommt nur einmal vor. Diese Einmaligkeit wird durch einen Primärschlüssel erreicht, bei dem niemals eine andere Zeile vorhanden sein darf, die denselben Wert für den Primärschlüssel beinhaltet. Mit sogenannten Schlüsselfeldern werden zwischen den Tabellen Verknüpfungen erstellt. Damit werden Redundanzen vermieden und die Datenbank normalisiert (81). Mit RIDOM_Tool können unter anderem phylogenetische Informationen, Anzuchtbedingungen, Methoden konventioneller Differenzierung und die generierten Sequenzdaten archiviert werden. Neben der Verwaltung digitaler Bildinformation können mit der erstellten Datenbank wichtige Internetquellen direkt angesteuert werden. Eine weitere Schnittstelle bietet die Möglichkeit, aus der Literaturdatenbank *Reference Manager* recherchierte Artikel aus der *Medline* zu importieren. Außerdem wurde eine komfortable Methode gefunden, ganze Sequenzen in ein Format zu konvertieren, die es erlaubt, automatisiert mit der Software *Sequin* zu kommunizieren. Der Transfer von Gensequenzen ganzer Genera zur Akkreditierung in herkömmlichen Genomdatenbanken, wie zum Beispiel EMBL, wird damit ermöglicht.

Eine weitere Option ist die automatisierte Übertragung aller gesammelten Daten in die Internetdatenbank RIDOM. Somit wird es in Zukunft möglich, an mehreren Genera gleichzeitig und autark voneinander zu arbeiten. Ein weiterer Vorteil der von RIDOM unabhängigen Datensammlung ist in der Qualitätssicherung zu sehen. Erst vollständig überprüfte Datenbestände gelangen in die Internetdatenbank RIDOM und tragen so zur Beibehaltung des hohen Qualitätsniveaus bei.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Sequenzanalyse

Von 94 Isolaten der Familien *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* wurde eine 202 Nukleotide umfassende Region des 23S-rRNA Gens untersucht. Eine Region mit 457 bp (Basenpaaren) von insgesamt 90 Isolaten wurde von der 16S-rDNA sequenziert (siehe vorhergehendes Kapitel Tabelle 2-1). Im Vergleich zu den Typstämmen der Genera *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Neisseria* wurden für jede Spezies gemittelt 30 polymorphe Positionen innerhalb der 16S-rDNA beobachtet. Bei der 202 Nukleotide umfassenden Region auf dem 23S Gen waren es gemittelt nur 11 polymorphe Positionen (siehe dazu Tabelle 3-2). Einige der polymorphen Positionen können als Spezies-spezifisch angesehen werden. Eine Teilmenge dieser polymorphen Positionen war in jedem der untersuchten Isolate zu finden. Dies kann als konservierter Polymorphismus gewertet werden. Auffällig ist, dass Unterschiede in der Diversifität innerhalb einer Spezies-Gruppe beobachtet wurden, abhängig davon, welches Gen und damit welche Zielregion betrachtet wurde. Bei *Neisseria mucosa* wurden vier bzw. drei Sequevar-Varianten für das 16S Gen und das 23S Gen identifiziert. Im Fall von *Moraxella lacunata* waren es dementsprechend zwei bzw. drei Sequevar-Varianten. Die Komplexität der Isolate von *Neisseria meningitidis* und *Neisseria weaveri* war ähnlich, wie man am Beispiel der verschiedenen Sequenzen auf beiden untersuchten Genabschnitten feststellen kann. *Acinetobacter lwoffii*, *Moraxella lacunata*, *Moraxella catharralis* und *Neisseria mucosa* zeigten die höchsten Intraspezies-Variationen für die untersuchten Regionen auf der 16S- bzw. 23S-rDNA (Tabelle 3-1).

Tab. 3-1 Spezies mit höchster Intraspezies-Variation (in %) auf dem 16S-/ 23S-Gen

| Spezies | 16S | 23S |
|------------------------------|--------|--------|
| <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 4,35 % | 3,40 % |
| <i>Moraxella lacunata</i> | 1,66 % | 2,49 % |
| <i>Moraxella catharralis</i> | 0,55 % | 2,25 % |
| <i>Neisseria mucosa</i> | 1,64 % | 1,05 % |

Tab. 3-2 Analyse der Polymorphismen: 16S- und 23S-rRNA Gen der Spezies *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Neisseria*

| Spezies ^a | Anzahl Isolate | Anzahl Sequevar-Varianten | | Anzahl polymorpher Positionen | | Speziesspezifische Polymorphismen ^b | | Speziesspez. kons. Polymorphismen ^c | |
|---|----------------|---------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|--|------------------|--|------------------|
| | | 16S | 23S | 16S | 23S | 16S | 23S | 16S | 23S |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 | 1 | 1 | 22 | 8 | 0 ^d | 5 | – ^e | – |
| <i>A. haemolyticus</i> | 1 | 1 | 1 | 20 | 7 | 1 | 0 | – | – |
| <i>A. johnsonii</i> | 2 | 2 | 1 | 26 | 9 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| <i>A. junii</i> | 2 | 1 | 1 | 19 | 8 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| <i>A. lwoffii</i> | 5 | 3 | 2 | 47 | 17 | 15 | 2 | 0 | 0 |
| <i>A. radioresistens</i> | 2 | 2 | 2 | 33 | 21 | 7 | 6 | 7 | 6 |
| ACINETOBACTER (ARITH. MITTEL ± STANDARDABW.) | | 1.67±0.82 | 1.33±0.52 | 27.83±10.69 | 11.67±5.85 | 4.50±5.68 | 2.67±2.39 | 2.50±3.11 | 2.25±2.63 |
| <i>Moraxella (B.) catharralis</i> | 2 | 2 | 2 | 37 | 19 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| <i>M. (B.) caviae</i> | 1 | 1 | 1 | 40 | 18 | 2 | 3 | – | – |
| <i>M. (B.) ovis</i> | 1 | 1 | 1 | 29 | 12 | 3 | 1 | – | – |
| <i>M. (B.) bovis</i> | 2 | 1 | 2 | 25 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. (M.) canis</i> | 1 | 1 | 1 | 38 | 19 | 3 | 1 | – | – |
| <i>M. (M.) equi</i> | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | – | – |
| <i>M. (M.) lacunata</i> | 3 | 2 | 3 | 1 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. (M.) lincolnii</i> | 1 | 1 | 1 | 45 | 26 | 12 | 8 | – | – |
| <i>M. (M.) nonliquefaciens</i> | 2 | 1 | 1 | 7 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. (M.) osloensis</i> | 1 | 1 | 1 | 58 | 15 | 19 | 2 | – | – |
| MORAXELLA (ARITH. MITTEL ± STANDARDABW.) | | 1.20±0.42 | 1.40±0.70 | 28.20±19.35 | 14.00±7.54 | 4.2±6.29 | 1.50±2.51 | 0.25±0.50 | 0.00±0.00 |
| <i>Neisseria animalis</i> | 2 | 1 | 1 | 40 | 19 | 1 | 4 | 1 | 4 |
| <i>N. canis</i> | 1 | 1 | 1 | 43 | 7 | 10 | 3 | – | – |
| <i>N. cinerea</i> | 2 | 1 | 1 | 11 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>N. elongata</i> | 4 | 3 | 2 | 52 | 7 | 5 | 1 | 4 | 0 |
| subsp. <i>elongata</i> | 1 | 1 | 1 | 51 | 6 | | | | |
| subsp. <i>glyxolytica</i> | 1 | 1 | 1 | 51 | 6 | | | | |
| subsp. <i>nitroreducens</i> | 2 | 1 | 1 | 50 | 6 | | | | |

Fortsetzung nächste Seite

Tab. 3-2 Analyse der Polymorphismen: (Fortsetzung)

| Spezies | Anzahl Isolate | Anzahl Sequevar-Varianten | | Anzahl polymorpher Positionen | | Speziesspezifische Polymorphismen ^b | | Speziesspez. kons. Polymorphismen ^c | |
|---|----------------|---------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|--|------------------|--|------------------|
| | | 16S | 23S | 16S | 23S | 16S | 23S | 16S | 23S |
| <i>N. flava</i> | 1 | 1 | 1 | 26 | 5 | 1 | 1 | – | – |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | – | – |
| <i>N. iguanae</i> | 1 | 1 | 1 | 30 | 35 | 6 | 15 | – | – |
| <i>N. lactamica</i> | 2 | 2 | 1 | 36 | 3 | 3 | 1 | 0 | 1 |
| <i>N. macacae</i> | 1 | 1 | 1 | 35 | 5 | 0 | 0 | – | – |
| <i>N. meningitidis</i> | 7 | 2 | 2 | 12 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>N. mucosa</i> | 5 | 4 | 3 | 58 | 8 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| subsp. <i>heidelbergensis</i> | 2 | 2 | 1 | 51 | 6 | | | | |
| subsp. <i>mucosa</i> | 3 | 2 | 2 | 36 | 7 | | | | |
| <i>N. perflava</i> | 2 | 2 | 1 | 25 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>N. sicca</i> | 1 | 1 | 1 | 35 | 7 | 0 | 1 | – | – |
| <i>N. subflava</i> | 1 | 1 | 1 | 32 | 4 | 0 | 0 | – | – |
| <i>N. weaveri</i> | 3 | 1 | 1 | 31 | 17 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| NEISSERIA (ARITH. MITTEL ± STANDARDABW.) | | 1.54±0.92 | 1.27±0.59 | 31.13±15.06 | 8.67±8.83 | 2.13±2.95 | 1.80±3.84 | 0.75±1.39 | 0.63±1.41 |
| GESAMT (ARITH. MITTEL ± STANDARDABW.) | | 1.45±0.77 | 1.32±0.60 | 29.55±8.06 | 10.97±8.06 | 3.26±4.75 | 1.87±3.14 | 1.06±1.91 | 0.88±1.76 |

^a *Acinetobacter* Spezies wurden mit *A. calcoaceticus* DSM 30006^T verglichen. Die Spezies *Moraxella* mit *Moraxella (M.) lacunata* ATCC 17967^T und *Neisseria* Spezies mit *N. gonorrhoeae* DSM 9188^T

^b Genetische Polymorphismen bei sich entsprechenden Isolaten

^c Genetische Polymorphismen die in jedem Isolat der Spezies gefunden wurden

^d 0 Keine konservierten genetischen Polymorphismen

^e – Keine konservierten genetischen Polymorphismen, obwohl speziesspezifische Polymorphismen entdeckt wurden

Die Isolate der Gattung *Acinetobacter* zeigten insgesamt die höchsten gemittelten Intraspezies-Variationen, gefolgt von *Moraxella* und *Neisseria* (Tabelle 3-3).

Tab. 3-3 Gattungen mit höchster Intraspezies-Variation auf dem 16S und 23S Gen

| Gattung | 16S | 23S |
|------------------------|--------|--------|
| <i>Acinetobacter</i> * | 2,10 % | 1,76 % |
| <i>Moraxella</i> * | 0,90 % | 1,50 % |
| <i>Neisseria</i> * | 0,36 % | 0,42 % |

* Gemittelte Werte aller untersuchten Isolate der Spezies

Die Interspezies-Variation innerhalb eines Genus bewegte sich bei den *Moraxella* subsp. zwischen 6,1% und 6,2%. Für die *Acinetobacter* subsp. waren es zwischen 4,7% und 4,9% (Tabelle 3-4).

Tab. 3-4 Interspezies-Variationen innerhalb eines Genus

| | <i>Acinetobacter</i> | <i>Moraxella</i> | <i>Neisseria</i> | |
|----------------------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|
| <i>Acinetobacter</i> | 4,9 % | 23,7 % | 34,0 % | 23S-rDNA |
| <i>Moraxella</i> | | 6,1 % | 39,2 % | |
| <i>Neisseria</i> | | | 3,8 % | |
| <i>Acinetobacter</i> | 4,7 % | | | 16S-rDNA |
| <i>Moraxella</i> | 14,1 % | 6,2 % | | |
| <i>Neisseria</i> | 20,3 % | 20,0 % | 5,9 % | |

Die Interspezies-Variation zwischen den Genera reichte von 39,2% für die 23S-rRNA Gensequenzen der *Moraxella* subsp. und *Neisseria* subsp. und bis zu 14,1% für die 16S-rRNA Gensequenzen von *Acinetobacter* subsp. und *Moraxella* subsp. (Tabelle 3-4). Die Variationen aller untersuchten Isolate auf Interspezies- und Intraspezies-Ebene sind für die untersuchten Regionen auf dem 16S- und dem 23S-rDNA Gen im Anhang detailliert dargestellt (Siehe dazu Tabelle 8-1).

3.2 Sequenz-Alignment der 16S- und 23S-rDNA

Um die Beziehungen zwischen den Spezies auf molekularer Ebene zu demonstrieren, wurde ein DNA-Sequenz-Alignment durchgeführt und mit den gewonnenen Daten eine sogenannte Distance-Matrix für Sequenzpaarungen erstellt. Das Verfahren wurde sowohl für die 16S-rDNA (Abb. 3-1) als auch für die 23S-rDNA (Abb. 3-2) durchgeführt. Die auf Basis des „Neighbor-Joining“-Algorithmus von Saitou und Nei generierten Bäume teilen die in der Arbeit untersuchten Spezies in zwei große Gruppen

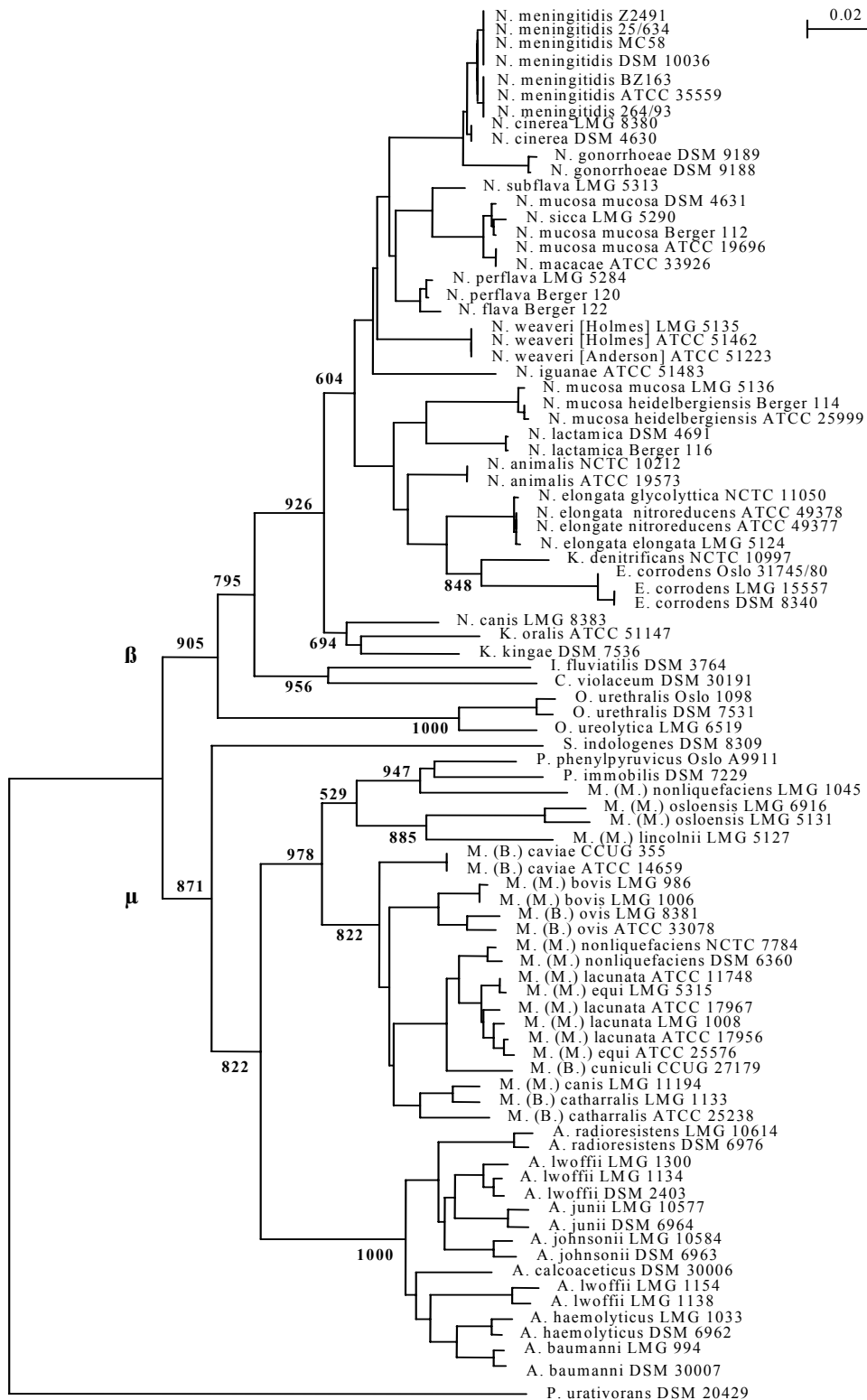


Abb. 3–1 16S rDNA Sequenz-Alignment Baum: Gruppierung von 45 Spezies der *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* (insgesamt 89 Isolate). Der Baum basiert auf der sogenannten „neighbor joining“-Methode und wurde anhand der 457 bp langen DNA-Sequenz erstellt. Die Stabilität der Gruppierungsmuster wurde mittels 1000 „Bootstrapping“-Durchgängen evaluiert. Die Werte dazu stehen an den Astverzweigungen.

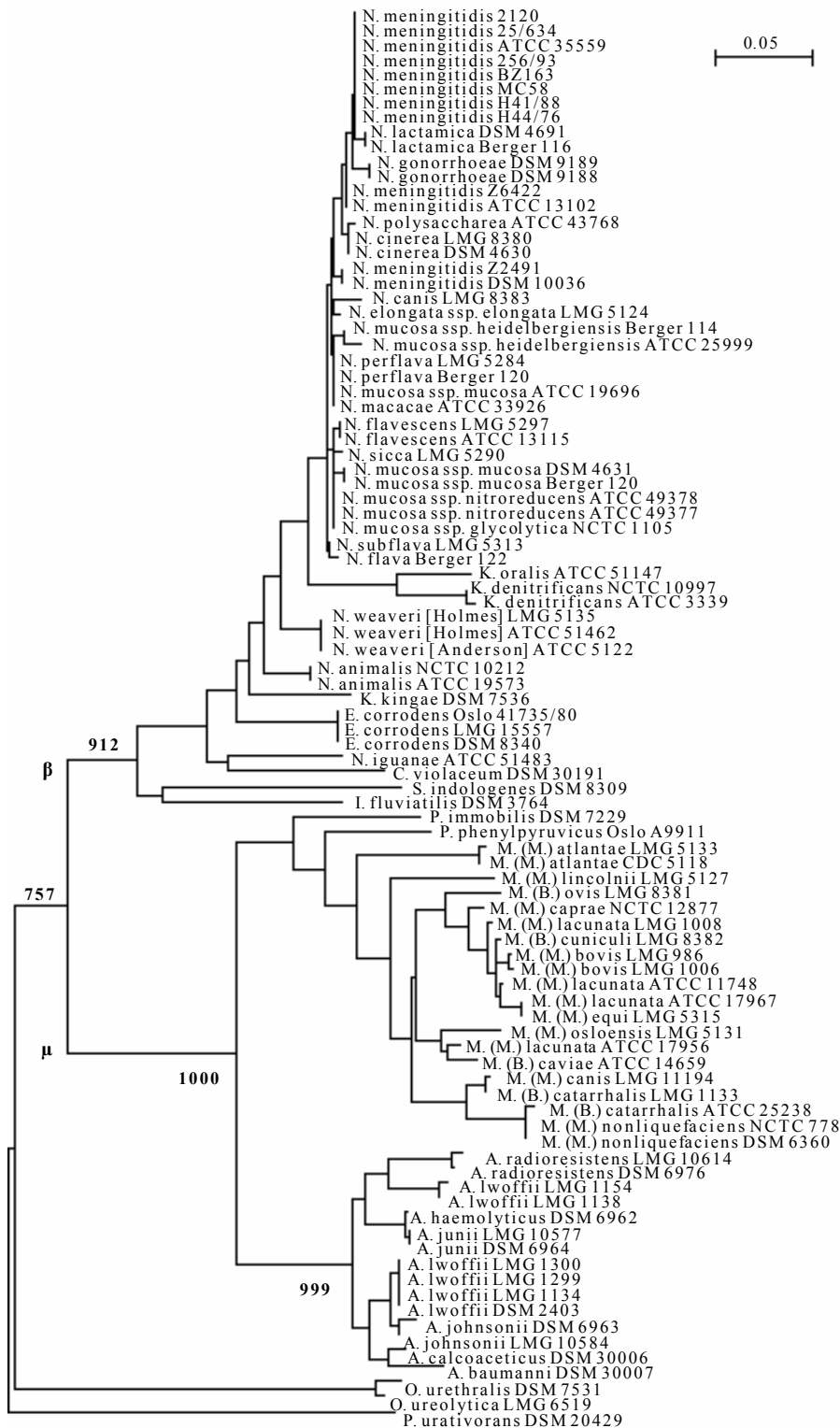


Abb. 3–2 23S rDNA Sequenz-Alignment Baum: Gruppierung von 50 Spezies der *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* (insgesamt 93 Isolate). Der Baum wurde mit Hilfe der „neighbor joining“-Methode erstellt und basiert auf der untersuchten DNA Sequenz (201 bp) auf dem 23S-rRNA Gen. Die Stabilität der Gruppierungsmuster wurde mittels 1000 „Bootstrapping“-Durchgängen evaluiert. Die Werte dazu stehen an den Astverzweigungen.

ein (68). Eine Gruppe enthält alle Isolate der Genera *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Iodobacter*, *Kingella*, *Neisseria* und *Oligella* und bildet somit die β -Subklasse der *Proteobacteria* ab. Die zweite große Gruppe repräsentiert mit allen Isolaten der Genera *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* und *Suttonella* die μ -Subklasse der *Proteobacteria*. Auffallend ist die Tatsache, dass *Oligella* subsp. aufgrund der untersuchten 16S-rDNA Sequenz innerhalb der β -Subklasse der Proteobakterien einzuordnen ist, durch die 23S-rDNA Daten aber einer anderen separaten Gruppe zugehörig scheint. *Neisseria macacae* und *Neisseria mucosa* subsp. *mucosa* (ATCC 19696) zeigen identische 16S- und 23S-rDNA Sequenzen. Die 23S Gene von *Moraxella equi* und *Moraxella lacunata* (ATCC 17967) sowie von *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* und *Neisseria elongata* ssp. *nitroreducens* besitzen in der untersuchten Region ebenfalls identische Sequenzen. Die Gruppierungen der Spezies *Acinetobacter lwoffii*, *Moraxella lacunata* und *Neisseria mucosa* war für beide der untersuchten Abschnitte auf der 16S- und 23S-rDNA unterschiedlich. Mit Hilfe der 23S-rDNA Sequenzdaten konnten, mit Ausnahme von *Neisseria meningitidis*, alle Isolate einer gemeinsamen Gruppe zugeteilt werden (Tab. 3-2). Die betreffenden Isolate von *Neisseria meningitidis* zeigten dabei weder eine Gruppierung nach Serotypen noch nach Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MEE) (66, 87). Im Fall des Genus *Moraxella* konnte, bezüglich der Subgenera *Branhamella* und *Moraxella*, in beiden Alignments keine Gruppierung festgestellt werden (Tab. 3-1 und Tab. 3-2).

3.3 Evaluation generierter Sequenzen mit GenBank

Um einen Eindruck zur Qualität bestehender Sequenzdaten und den in dieser Arbeit neu generierten zu erhalten, wurde stellvertretend die Datenbank EMBL herangezogen (11). Diese Sequenzdatenbank enthielt 19 Sequenzen derselben Stammsammlungs-Isolate, die in der Untersuchung der 16S-rDNA Region dieser Arbeit miteinbezogen wurden (20). Die Datensätze von EMBL wurden mit den entsprechenden Sequenz-Chromatogrammen verglichen. Die EMBL Sequenzen enthielten 56 sogenannte „Ambiguities“ im Vergleich zu drei Positionen der im Rahmen dieser Arbeit generierten Sequenzen. Zudem waren dort acht Substitutionen, zwei Insertionsstellen und eine Deletionsstelle zu finden, die möglichen Fehlern beim Sequenziervorgang der dort publizierten Datensätze zuzuschreiben ist (entspricht einer Fehlerrate von 0,78%).

3.4 Die Datenbank RIDOM_Tool

Die relationale Datenbank RIDOM_Tool wurde entwickelt, um neben dem generierten Sequenz- und Bildmaterial auch eine Vielfalt an Informationen u. a. über Taxonomie, Phylogenie und relevante Literaturquellen komfortabel zu verwalten. Die Datensatzverwaltung ist die Hauptaufgabe und eigentliches Ziel der Datenbankanwendung. Neben einfacheren Operationen, wie das Erstellen und Löschen von Datensätzen, werden auch komplexere Funktionen, wie das Filtern und Sortieren sowie der Export und Import von Datensätzen realisiert. RIDOM_Tool ist als „Stand-alone“-Programm ein Baustein im Projekt der WWW-Datenbank "*Ribosomal Differentiation of Microorganisms*" (RIDOM). Die damit "offline" gesammelten Daten können nach ihrer Supervision hinsichtlich Qualität und Vollständigkeit der WWW-Datenbank RIDOM zugeführt werden und sind damit „online“ verfügbar. Neben der Datenverwaltung von Bakterien ist die Erweiterbarkeit der Software auf die Verwaltung anderer Mikroorganismen, z. B. der Pilze, möglich. Dieses offene Konzept erlaubt damit gleichzeitig ein dezentrales Arbeiten an mehreren parallelen Aufgabenstellungen (z. B. verschiedenen Genera). Um die Schnittstelle Mensch-Computer komfortabel zu gestalten, wurde auf einfache Bedienbarkeit und Installation der Software sowie überschaubare Systemanforderungen geachtet (Anhang Tab. 8-2).

3.4.1 Benutzeroberfläche und Bedienungsführung

Nach dem erfolgten Start von RIDOM_Tool kann der Anwender über das Auswahlinterface durch verschiedene Formularebenen navigieren. Jedes der Formulare kann eine Klasse von Datensätzen darstellen, zwischen denen der Benutzer blättern kann. Eine Übersicht über die gesamte Programmstruktur und die darin enthaltenen Funktionen wird in Abbildung 3-3 gezeigt. Die Formulare von RIDOM_Tool sind hinsichtlich ihrer Grundfunktionen in vier große Gruppen unterteilbar: Daten-Aquisition (Import), Daten-Navigation, Daten-Export und Datenbankmanagement (Bedienungsführung). Die Benutzeroberfläche ist durch die Programmierung unter „*Visual Basic for Applications*“ (VBA) dem Layout der *Microsoft* Systemumgebung angepasst worden. Dem Benutzer wird damit eine vertraute Navigation mit bekanntem Handling vermittelt, die schnelle Orientierung gewährleistet und die Einarbeitungszeit in die Software verkürzt. Die Oberflächen sind weitestgehend einheitlich gestaltet, so dass

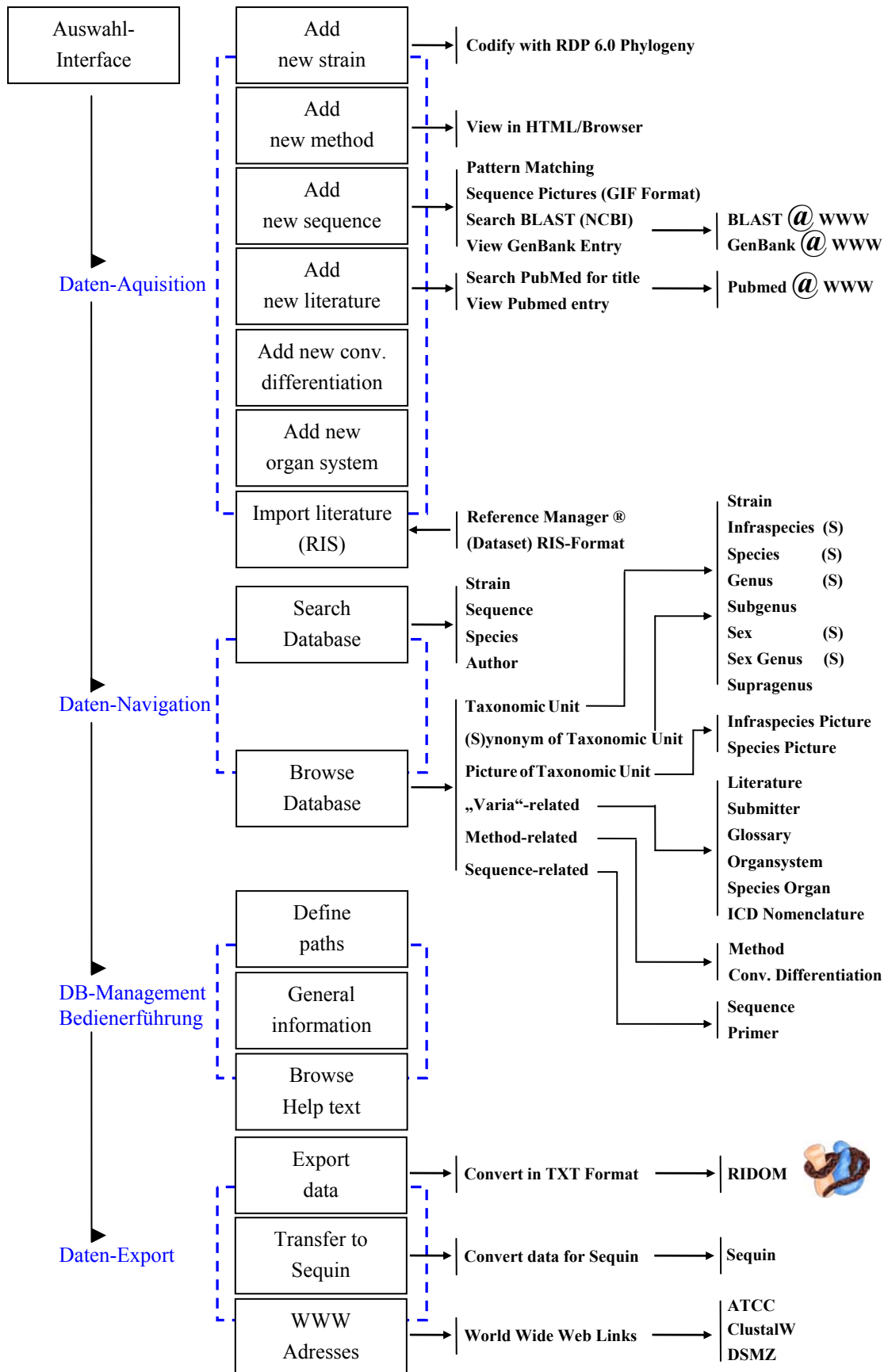


Abb. 3-3 Programmstruktur von RIDOM_Tool (schematisiert)

auf jeder Bildschirmseite die gleiche Anordnung der graphischen Elemente herrscht. Die Navigation erfolgt über den Mauszeiger. Die meisten Elemente der Software reagieren auf ein Überfahren mit der Maus („Rollover“), wodurch ein dazu passender Informationstext eingeblendet wird. So kann der Benutzer schon vor dem Klicken einschätzen, ob die gewählte Funktion für ihn von Interesse ist. Durch einmaligen Tastenklick auf die gewünschte Schaltfläche gelangt der Anwender in die nächste Formularebene.

Die Abbildung 3-4 zeigt das Hauptmenü der Datenbank-Anwendung RIDOM_Tool. Mit diesem Fenster können die Hauptformulare der Datenbank per Mausklick angesteuert werden. Es bleibt bei jeder durchgeführten Prozedur im Hintergrund aktiv, um schnelles Navigieren zwischen den einzelnen Formularen zu ermöglichen.

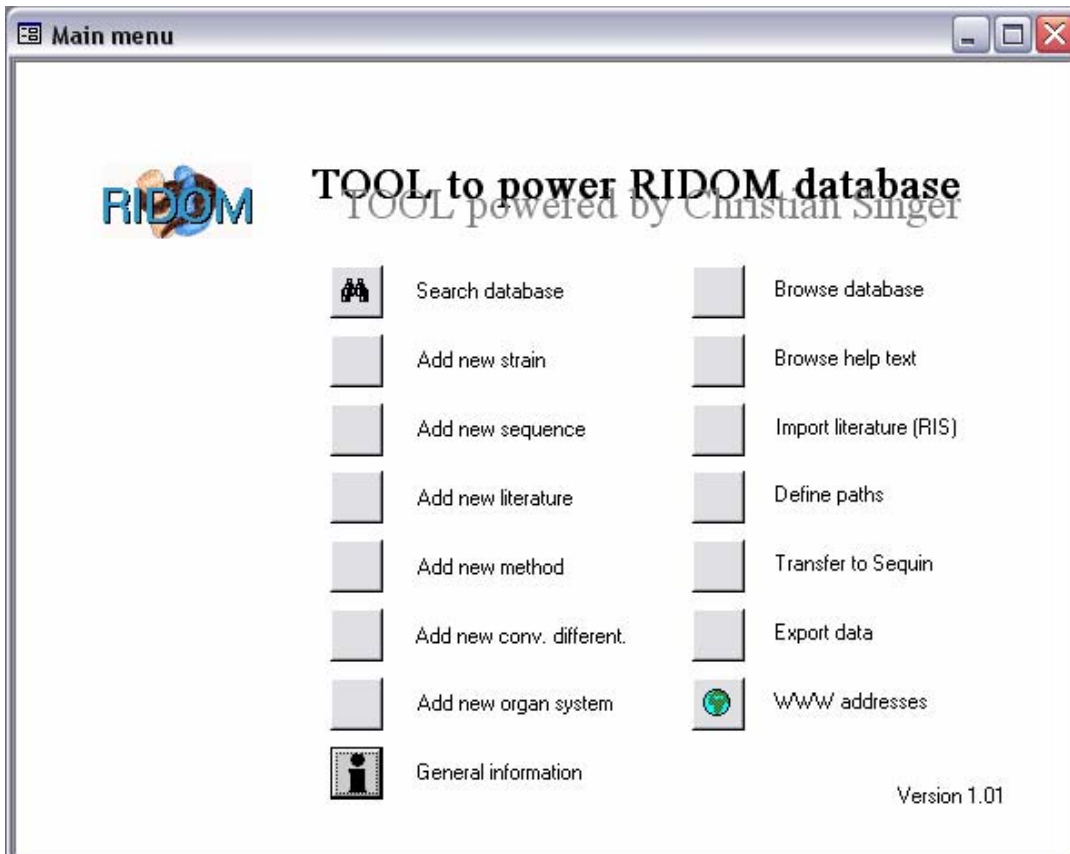


Abb. 3-4 Hauptmenü der Datenbank RIDOM_Tool

In Abbildung 3-5 ist das Formular „Sequenz Form“ mit dem Datensatz von „*Neisseria meningitidis* (DSM 10036)“ dargestellt. Seine Oberfläche steht exemplarisch für alle ansteuerbaren Formulare in RIDOM_Tool. „Sequenz Form“ bildet die für die Sequenz

Abb. 3-5 Formular „Sequenz Form“: Exemplarischer Datensatz „*Neisseria meningitidis* (DSM 10036)“ notwendigen Informationen übersichtlich ab. In den Formularfeldern werden zusätzlich zur Sequenzfolge neben ihrer Länge u. a. die Anzahl der Sequenz-Ambiguitäten und die verwendeten Primer dargestellt. Nach vorausgehender Definition der Sequenzfolge kann mit der Schaltfläche „*Pattern match?*“ nach Übereinstimmungen in den bereits vorhandenen Datensätzen gesucht werden. Über die Schaltflächen „*View Genbank entry*“ und „*Search Blast (NCBI)*“ ist RIDOM_Tool online mit den Datenbanken *GenBank* und *Blast* verbunden. Die Option „*Specify path of sequence*“ ermöglicht die Eingabe des Zielverzeichnis für die abgespeicherten Sequenzen. Neben den Dateien für die jeweilige Sequenz kann analog der Pfad für Bilddateien und Literatur über das Formular „*Define paths*“ spezifiziert werden (siehe entsprechende Schaltfläche in Abb. 3-4). Aus jedem Formular heraus kann über die Schaltfläche mit dem Piktogramm eines Fragezeichens die Hilfefunktion aufgerufen werden. Dort werden alle Felder und Schaltflächen des aktiven Formulars mit ihren Funktionen detailliert beschrieben. Über die Schaltfläche „*Confirm and EXIT*“ wird das Formular verlassen und etwaige vorgenommene Änderungen am Datensatz zuverlässig abgespeichert. Die Anwendung

schließt das aktive Fenster und springt automatisch auf die übergeordnete Formularebene.

3.4.2 *Export und Import von Daten*

Neben dem Verwalten von Sequenz- und Bild-Dateien und der direkten Eingabe von Daten in RIDOM_Tool können große Mengen gesammelter Literaturquellen aus der Software *Reference Manager* mit wenigen Mausklicks importiert werden. Der *Reference Manager* erlaubt ein Abspeichern recherchierter Literatur (z. B. aus *Medline*) im „RIS“-Format. Nach Spezifizierung der Quelldatei im Formular „Import literature (RIS)“ (entsprechende Schaltfläche in Abb. 3-4) können die Daten in RIDOM_Tool importiert werden. Nach dem Import kann die Literatur aus einer Liste ausgewählt und einem Datensatz zugeordnet werden (siehe Listenfeld „*Literature nr.*“ in Abb. 3-5).

Mehrere Benutzerschnittstellen vereinfachen den Export ganzer Datensätze aus RIDOM_Tool (Schaltflächen „*Transfer to Sequin*“ und „*Export data*“ in Abb. 3-4). Um neu generierte Aminosäuresequenzen bei WWW-Sequenzdatenbanken wie *GenBank* oder EMBL einzureichen oder darin bestehende zu aktualisieren, wird die Software *Sequin* des NCBI verwendet. *Sequin* erfordert eine bestimmte Formatierung der Daten, die durch RIDOM_Tool automatisch generiert werden kann. Im Formular „*Transfer to Sequin*“ wird der gewünschte Datensatz ausgewählt und konvertiert. Mit dem Formular „*Export data*“ wird die gesamte Datenmenge in Form von einzelnen Text-Dateien aus RIDOM_Tool exportiert. Jede Text-Datei entspricht dabei einer Tabelle aus der Anwendung. Die Dateien besitzen bereits die Formatierung zum Import in die WWW-Datenbank RIDOM. Damit können beliebig große Datensätze ganzer Genera aus RIDOM_Tool exportiert und der Datenbank RIDOM online zur Sequenzidentifikation und Darstellung von Information über die verschiedensten Mikroorganismen bereitgestellt werden.

4 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, hypervariable ribosomale DNA Abschnitte zu finden, die flankiert von stark konservierten Regionen benutzt werden können, um die Spezies der Familien *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* auf molekularer Ebene eindeutig zu identifizieren. Die längste zusammenhängende variable Region der 16S-rDNA, die diese Kriterien erfüllt, umspannt eine Region von 456 Basenpaaren entsprechend den *E. coli* Positionen 54 bis 510. Auf der 23S-rDNA wurde eine 202 Basenpaare lange Region untersucht, die den *E. coli* Positionen 1400 bis 1600 entspricht (43). Die untersuchten Abschnitte wurden durch die quantitative Darstellung der Nukleotid-Substitutions-Raten innerhalb der ribosomalen DNA der Bakterien von Van de Peer et al. übersichtlich illustriert (82). Die intra- und interspezifischen Beziehungen von 94 Mitgliedern der Familien *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* wurden deshalb durch eine vergleichende Sequenzanalyse der eben genannten PCR-amplifizierten partiellen 16S- und 23S-rDNA Abschnitte untersucht. Eine optimale Zielregion zur Identifikation von Sequenzdaten sollte eine geringe Intraspezies-Variabilität bei gleichzeitig hoher Interspezies-Variabilität besitzen.

Im Vergleich der DNA Sequenzen der 16S- und 23S-rDNA, als Maß für die Intraspezies- und Interspezies-Variabilität innerhalb eines Genus, konnte zwischen den beiden untersuchten Regionen keine großen Unterschiede festgestellt werden (Tab. 3-4). Die Interspezies-Variation war im Fall der Neisserien auf der untersuchten Region der 23S-rDNA signifikant niedriger als auf Seiten der 16S-rDNA. Andererseits waren die Interspezies-Distanzen zwischen den Genera auf Basis der untersuchten 23S-rDNA Sequenzen konsistent höher als dieselben Distanzen auf der 16S-rDNA Region. Ein Vergleich absoluter Werte, z. B. über polymorphe Positionen, zeigte, dass die 16S-rDNA in jedem Fall mehr variable Positionen enthält. Dies wird auch deutlich durch die Tatsache unterstützt, dass die untersuchte Zielregion auf der 16S-rDNA mehr als doppelt so lang ist wie die Zielregion auf der 23S-rDNA (Tab. 3-2). Somit kann gefolgert werden, dass die untersuchte Region auf der 16S-rDNA, zum Zwecke der Identifikation eines Mikroorganismus, aufgrund ihrer größeren Länge geeigneter ist, als die des untersuchten Abschnitts auf der 23S-rDNA.

Die Isolate von *Acinetobacter lwoffii* zeigten eine Intraspezies-Variation, die annähernd so hoch war wie die des Genus *Acinetobacter* im Gesamten. Folglich ist zu erwarten, dass die molekulare Identifikation dieser heterogenen Spezies sich bei diesen Ausgangsvoraussetzungen schwierig gestaltet und neue Strategien erfordert (41). Dieses Ergebnis stellt ein grundsätzliches Problem bei der Interpretation von rDNA Sequenzanalysen dar und weist darauf hin, dass ein verlässliches System zur Klassifikation und Identifikation von Mikroorganismen eine möglichst vollständige Gensequenz-Datenbank zur Basis haben sollte. Die Taxonomie des Genus *Acinetobacter* ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Untersuchungen. *Acinetobacter* umfasst sieben valide, bei 17 bisher bekannten Spezies („nomenspecies“) und befindet sich in stetiger Erweiterung (12, 16). Dies zeigt, dass möglicherweise eine weitere Subdivision zur exakteren Klassifizierung der *Acinetobacter* Spezies notwendig ist (17, 37, 39, 84). Ein anderes potentiell Limit der vergleichenden Sequenzanalyse partieller Abschnitte der 16S- und 23S-rDNA ist die ungenügende Trennschärfe aktuell divergenter Spezies. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von *Neisseria macacae* und *Neisseria mucosa* subsp. *mucosa* (ATCC 19696) gezeigt (21, 52, 85). Andererseits sind diese beiden Entitäten auch durch phänotypische Mittel nicht eindeutig voneinander unterscheidbare Spezies. Es ist fest davon auszugehen, dass eine sequentiell nachgeschaltete und damit ergänzende Sequenzierung der stärker variablen 16S-/ 23S-rDNA Spacer Region bessere Ergebnisse verspricht (3). Als Alternative ist ein polyphasischer Ansatz aus einer Kombination phäno- und genotypischer Verfahren vielversprechend (74). Ein weiteres Problem bei dem auf rDNA Sequenzen gestützten Ansatz zur Identifikation von Mikroorganismen ist die mögliche inter-cistronische Heterogenität zwischen den verschiedenen rRNA Operons (14, 46). Trotz dieser Limitierungen ist zu erwarten, dass die Identifikation mittels DNA Sequenzierung zukünftig eine zentrale Rolle in der klinischen Mikrobiologie hat. Ihre Vorteile liegen in der Geschwindigkeit, Reproduzierbarkeit und dem Potential der Automatisierung begründet (46, 53, 60). Vor allem am Beispiel klinisch relevanter Erreger wie *Neisseria meningitidis* wird deutlich, dass eine schnelle und zugleich treffsichere Diagnostik lebensrettend sein kann. Qualitativ hochwertige DNA-Sequenz-Datensätze, kombiniert mit DNA-Microarray Verfahren, versprechen entscheidende Fortschritte im Bereich der Laboratoriumsdiagnostik (79). Öffentlichen

Sequenzdatenbanken fehlt es bisher an angemessenen Qualitätskontrollen ihrer Sequenzdaten. Beim Vergleich der qualitativ hochwertigen Sequenzen dieser Arbeit mit den Einträgen öffentlicher Datenbanken wurden hohe Fehlerraten in den dort hinterlegten Daten entdeckt, was die Schwierigkeiten in der Identifikation und klinischen Diagnostik bei ungeeigneter Datenbasis erklärt (55, 80). Deshalb sollte eine Datenbank zur mikrobiologischen Diagnostik mehrere Sequenzen Stammsammlungs-basierender Isolate, sog. *Culture Collection Strains*, enthalten und dem Benutzer die Möglichkeit offerieren, primäre Sequenzdaten (z. B. Sequenzchromatogramme) zur subjektiven Qualitätskontrolle einzusehen. Neben der Online-Einsicht dieser Daten in RIDOM wurde mit der Anwendung RIDOM_Tool eine zusätzlich vorgeschaltete Filtermöglichkeit geschaffen, die es ermöglicht, externe Daten zu supervidieren und nur dann in RIDOM zu exportieren, wenn der erforderliche Qualitätsstandard erfüllt wird.

Bei der Analyse der 16S-rDNA Sequenzen konnten die Genera *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Iodobacter*, *Kingella*, *Neisseria*, und *Oligella* in einem Cluster gruppiert werden, der einen Teil der β -Subklasse der *Proteobacteria* darstellt (19, 37, 57). Vor allem die *E. coli* Position 485 unterstützt diese Gruppierung der Subklassen und bestätigt die bereits von Woese ermittelten Signatur-Sequenz-Positionen (88). Dahingegen differieren die Beziehungen unter den Subgruppen minimal von den bisher bekannten Ergebnissen, abhängig vom untersuchten Genabschnitt. Eine Ursache dafür könnten Rekombinations-Ereignisse innerhalb einer Spezies sein, da die in der Arbeit untersuchten Genera einem häufigen Austausch chromosomaler Gene unterliegen (1, 73). Die Einträge der untersuchten Mikroorganismen in RIDOM wurden mit dem „*Manual of Clinical Microbiology*“ der ASM abgeglichen und gewährleistet, dass alle relevanten pathogenen Spezies enthalten sind (48). Um die hohe Qualität der Sequenzen zu garantieren, wurden nur Isolate umfangreicher Stammsammlungen sequenziert. Die zunächst mit RIDOM_Tool verwalteten Elektropherogramme generierter Sequenzen sind auf dem RIDOM WWW-Server zur Einsicht und zum detaillierten Vergleich hinterlegt. Das gleiche hohe Qualitätsniveau sollte auch bei den Online-Informationen, wie z. B. Phylogenie oder morphologische Details, erreicht werden. Die Klassifikation der Spezies entspricht den „*Guidelines and Conventions for the purpose of Biological classification*“ des NCBI. Um den gegenwärtigen Stand der Phylogenie der Prokaryonten abzubilden, wurden Daten des *Ribosomal Database Project* (RDP)

implementiert (45). Die Nomenklatur entspricht dem aktuellen *Draft BioCode* des Royal Ontario Museum (65). Die Dateneinträge werden regelmäßig mit Hilfe der „*Bacterial Nomenclature up-to-date database*“ des DSMZ, welche die im „*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*“ validierten Benennungen enthält, aktualisiert (16). Weiterhin wurde die „*International Nomenclature of Diseases*“ (IND) (15) und die „*International Classification of Diseases*“ (ICD) der WHO (89) integriert. Damit entsprechen die Daten internationalen Konventionen und gewährleisten Aktualität. Zudem wird ein hohes Maß an Standardisierungstiefe erreicht, was den Austausch mit anderen WWW-Datenbanken erleichtert.

Die von *MicroSeq* Systems (PE Biosystems, California) kommerziell eingesetzte Software zur Identifikation von Mikroorganismen ist mit RIDOM vergleichbar (77). *MicroSeq* benutzt ebenfalls zusammenhängende 16S-rDNA Sequenzen zur Identifikation und enthält aktuell über 1200 Sequenzen voller Länge von qualitativ hochwertigen Isolaten der ATCC-Stammsammlung. Eine komfortable, mit vielen Optionen versehene Analyse-Software für Macintosh Computer erlaubt den Vergleich unbekannter Sequenzen mit den Datensätzen von *MicroSeq*. Zwischen beiden Systemen existieren jedoch fundamentale Unterschiede. RIDOM erlaubt mit seinem Konzept offener HTML-Strukturen die Integration hilfreicher Internet-Ressourcen. Ein weiterer Unterschied ist der polyphasische Ansatz von RIDOM. Er verfolgt die Integration alternativer Mittel mikrobiologischer Diagnostik, wie z. B. phänotypische Kriterien und molekulare Methoden, die sich nicht-ribosomaler Ziele auf der DNA bedienen. Die in der vorliegenden Arbeit für das RIDOM-System kombinierten mikrobiologischen und molekularbiologischen Daten zur Identifizierung der *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* übertreffen den nur auf Sequenz und Speziesbezeichnung konzentrierten Ansatz von *MicroSeq*. Die RIDOM-Datenbank ist auf medizinisch relevante Organismen bei Mensch und Tier zugeschnitten. *MicroSeq* war anfänglich spezialisiert auf Umweltisolate für die Anforderungen von Qualitätskontrollen in der Nahrungsmittel- und pharmazeutischen Industrie und hat aktuell sein Spektrum auf klinisch relevante Mikroorganismen erweitert.

RIDOM bietet aktuell neben den Mykobakterien (32) mit der vorliegenden Arbeit die Daten zu den klinisch relevanten Vertretern aus der Familie der *Neisseriaceae* und

Moraxellaceae. Das Spektrum zügig mit Daten anderer Mikroorganismen zu erweitern und dabei das hohe Qualitätsniveau bestehender Daten zu halten ist der wichtigste Schritt für RIDOM. Wird bisher in der Sequenzanalyse nur eine niedrige Ähnlichkeits-Score zu den in RIDOM enthaltenen Daten erreicht, kann der Benutzer, über RIDOM automatisiert, die Datenressourcen von BLAST und *GenBank* miteinbeziehen. Diese Interaktivität eines ständig wachsenden Netzwerks ermöglicht Synergien und beschleunigt entscheidend die Identifikation (86). Selbst bei fehlenden Sequenzdaten kann die Anwendung im Rahmen einer Online-Metasuche benutzt werden, um spezies-relevante Informationen zu Nomenklatur, Phylogenie und Pathogenität zu erhalten. RIDOM kann unter der Adresse <http://www.ridom-rdna.de> im World Wide Web angesteuert werden.

Zusammenfassend zeigen die generierten Daten, dass es möglich ist, die meisten Spezies der *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* durch partielle rDNA Sequenzierung zu identifizieren. Zudem wird deutlich, dass die in der Arbeit verwandte partielle 16S-rDNA Region sich zur molekularen Diagnostik geeigneter erweist als die partielle 23S-rDNA Region. Die u. a. im Sequenz-Alignment gewonnenen Erfahrungen bekräftigen die These, dass eine Sequenzdatenbank mehr als ein repräsentatives Isolat jeder Spezies enthalten muss, um treffsichere Ergebnisse für die medizinisch-mikrobiologische Diagnostik liefern zu können. Ein diagnostisches Werkzeug dieser Art sollte den polyphasischen Ansatz verfolgen und neben der Basis molekularer Verfahren weitere analytische Methoden berücksichtigen, da die alleinige Sequenzierung partieller Regionen der 16S-rDNA nicht immer zur Speziesidentifikation führt. Die offene Konzeption von RIDOM mit hochwertigen Datensätzen von *Mycobacterium*, *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* erweitert die Möglichkeiten molekularer Online-Diagnostik und hat das Potential dort zunehmend zur zentralen Anlaufstelle bei der Identifikation von Mikroorganismen zu werden.

5 Zusammenfassung

Die schnelle und verlässliche Identifizierung mikrobiologischer Isolate ist ein fundamentales Ziel der klinischen Mikrobiologie. Bei einigen gram-negativen Spezies ist die klassische phänotypische Identifizierung, basierend auf metabolischen, enzymatischen oder serologischen Methoden erschwert, zeitraubend oder nicht suffizient. Durch die Sequenzierung partieller Abschnitte der 16S- oder 23S-rDNA können Bakterien meist exakt spezifiziert werden. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, hypervariable rDNA Abschnitte zu finden, die von stark konservierten Regionen flankiert werden, um auf molekularer Ebene Mitglieder der Familie *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae* zu diskriminieren. Die inter- und intragenetischen Beziehungen von insgesamt 94 Stämmen wurden untersucht. Im Vergleich zu den Referenzstämmen der Genera waren bei der partiellen 16S-rDNA (*E. coli* Position 54 – 510) je Spezies durchschnittlich 30 polymorphe Positionen vorhanden. Die partiellen 23S-rDNA Abschnitte (*E. coli* Position 1400 – 1600) zeigten durchschnittlich 11 polymorphe Positionen. *Neisseria macacae* und *N. mucosa* subsp. *mucosa* (ATCC 19696) zeigten identische 16S- und 23S-rDNA Sequenzen. Die Gruppierung verschiedener Isolate war bei *Acinetobacter lwoffii*, *Moraxella lacunata* und *Neisseria mucosa* an beiden untersuchten Genabschnitten heterogen. Im Fall von *N. meningitidis* konnte mit Hilfe der 23S-rDNA Daten nicht suffizient gruppiert werden. Die Ergebnisse zeigen eine Überlegenheit der untersuchten partiellen 16S-rDNA zur Diagnostik der *Neisseriaceae* und *Moraxellaceae*. Eine Referenzdatenbank zur Diagnostik von Mikroorganismen sollte mehr als ein Isolat einer Spezies enthalten und zudem einen polyphasischen Ansatz verfolgen. Die Sequenz-Chromatogramme und weitere diagnostisch relevante Informationen wurden mit der „offline“-Datenbank RIDOM_Tool gesammelt und sind ein Teil des Internet-basierenden Service von RIDOM (www.ridom-rdna.de). Eine eingegebene Sequenzfolge kann online eingefügt und damit ein direkter Vergleich mit den in der RIDOM Referenzdatenbank existierenden Datensätzen initiiert werden.

Schlagwörter: Ribosomale Genetik, Molekül-Datenbanken, Gene, Molekulare Sequenzdaten, Moraxella, Neisseriaceae (Infektionen), Phylogenie, Ribosomale 16S RNA, Ribosomale 23S RNA, DNA Sequenzanalyse

6 Summary

Fast and reliable identification of microbial isolates is a fundamental goal of clinical microbiology. However, in the case of some fastidious gram-negative bacterial species, classical phenotype identification based on either metabolic, enzymatic, or serological methods is difficult, time-consuming, and inadequate. 16S- or 23S-rDNA bacterial sequencing will most often result in accurate speciation of isolates. The objective of this study was to find a hypervariable rDNA stretch, flanked by strongly conserved regions, which is suitable for molecular species identification of members of the *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae*. The inter- and intrageneric relationships were investigated using comparative sequence analysis of PCR-amplified partial 16S- and 23S-rDNA from a total of 94 strains. When compared to the type species of the investigated genera an average of 30 polymorphic positions was observed within the partial 16S-rDNA (corresponding to *E. coli* position 54 – 510) for each species and an average of 11 polymorphic positions was observed within the 202 nucleotides of the 23S-rDNA gene (*E. coli* position 1400 – 1600). *N. macacae* and *N. mucosa* ssp. *mucosa* (ATCC 19696) had identical 16S- and 23S-rDNA sequences. Species clusters were heterogeneous in both genes in the case of *A. lwoffii*, *M. lacunata*, and *N. mucosa*. *N. meningitidis* isolates failed to cluster only in the 23S-rDNA subset. The data showed that the 16S-rDNA region is more suitable than the partial 23S-rDNA for the molecular diagnosis of *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae* and that a reference database should include more than one strain of each species. Not all microorganisms can be identified by solely partial rDNA sequences. Therefore a database should pursue a polyphasic approach e. g. including phenotypic criteria or different molecular targets. All sequence chromatograms and species-specific information were administered offline with RIDOM_Tool. The dataset is available online as part of the web-based service RIDOM (www.ridom-rdna.de). Users can submit a sequence and conduct a similarity search against the RIDOM reference database for microbial identification purposes.

Keywords: Ribosomal genetics, Molecular Databases, Genes, Molecular Sequence Data, Moraxella, Neisseriaceae (Infections), Phylogeny, Ribosomal 16S RNA, Ribosomal 23S RNA, DNA Sequence Analysis

7 Bibliographie

1. **Alber D., M. Oberkotter, S. Suerbaum, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel.** 2001. Genetic diversity of *Neisseria lactamica* strains from epidemiologically defined carriers. *J Clin Microbiol* **39**:1710-5.
2. **Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1999. Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition ed. Wiley & Sons, New Jersey.
3. **Barry T., G. Colleran, M. Glennon, L. K. Dunican, and F. Gannon.** 1991. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* **1**:51-6.
4. **Baumann P.** 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol* **96**:39-42.
5. **Benson D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, B. A. Rapp, and D. L. Wheeler.** 2002. GenBank. *Nucleic Acids Res* **30**:17-20.
6. **Berger U.** 1971. [*Neisseria mucosa* var. *heidelbergensis*]. *Z Med Mikrobiol Immunol* **156**:154-8.
7. **Berger U., I. Aboulkhair, and W. Rottmann.** 1974. Septicaemia and meningitis caused by *Neisseria mucosa* varietas *heidelbergensis*. *Infection* **2**:108-10.
8. **Bovre K.** 1979. Proposal to divide the Genus *Moraxella* Lwoff 1939 emend. Henriksen and Bovre 1968 into two subgenera, subgenus *Moraxella* (Lwoff 1939) Bovre 1979 and subgenus *Branhamella* (Catlin 1970) Bovre 1979. *Int J Syst Bacteriol* **29**:403-406.
9. **Bovre K.** 1980. Progress in classification and identification of *Neisseriaceae* based on genetic affinity. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **8**:55-72.
10. **Brosius J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from

Escherichia coli. *J Mol Biol* **148**:107-27.

11. **Cameron G. N.** 1988. The EMBL data library. *Nucleic Acids Res* **16**:1865-7.
12. **Carr E. L., Kampfer P., Patel B. K., Gurtler V., and R. J. Seviour.** 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:953-63.
13. **Catlin B. W.** 1990. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. *Clin Microbiol Rev* **3**:293-320.
14. **Coenye T., P. Vandamme.** 2003. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett* **228**:45-9.
15. **Council for International Organizations of Medical Sciences.** 1985. International nomenclature of diseases. Vol. II. Infectious diseases. Council for International Organizations of Medical Sciences, Geneva.
16. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.** 2004. Bacterial Nomenclature up-to-date database. <http://www.dsmz.de> (letzter Zugriff am 01.09.2004)
17. **Dijkshoorn L., B. Van Harselaar, I. Tjernberg, P. J. Bouvet, and M. Vaneechoutte.** 1998. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol* **21**:33-9.
18. **Enright M. C., and H. McKenzie.** 1997. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* – clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *J Med Microbiol* **46**:360-71.
19. **Enright M. C., P. E. Carter, I. A. MacLean, and H. McKenzie.** 1994. Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **44**:387-91.
20. **European Molecular Biology Laboratory.** 2000. EMBL.

<http://www.embl.org> (letzter Zugriff am 04.08.2000)

21. **Fox G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtschuk, Jr.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**:166-70.
22. **Fredricks D. N., and D. A. Relman.** 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* **9**:18-33.
23. **Graham D. R., J. D. Band, C. Thornsberry, D. G. Hollis, and R. E. Weaver.** 1990. Infections caused by *Moraxella*, *Moraxella urethralis*, *Moraxella*-like groups M-5 and M-6, and *Kingella kingae* in the United States, 1953-1980. *Rev Infect Dis* **12**:423-31.
24. **Gram H. C. J.** 1884. Über die isolierte Färbung der *Schizomyceten* in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin* **2**:185.
25. **Gutell R. R.** Comparative RNA Web Site. 2000. 16S and 23S rRNA secondary structure models. <http://www.rna.icmb.utexas.edu/> (letzter Zugriff am 11.08.2004)
26. **Gutell R. R., N. Larsen, and C. R. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* **58**:10-26.
27. **Harmsen D., and H. Karch.** 2004. 16S rDNA for Diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* **70**:19-24.
28. **Harmsen D., C. Singer, J. Rothgänger, T. Tonjum, G. S. de Hoog, H. Shah, J. Albert, and M. Frosch.** 2001. Diagnostics of *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae* by ribosomal DNA sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms. *J Clin Microbiol* **39**:936-42.
29. **Harmsen D., J. Heesemann, T. Brabletz, T. Kirchner, and H. K. Müller-Hermelink.** 1994. Heterogeneity among Whipple's-disease-associated bacteria. *Lancet* **343**:1288.

30. **Harmsen D., J. Rothgänger, C. Singer, J. Albert, and M. Frosch.** 1999. Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet* **353**:291.
31. **Harmsen D., J. Rothgänger, M. Frosch, and J. Albert.** 2002. RIDOM: Ribosomal differentiation of medical micro-organisms Database. *Nucleic Acids Res* **30**:416-7.
32. **Harmsen D., S. Dostal, A. Roth, S. Niemann, J. Rothgänger, M. Sammeth, J. Albert, M. Frosch, and E. Richter.** 2003. RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infect Dis* **3**:26.
33. **Henriksen S. D., and K. Bovre.** 1968. *Moraxella kingii* sp. nov., a haemolytic, saccharolytic species of the genus *Moraxella*. *J Gen Microbiol* **51**:377-85.
34. **Henriksen S. D., and K. Bovre.** 1968. The taxonomy of the genera *Moraxella* and *Neisseria*. *J Gen Microbiol* **51**:387-92.
35. **Henriksen S. D., and K. Bovre.** 1969. Corroding and spreading colonies in *Moraxella nonliquefaciens*. *Acta Pathol Microbiol Scand* **76**:459-63.
36. **Holt J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams.** 1994. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. In R. W. Hensyl (ed.), *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9. Edition ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
37. **Ibrahim A., P. Gerner-Smidt, and W. Liesack.** 1997. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **47**:837-41.
38. **Karalus R., and A. Campagnari.** 2000. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect* **2**:547-59.
39. **Koeleman J. G., J. Stoof, D. J. Biesmans, P. H. Savelkoul, and C. M. Vandenbroucke-Grauls.** 1998. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and

- amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **36**:2522-9.
40. **Krieg N. R., J. G. Holt, R. G. E. Murray, D. J. Brenner, M. P. Bryant, J. W. Moulder, N. Pfennig, P. H. A. Sneath, and J. T. Staley.** 1984. "Families *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*". In N. R. Krieg (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
 41. **Lan R., and P. R. Reeves.** 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol* **8**:396-401.
 42. **Linz B., M. Schenker, P. Zhu, and M. Achtman.** 2000. Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **36**:1049-58.
 43. **Ludwig W., S. Dorn, N. Springer, G. Kirchhof, and K. H. Schleifer.** 1994. PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **60**:3234-44.
 44. **Mahon C. R.** 1995. Chapter 14: *Neisseria*. In C. R. Mahon and G. J. Manuselis (ed.), *Textbook of Diagnostic Microbiology*. W. B. Saunders, Philadelphia.
 45. **Maidak B. L., J. R. Cole, C. T. Parker, Jr., G. M. Garrity, N. Larsen, B. Li, T. G. Lilburn, M. J. McCaughey, G. J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T. M. Schmidt, J. M. Tiedje, and C. R. Woese.** 1999. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **27**:171-3.
 46. **Maiden M. C., and M. Frosch.** 2001. Molecular techniques for the investigation of meningococcal disease epidemiology. *Mol Biotechnol* **18**:119-34.
 47. **Mellmann A., J. L. Cloud, S. Andrees, K. Blackwood, K. C. Carroll, A. Kabani, A. Roth, and D. Harmsen.** 2003. Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and Genbank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol* **293**:359-70.

48. **Murray P. R.** 1995. Chapter: *Neisseria* and *Branhamella*. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington.
49. **National Library of Medicine.** 2000. NLM-MeSH Tree Structures - Category C. Diseases. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/> (letzter Zugriff am 15.09.2004)
50. **Nemec A., T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vaneechoutte, T. J. van der Reijden, and L. Dijkshoorn.** 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1891-9.
51. **Olsen G. J., C. R. Woese, and R. Overbeek.** 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* **176**:1-6.
52. **Palys T., L. K. Nakamura, and F. M. Cohan.** 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1145-56.
53. **Patel J. B.** 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* **6**:313-21.
54. **Pearson W. R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:2444-8.
55. **Pennisi E.** 1999. Keeping genome databases clean and up to date. *Science* **286**:447-50.
56. **Persing D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.).** 1993. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington D. C.
57. **Pettersson B., A. Kodjo, M. Ronaghi, M. Uhlen, and T. Tønjum.** 1998. Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *Int J Syst Bacteriol* **48**:75-89.

58. **Philip A., and G. C. Garton.** 1985. Comparative evaluation of five commercial systems for the rapid identification of pathogenic *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* **22**:101-4.
59. **Rantakokko-Jalava K., S. Nikkari, J. Jalava, E. Eerola, M. Skurnik, O. Meurman, O. Ruuskanen, A. Alanen, E. Kotilainen, P. Toivanen, and P. Kotilainen.** 2000. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* **38**:32-9.
60. **Raoult D., P. E. Fournier, and M. Drancourt.** 2004. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* **2**:151-9.
61. **Relman D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1990. The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* **323**:1573–1580.
62. **Rosenstein N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic, and J. M. Hughes.** 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med* **344**:1378-88.
63. **Rossau R., A. Van Landschoot, M. Gillis, and J. De Ley.** 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol* **41**:310–319.
64. **Rossau R., G. Vandebussche, S. Thielemans, P. Segers, H. Grosch, E. Gothe, W. Mannheim, and J. De Ley.** 1989. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and deoxyribonucleic acid homologies of *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella*, and Center for Disease Control groups EF-4 and M-5 in the emended family *Neisseriaceae*. *Int J Sys. Bacteriol* **39**:185–198.
65. **Royal Ontario Museum.** 2000. Draft BioCode. <http://www.rom.on.ca/biodiversity/biocode/biocode1997.html> (letzter Zugriff am 15.09.2004)
66. **Sacchi C. T., A. M. Whitney, M. W. Reeves, L. W. Mayer, and T. Popovic.** 2002. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of

- 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J Clin Microbiol* **40**:4520-7.
67. **Saiki R. K., S. J. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354
68. **Saitou N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-25.
69. **Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
70. **Sanger F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**:5463-7.
71. **Scharf S. J., G. T. Horn and H. A. Erlich.** 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**:1076-1078.
72. **Shah H. N., S. E. Gharbia, and M. D. Collins.** 1997. The gram-stain, a declining synapomorphy in an emerging evolutionary tree. *Rev Med Microbiol* **8**:103–110.
73. **Smith N. H., E. C. Holmes, G. M. Donovan, G. A. Carpenter, and B. G. Spratt.** 1999. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of argF, recA, rho, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. *Mol Biol Evol* **16**:773–783.
74. **Stackebrandt E., and B. M. Goebel.** 1994. Taxonomix Note: A place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition of Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**:846-849.
75. **Stackebrandt E., R. G. E. Murray, and H. G. Truper.** 1988. *Proteobacteria classis nov.*, a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple

- bacteria and their relatives.” *Int J Syst Bacteriol* **38**:321–325.
76. **Smith T. F., and M. S. Waterman.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**:195-197.
 77. **Tang Y. W., N. M. Ellis, M. K. Hopkins, D. H. Smith, D. E. Dodge, and D. H. Persing.** 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* **36**:3674-9.
 78. **Tjernberg I., and J. Ursing.** 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97**:595-605.
 79. **Troesch A., H. Nguyen, C. G. Miyada, S. Desvarenne, T. R. Gingeras, P. M. Kaplan, P. Cros, and C. Mabilat.** 1999. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* **37**:49-55.
 80. **Turenne C. Y., L. Tschetter, J. Wolfe, and A. Kabani.** 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* **39**:3637-48.
 81. **Unterstein M.** 2000. Konzept relationaler Datenbanken. Kap. 3. In Matthiessen G. (ed.). *Relationale Datenbanken und SQL*. Addison Wesley, Boston.
 82. **Van de Peer Y., S. Chapelle, and R. de Wachter.** 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* **24**:3381-91.
 83. **Van Duynhoven Y. T.** 1999. The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Microbes Infect* **1**:455-64.
 84. **Vaneechoutte M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. de Vos, G. Claeys, and G. Verschraegen.** 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* **33**:11-5.

85. **Vedros N. A., C. Hoke, and P. K. Chun.** 1983. *Neisseria macacae* sp. nov., a new *Neisseria* Species isolated from oropharynges of Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Int J Syst Bacteriol* **33**:515-520.
86. **Vogel U., and H. Claus.** 2003. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *Front Biosci* **8**:14-22.
87. **Vogel U., G. Morelli, K. Zurth, H. Claus, E. Kriener, M. Achtman, and M. Frosch.** 1998. Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. *J Clin Microbiol* **36**:2465-70.
88. **Woese C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**:221-71.
89. **World Health Organization.** 1994. International statistical classification of diseases and related health problems, 10th rev. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
90. **Yagupsky P.** 2004. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. *Lancet Infect Dis* **4**:358-67.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| 16S-rDNA | ribosomale 16S-DNA |
| 23S-rDNA | ribosomale 23S-DNA |
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BCCM | Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Gent, Belgien |
| Berger | Neisseriaceae Stammsammlung Prof. em. Ulrich Berger, Heidelberg |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| CCUG | Culture Collection University of Göteborg, Schweden |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA |
| CTAB | N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid |
| d | Tag (<i>lat. dies</i>) |
| d. h. | das heißt |
| dATP | Desoxy-Adenin-Triphosphat |
| dCTP | Desoxy-Cytosin-Triphosphat |
| dGTP | Desoxy-Guanin-Triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. Desoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | Desoxynukleotid-5'-Triphosphat |
| DSMZ | Dt. Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen, Braunschweig |
| dTTP | Desoxy-Thymin-Triphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> , gram-negatives Enterobakterium |

| | |
|-----------|--|
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMBL | European Molecular Biology Laboratory, Cambridge, UK |
| et al. | und andere (<i>lat.</i> et alii) |
| G | Guanin |
| g | Erdbeschleunigung (9,81m/s ²) |
| GIF | Graphic Interchange Format |
| h | Stunde (<i>lat.</i> hora) |
| HTML | Hypertext Markup Language |
| i. d. R. | in der Regel |
| in silico | mit Hilfe eines Computers |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| kb | Kilobasenpaare |
| kD | Kilo-Dalton |
| LMG | Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien |
| LSU | Large Sub Unit |
| Medline | Med. Datenbank, National Library of Medicine, Bethesda, USA |
| MEE | Multilokus-Enzym-Elektrophorese |
| MeSH | Medical Subject Headings |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mV | Millivolt |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA |
| NCTC | National Collections of Type Cultures, Colindale, Großbritannien |
| NIH | National Institutes of Health, Bethesda, USA |
| NLM | National Library of Medicine, Bethesda, USA |
| Oslo | Oslo Strain Collection, Oslo, Norwegen |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction) |

| | |
|------------|--|
| pH | Wasserstoffionenkonzentration (<i>lat.</i> potentia hydrogenii) |
| pmol | pico-Mol |
| rDNA | ribosomale Desoxyribonukleinsäure |
| RIDOM | Ribosomal Differentiation of Micro-organisms |
| RIS | Research Information Systems (Programm-Format) |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> revolutions per minute) |
| s. a. | siehe auch |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>enlg.</i> Sodium-dodecyl-sulphate) |
| sog. | sogenannt |
| SQL | Structured Query Language |
| subsp. | Subspezies |
| SSU | Small Sub Unit |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| <i>Taq</i> | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borsäure |
| TE | Tris-HCl |
| TEMED | Tetramethylethylenediamine |
| U | Enzymaktivitätseinheit (<i>engl.</i> Unit) |
| VBA | Visual Basic for Applications (Programmiersprache) |
| vgl. | Vergleiche |
| vs. | gegen (<i>lat.</i> versus) |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation (<i>eng.</i> World Health Organisation) |
| Wue | Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg |
| WWW | World Wide Web |

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten, die auf Empfehlungen der „*International Federation for Clinical Chemistry*“ (IFCC) und „*International Union of Pure and Applied Chemistry*“ (IUPAC) beruhen, oder die zu den SI-Einheiten des „*Système Internationale d’Unités*“ zählen, wurden nicht gesondert aufgeführt.

9 Anhang

Tab. 9-1 Systemvoraussetzungen für die Software RIDOM_Tool

| Hardware-Voraussetzungen: | |
|----------------------------------|--|
| <i>Prozessor:</i> | Intel-Pentium® oder vergleichbar (empfohlen ab Intel Pentium II®) |
| <i>Arbeitsspeicher:</i> | mindestens 64 MB (empfohlen: 128 MB) |
| <i>Festplatte:</i> | mindestens 150 MB freier Speicherplatz |
| <i>Grafikauflösung:</i> | mindestens 800 x 600 Pixel (empfohlen: 1.024 x 768 Pixel) |
| <i>Internet:</i> | Zugang über DFÜ-Netzwerk; lokales Netzwerk (LAN) wird unterstützt |
| <i>Drucker:</i> | keine Einschränkungen |
| Software-Voraussetzungen: | |
| <i>Mögliche Betriebssysteme:</i> | Microsoft Windows® NT 4.0 ab Service Pack 6, Microsoft Windows® 98/2000/ME/XP |
| <i>Internetbrowser:</i> | Microsoft Internet Explorer®, Version 5.01 (SP1) oder höher |
| <i>Software-Integrationen:</i> | Microsoft Access® ab Version 97 |
| <i>Sonstige Software:</i> | Adobe Acrobat Reader® ab Version 4.0 (Freeware) Sequin ab Version 2.80 (NCBI Sequence Submission, Freeware) Chromas ab Version 1.45 (ABI/SCF Trace View Software, Freeware) Clustal W ab V. 1.7 (Multiple alignment, Freeware) Reference Manager® ab Version 8.0 |

Danksagung

*"Das schönste Denkmal, das ein Mensch bekommen kann,
steht in den Herzen seiner Mitmenschen." Albert Schweitzer*

Die vorliegenden Seiten können nur bedingt widerspiegeln, welches Spektrum an Aktivitäten, wie viele wertvolle Anregungen, aufmunternde Worte und Diskussionen mit meiner Familie, Freunden und Bekannten notwendig waren um schließlich meine Dissertationsarbeit erfolgreich abzuschließen. Ohne ihre Hilfe wäre einiges wesentlich schwieriger gewesen und manches vollkommen unmöglich geblieben. Einige dieser Personen möchte ich nachfolgend aufführen. So danke ich herzlich:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch, der in seinen Vorlesungen mein Interesse für die Mikrobiologie weckte und mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit durchzuführen.

Prof. Dr. med. Dag Harmsen, für die interessante Fragestellung und die intensive Betreuung dieser Arbeit. Ohne seine Ideen und Anregungen würde es meine Promotionsarbeit in dieser Form nicht geben.

Monika Bergmann, für ihre wertvolle Unterstützung im Erlernen molekularbiologischer Techniken. Ihre Hilfsbereitschaft hat das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Meinen Eltern, Thomas und Margarethe Singer, für ihre intensive ideelle Unterstützung, ihr Interesse und gute Gespräche in meiner Situation "zwischen" Promotion und Doppelstudium. Eure tiefe Liebe und das Vertrauen in mich haben meinen Weg bis heute ermöglicht und werden ihn immer prägen. Ich bin Euch sehr dankbar dafür.

Dmitri Stübner, guter Freund, der Du mich immer wieder ermutigt und ermuntert hast, dass Promovieren zwar manchmal zäh, aber auf jeden Fall machbar ist.

Heidi Mennen, Deine bedingungslose Freundschaft und wohlmeinende Kritik hat auf die eine oder andere bedeutungsvolle Weise Eingang in diese Arbeit gefunden.

Ronnie Hille, unsere Locarno-Session wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Last but not least: Nina Güldner. Deine wertvollen Kommentare und aufmunternden Worte und Deine Liebe haben mich auf den „letzten Metern“ dieser Arbeit begleitet und zum entscheidenden Abschluss geführt.