

---

## E. Ergebnisse

### E.1 *In situ* rRNA-Hybridisierung von Bakterien

Ziel dieser Arbeit war es, eine spezifische, sensitive Nachweismethode für *L. pneumophila* zu entwickeln, die keine vorherige Kultur erfordert. Die *in situ* Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden erfüllt alle diese Voraussetzungen und hat sich als Nachweis für verschiedene Bakterien bewährt. Gram-negative Bakterien und damit auch Legionellen sind aufgrund ihrer Zellwandstruktur relativ leicht für Sonden zugänglich. Es waren daher keine speziellen Vorbehandlungen für die Fixierung und Hybridisierung der Zellen nötig.

#### E.1.1 Evaluierung einer neuen *L. pneumophila*-spezifischen Oligonukleotidsonde

Für Legionellen existiert bereits die 16S rRNA-gerichtete Sonde LEG705, die nahezu alle Arten der *Legionellaceae* erfasst (Manz et al. 1995). Anhand eines Vergleichs von über 10.000 in der Datenbank ARB der TU München gespeicherten Sequenzen wurde die neue Sonde LEGPNE1 entworfen, die spezifisch für *L. pneumophila* ist (Tab. D.4). Die 18 Basen lange Sonde zeigt Unterschiede in mindestens einer Base zu anderen *Legionella*-Spezies (H.2 im Anhang).

Um die Spezifität sowie die Zugänglichkeit der rRNA-Zielregion zu testen, wurden Reinkulturen von 15 bakteriellen Referenzstämmen (Tab. D.1) mit aufsteigender Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer hybridisiert. Die besten Ergebnisse in der *in situ* Hybridisierung wurden bei 20 % und 30 % Formamid erreicht. Hier war das Fluoreszenzsignal der LEGPNE1-Sonde mit den *L. pneumophila*-Stämmen am stärksten, die nicht-*pneumophila*-Stämme zeigten keinerlei Reaktion. Bei höheren bzw. niedrigeren Formamidkonzentrationen war die Fluoreszenz von LEGPNE1 mit den hybridisierten *L. pneumophila*-Stämmen etwas schwächer. Die optimale Stringenz bei 46 °C Hybridisierungstemperatur wurde daher mit 25 % Formamid im Hybridisierungspuffer ermittelt.

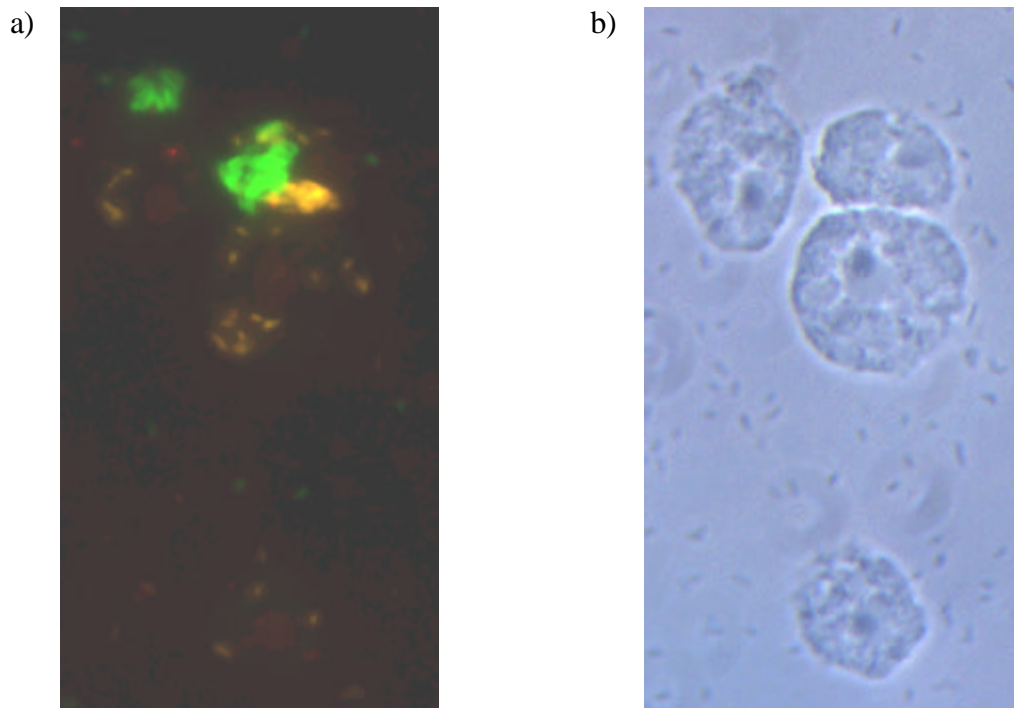
Die Sonde wurde außerdem in Infektionsassays verwendet, um intrazellulär vorliegende Legionellen nachzuweisen. Dazu wurden Amöben der Art *A. castellanii* mit *L. pneumophila* Corby und *P. aeruginosa* simultan infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wurden Aliquots

---

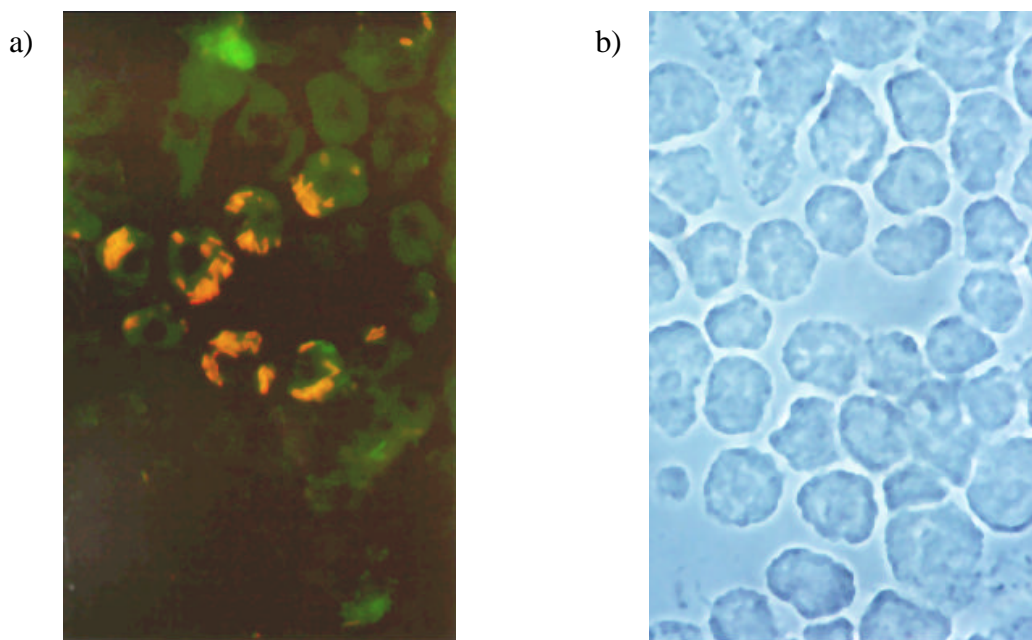
hybridisiert. Die Sonde LEGPNE1 zeigte starke Fluoreszenzsignale mit den phagozytierten *L. pneumophila*-Bakterien und keine Kreuzreaktionen zu den ebenfalls aufgenommenen Pseudomonaden, die wie die Legionellen auch mit der Sonde EUB338 nachgewiesen wurden (Abb. E.1). Darüberhinaus war festzustellen, dass mehr *P. aeruginosa*-Zellen phagozytiert wurden als *L. pneumophila*-Zellen.

In einem weiteren Assay wurde *A. castellanii* gleichzeitig mit *L. pneumophila* Corby und *L. micdadei* infiziert und mittels *in situ* Hybridisierung die Infektionsrate analysiert. Auch hier konnte deutlich zwischen intrazellulären *L. pneumophila*-Zellen, die mit LEG705 und mit LEGPNE1 hybridisierten, und *L. micdadei*-Zellen, die mit LEG705 allein reagierten, unterschieden werden (Abb. E.2). *L. micdadei* lag in deutlich geringerer Anzahl in den Amöben vor als *L. pneumophila*.

Zur Ermittlung der Sensitivität der FISH-Technik wurden Hybridisierungen in künstlichen 200 ml Wasser-Mikrokosmen mit unterschiedlichen Bakterienzahlen durchgeführt. Die Suspensionen wurden entsprechend der unter D.21 beschriebenen Methode durch Filtration und Zentrifugation auf 1 ml konzentriert und anschließend daraus 18 µl hybridisiert. Die geringste noch nachzuweisende Bakterienkonzentration in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest., steril</sub> betrug 2.000 *L. pneumophila* Corby, 2.000 *L. micdadei* und 27.000 *P. aeruginosa* (als Begleitfauna), von denen drei *L. pneumophila*- mit LEGPNE1 und zehn *L. micdadei*-Zellen mit LEG705 in 18 µl wiedergefunden wurden.



**Abb. E.1:** *In situ* Hybridisierung einer Infektion von *A. castellanii* mit *P. aeruginosa* (grün) und *L. pneumophila* (orange), null Stunden nach der Infektion. Die Bilder a und b zeigen jeweils identische Ausschnitte. a) Übereinanderlagerung der Hybridisierungen mit EUB338-FLUOS und LEGPNE1-cy3, b) Phasenkontrast.



**Abb. E.2:** *In situ* Hybridisierung einer Infektion von *A. castellanii* mit *L. micdadei* (grün) und *L. pneumophila* (orange), sechs Stunden nach der Infektion. Die Bilder a und b zeigen jeweils identische Ausschnitte. a) Übereinanderlagerung der Hybridisierungen mit LEG705-FLUOS und LEGPNE1-cy3, b) Phasenkontrast.

## E.2 *In situ* rRNA-Hybridisierung von Amöben

Um Amöben leichter nachweisen und bestimmen zu können, wurde die für Bakterien etablierte *in situ* Hybridisierung für die Anwendung bei diesen Einzellern optimiert. Als Sonden dienten Oligonukleotide, die zu 18S rRNA-Abschnitten der kleinen Untereinheit der Ribosomen (ssu rRNA) komplementär sind.

### E.2.1 Zellfixierung

Die Trophozoiten der Protozoen sind aufgrund ihrer Zellmorphologie empfindlicher gegenüber Chemikalien als Bakterien. Die gängigen Fixierungsmethoden für Prokaryoten sind daher nur bedingt geeignet. Es wurden bereits von verschiedenen Autoren diverse Protokolle für eine schonendere Fixierung entwickelt (z. B. Amann et al. 1990, Ammendola 1999, Fritsche et al. 1999, Stothard et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Ziel, ein Protokoll mit möglichst geringem Zeit- und Arbeitsaufwand und ohne Verwendung von Quecksilber zu erstellen, Kombinationen aus den oben genannten Veröffentlichungen getestet. Die unter D.11.2 beschriebene Vorgehensweise hat sich dabei am besten bewährt. Dabei behalten die Zellen ihre äußere Form durch die Einbettung in Agarose (Fritsche et al. 1999) und werden durch die anschließende Fixierung mit 2 % Paraformaldehyd (Ammendola 1999) für die Sonden permeabilisiert. Die Entwässerung in einem einzigen, sehr kurzen Ethanol-schritt minimiert das Schrumpfen der Zellen (Fritsche et al. 1999). Als Nachteil ist festzuhalten, dass die eingebetteten Amöben im Phasenkontrast oft nur sehr schlecht in der Agaroseschicht zu sehen sind.

Die Zugänglichkeit der Amöben für Oligonukleotidsonden wurde in Hybridisierungen verschiedener Amöbenstämme mit der von Amann et al. publizierten Sonde EUK516 getestet (Amann et al. 1990). Diese Sonde ist zu einem hochkonservierten Abschnitt der 18S rRNA der Eukaryoten komplementär. Das kombinierte Fixierungsprotokoll sowie die für Bakterien etablierte Hybridisierungsmethode

(Manz et al. 1992) erwiesen sich für die Amöben als gut geeignet. Um ein eindeutiges Fluoreszenzsignal zu erhalten, mussten lediglich die Menge an markierter Sonde auf 150 ng/well erhöht und die Hybridisierungszeit auf zwei Stunden verlängert werden.

### **E.2.2 Entwicklung von neuen gattungsspezifischen Oligonukleotidsonden**

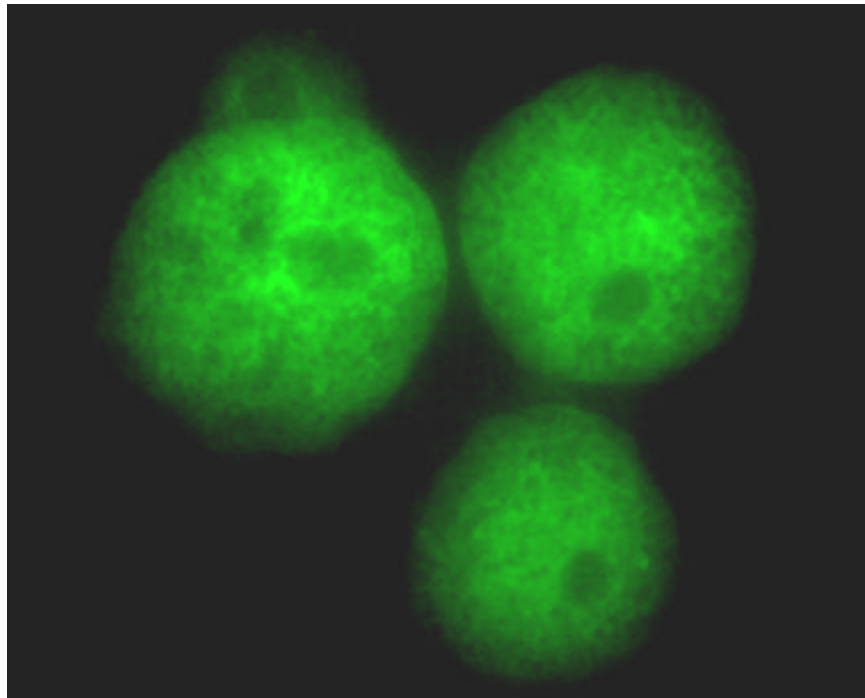
Freilebende Süßwasser-Amöben stellen ein wichtiges Reservoir für pathogene Bakterien, z. B. *Legionella* spp., dar. Einige Arten, wie *Naegleria fowleri*, sind darüberhinaus für den Menschen pathogen. Anhand von Vergleichen mit in der Datenbank ARB der TU München hinterlegten Sequenzen wurden zwei 18S rRNA-gerichtete Sonden für die Gattungen *Hartmannella* (HART498) und *Naegleria* (NAEG1088) entwickelt (Tab. D.4). Die je 18 Basen langen Oligonukleotide sind zu einem Abschnitt der 18S rRNA aller verfügbarer Arten der jeweiligen Gattung komplementär und zeigen mindestens einen Basenaustausch gegenüber allen anderen Sequenzen.

Um die Zugänglichkeit der gewählten rRNA-Region und die Spezifität der Sonden *in situ* zu testen, wurden Hybridisierungen mit den in Tab. D.7 aufgelisteten Referenzstämmen durchgeführt. Hierbei wurde der Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer in 10er-Schritten von 0 % bis 60 % variiert. Das stärkste Fluoreszenzsignal von NAEG1088 mit *N. lovaniensis* wurde bei 30 % Formamid erreicht. Bei dieser Stringenz konnten keinerlei Falsch-Positiv-Reaktionen mit den nicht-*Naegleria*-Stämmen beobachtet werden (Abb. E.3). *H. vermiformis* zeigte mit HART498 bei 40 % das stärkste Fluoreszenzsignal, während die nicht-*Hartmannella*-Stämme nicht mit der Sonde hybridisierten (Abb. E.4).

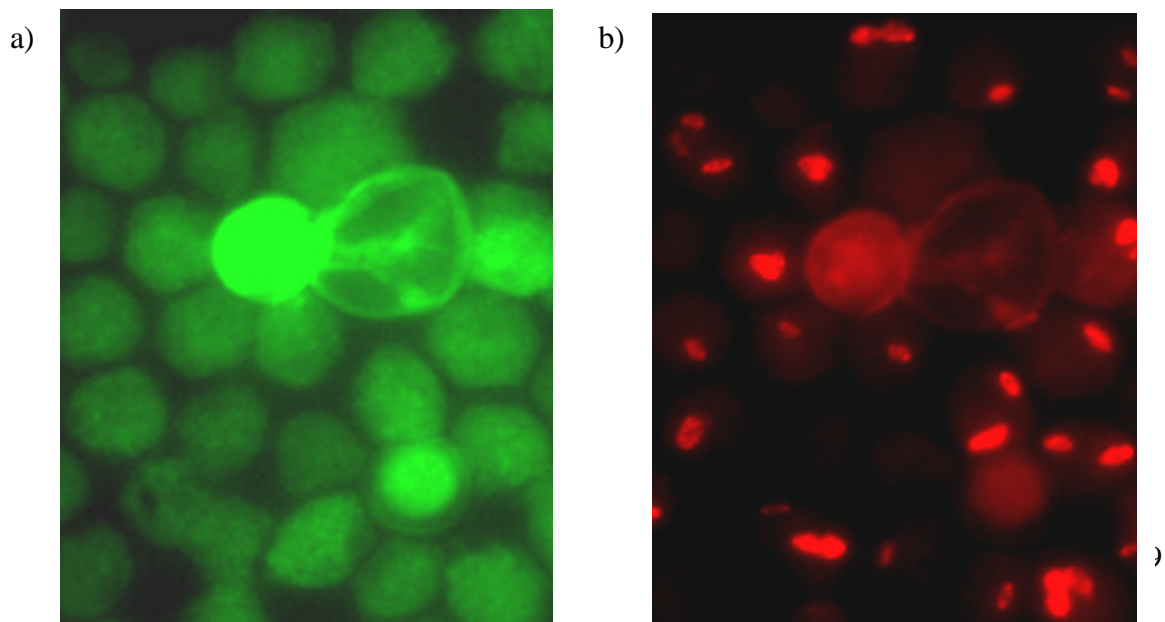
Amöben aus Flüssigkulturen zeigten in *in situ* Hybridisierungen eine ziemlich abgerundete Form, Kern und Vakuolen waren höchstens andeutungsweise zu erkennen (Abb. E.3, E.4). Demgegenüber waren Amöben, die auf NNA-Platten gehalten wurden, sehr vielgestaltig, Kern und Vakuolen waren hier deutlich als dunkle (da rRNA-freie) Bereiche zu sehen (Abb. E.12, E.14, Kapitel E.3.5).

Amöbenzysten aller untersuchten Stämme zeigten grundsätzlich eine sehr starke Eigenfluoreszenz. Sie ließ sich auch durch Gegenfärbung mit Evans Blue nicht mindern. Wird nur eine Sonde mit einem Farbstoff verwendet, kann durch Kontrolle über die Fluoreszenzanregung in einem anderen Filter diese Eigenfluoreszenz von der gewünschten Fluoreszenz, die durch Hybridisierung hervorgerufen wird, unterschieden werden. Zudem sind die Zysten durch ihre abgekugelte Form und die einheitliche

Fluoreszenz, die immer stärker ist als das Hybridisierungssignal, von den hybridisierten Trophozoiten unterscheidbar (Abb. E.4).



**Abb. E.3:** *In situ* Hybridisierung von *N. lovaniensis* mit NAEG1088-FLUOS.



**Abb. E.4:** *In situ* Hybridisierung einer Infektion von *H. vermiformis* (grün) mit *L. pneumophila* (rot), 15 Stunden nach der Infektion. Deutlich zu erkennen ist die von den Trophozoiten unterschiedliche Morphologie der Zyste in der Bildmitte sowie ihre Eigenfluoreszenz. Die Bilder a und b zeigen jeweils identische Ausschnitte. a) HART498-FLUOS, b) LEGPNE1-cy3.

Ein weiteres Problem bei Hybridisierungen von Amöben trat bei der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs cy3 auf. Dieser Farbstoff gilt allgemein als sehr fotostabil und zeigt eine stärkere Fluoreszenz als z. B. FLUOS. Cy3 scheint jedoch in manchen Amöben mit Bereichen der Ribosomen zu reagieren, ribosomenfreie Organellen blieben dunkel wie bei 'echten' rRNA-Bindungen. In Hybridisierungsversuchen mit den cy3-gelabelten Sonden LEG705, LEGPNE1, HART498 und NAEG1088 zeigten *Naegleria* spp., *Saccamoeba* spp., *Vannella* spp. und *Vahlkampfia ovis* deutliche Fluoreszenzsignale mit jeder dieser Sonden, während mit denselben FLUOS-markierten Sonden nur bei *Naegleria* spp. mit NAEG1088 eine Reaktion zu beobachten war. Das bedeutet, dass die beobachteten Falsch-Positiv-Reaktionen nicht auf Fehlbindungen der Sonden mit Amöben-rRNA-Abschnitten beruhen, da sonst auch die FLUOS-markierten Sonden ein Signal ergeben hätten. Daher wurden für alle weiteren Versuche nur noch FLUOS-gelabelte Amöbensonden verwendet.

### E.2.3 Kombination von 16S rRNA- und 18S rRNA-gerichteten Gensonden

Für die Analyse der Interaktion von Amöben und Bakterien sind Infektionsassays eine mögliche Methode. Um die Ergebnisse solcher Studien besser dokumentieren zu können, wurden im folgenden Infektionen von *H. vermiformis* mit *L. pneumophila* Corby hybridisiert.

Da Hartmannellen keine Kreuzreaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff cy3 zeigten, konnten in Hybridisierungen von Infektionsassays sowohl cy3- als auch FLUOS-markierte Sonden verwendet werden. Die Infektion mit *L. pneumophila* musste jedoch abweichend zum Standardprotokoll (D.10) bei 23 °C und in PYNFH-Medium durchgeführt werden, um eine Enzystierung der Amöben (als Reaktion auf die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen bei 30 °C und den Nährstoffmangel im

Assay-Medium) zu verhindern. In der Hybridisierung sind 15 Stunden nach der Infektion deutlich rot fluoreszierende Legionellen innerhalb der grün fluoreszierenden Hartmannellen zu erkennen (Abb. E.4). Eine simultane Hybridisierung von intrazellulär vorliegenden Bakterien mit 16S rRNA-Sonden und den Amöbenwirten mit 18S rRNA-Sonden ist somit ohne Interferenzen möglich.

## **E.3 Umweltuntersuchungen**

### **E.3.1 Gewässercharakterisierung**

Die Untersuchung verschiedener aquatischer Biotope im Raum Würzburg sollte Aufschluss über mögliche Präferenzen der Legionellen für bestimmte Gewässereigenschaften geben. Dazu wurden 21 Standorte biologisch und physikalisch charakterisiert (H.3 im Anhang, Tab. E.1, E.2) und insgesamt 66 mal beprobt. Um eventuelle diurnale Schwankungen auszuschließen, wurden die Messungen und Probenahmen immer morgens zur gleichen Zeit vorgenommen. Die Proben bestanden aus Wasser bzw. biofilmtragendem Material (z. B. Blätter, Federn). Desweiteren wurden Polypropylen-Röhrchen für vier bzw. sechs Wochen und Latex-Handschuhe für vier Wochen zur Biofilmbildung im Gewässer exponiert. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte innerhalb von sechs Stunden.

Bezüglich Fauna und Flora der Standorte wurden lediglich auffällige Merkmale (z. B. Vorkommen von Enten oder höheren Pflanzen) notiert.

Die physikalischen Eigenschaften unterschieden sich zum Teil erheblich (Tab. E.1, E.2). Hierbei sind v. a. die Strömungsunterschiede zwischen Still- und Fließgewässern bzw. innerhalb der Fließgewässerstandorte zu nennen. Zudem konnten starke Unterschiede im Wasserstand beobachtet werden, die durch Hochwasser (im Main) bzw. durch regelmäßiges Ablassen von künstlichen Gewässern (im Ringpark) bedingt waren. Die elektrische Leitfähigkeit variierte ebenfalls sehr stark, so konnten in der stark eutrophen "Fontäne Pleicherglaci" Werte von bis zu 1183  $\mu\text{S}/\text{cm}$  gemessen werden, während an anderen Probenahmeorten relativ geringe Werte um 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$  gemessen wurden (# 4, 20). Die pH-Bandbreite war relativ gering und bewegte sich im neutralen bis schwach basischen Be-



reich (7,59 - 8,52). Die gemessenen Temperaturen variierten bedingt durch die jahreszeitlichen Schwankungen sehr stark (2,0 - 22,5 °C).

Am Beispiel zweier ausgewählter Gewässer (# 4 - Main in Heidingsfeld, # 8 - "Fontäne Pleicherglaciis" im Ringpark) sollte das Auftreten von saisonalen Schwankungen genauer untersucht werden. Die regelmäßig erfassten physikalischen Parameter (pH, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit) zeigten die üblichen jahreszeitlichen Schwankungen, die beispielsweise durch die unterschiedliche Fotosyntheserate erklärbar sind (Abb. E.5 - E.7).

Tab. E.1: Beschreibung der Habitate.

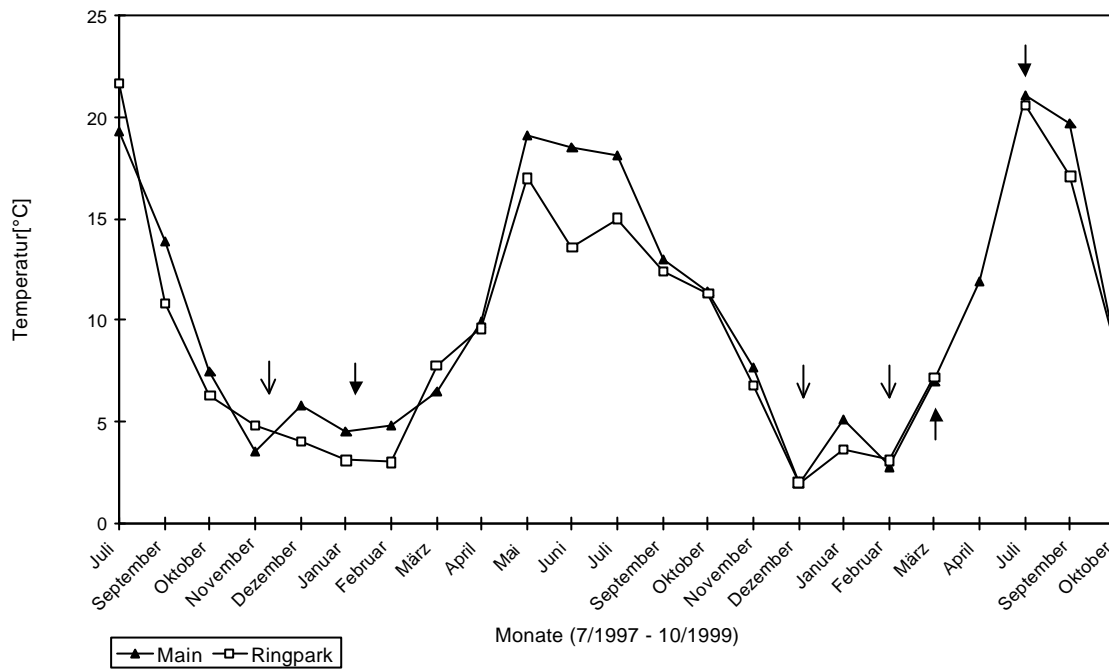
Nr.	Ort, Gewässerart *	Strömung	Fauna	Flora
1	Wü-Heidingsfeld, linkes Mainufer	+		Uferpflanzen, Grünalgen
2	Wü-Sanderau, rechtes Mainufer (K.-Adenauer-Brücke)	+		Uferpflanzen, Gräser
3	Wü-Heidingsfeld, linkes Mainufer (Nikolaustor)	+		Gräser
4 **	Wü-Heidingsfeld, linkes Mainufer (Taschenäckerweg)	+	Enten; Decapode, Daphnien, Ostracoden	Gräser, Grünalgen
5	Wü-Heidingsfeld, linkes Mainufer (⊖ Reuterstr.)	+		Hydrophyten, Grünalgen
6	Wü-Zellerau, linkes Mainufer (Sportplatz)	++		Hydrophyten, Grünalgen
7	Höchberg, Gartenteich	-	Daphnien, Isopoden; Nematoden	
8 ***	Wü Ringpark (N), Teich "Fontäne Pleicherglaciis"	-	Enten; Dipterenlarven, Corixiden; Daphnien, Copepoden, Cladoceren, Ostracoden	Grünalgen
9	Wü Ringpark (O), Teich "Nizza-Teiche"	-	Enten, Fische	Grünalgen
10	Wü Ringpark (S), Teich "Wassergarten"	-	Ephemeropterenlarven	Grünalgen
11	Wü Mainviertel, Teich der ehem. Landesgartenschau	-	Gerriden, Corixiden, Notonecten, Dipterenlarven; Acari; Copepoden, Ostracoden; Nematoden	Grünalgen
12	Wü Jugendgästehaus, Teich	-	Enten	Grünalgen
13	Wü Ringpark (N), Springbrunnen "Kiliansbrunnen"	-		Grünalgen, Phytoplankton
14	Wü Ringpark (S), Springbrunnen "Ruschkewitz-Brunnen"	-	Ephemeropteren-, Dipterenlarven	Phytoplankton
15	Wü Ringpark (S), Springbrunnen "Lindahl-Brunnen"	-		Grünalgen
16	Wü Ringpark (O), Springbrunnen "Schönborn-Brunnen"	-		Grünalgen
17	Wü Ringpark (O), Springbrunnen "Felsenbrunnen"	-	Enten	Grünalgen
18	Wü Hofgarten, Springbrunnen vor der Residenz	-	Enten	Grünalgen
19	Wü Stadtmitte, Springbrunnen "Vierröhrenbrunnen"	-		Grünalgen
20	Gschwend (Landkreis Aalen), Badsee	-		Gräser
21	Reichenberg, Reichenberger Bach (⊖ Siebertsklinge)	-	Gammariden	rotes Springkraut, Bachbunge, Grünalgen

- \* Wü: Würzburg, N: Norden, O: Osten, S: Süden, Ø: Haltestelle
- \*\* z. T. starkes Hochwasser
- \*\*\* mindestens teilweise zugefroren am 14.01.1998, 18.02.1998, 8.12.1998, 9.02.1999;  
vollständig abgelassen im März 1998 und April 1999

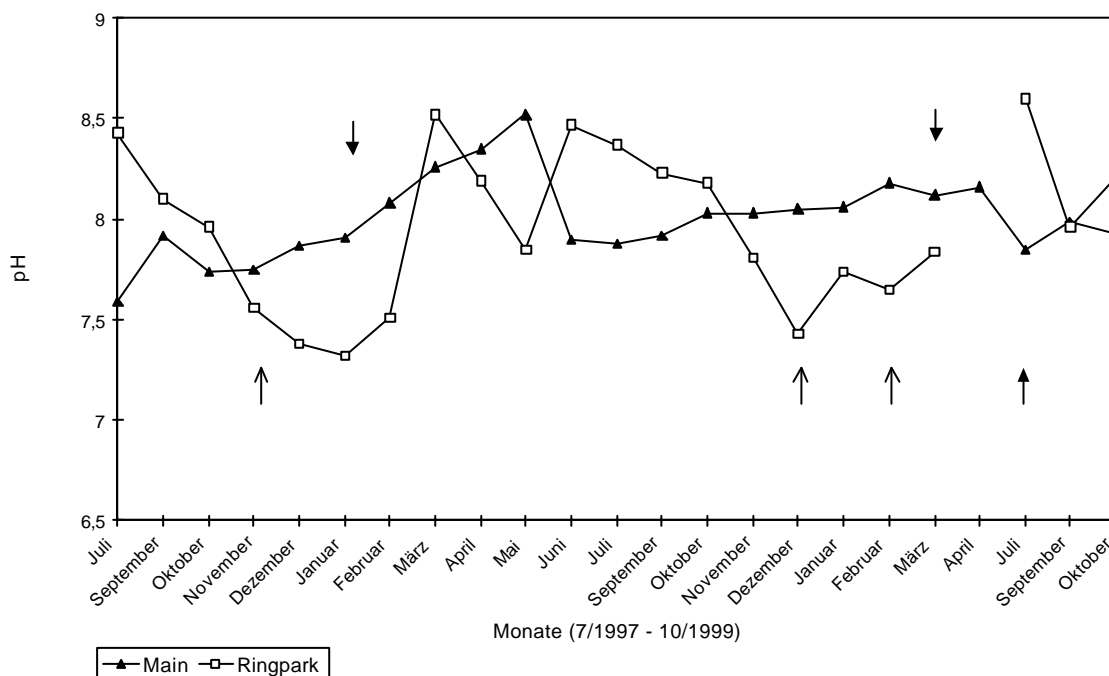






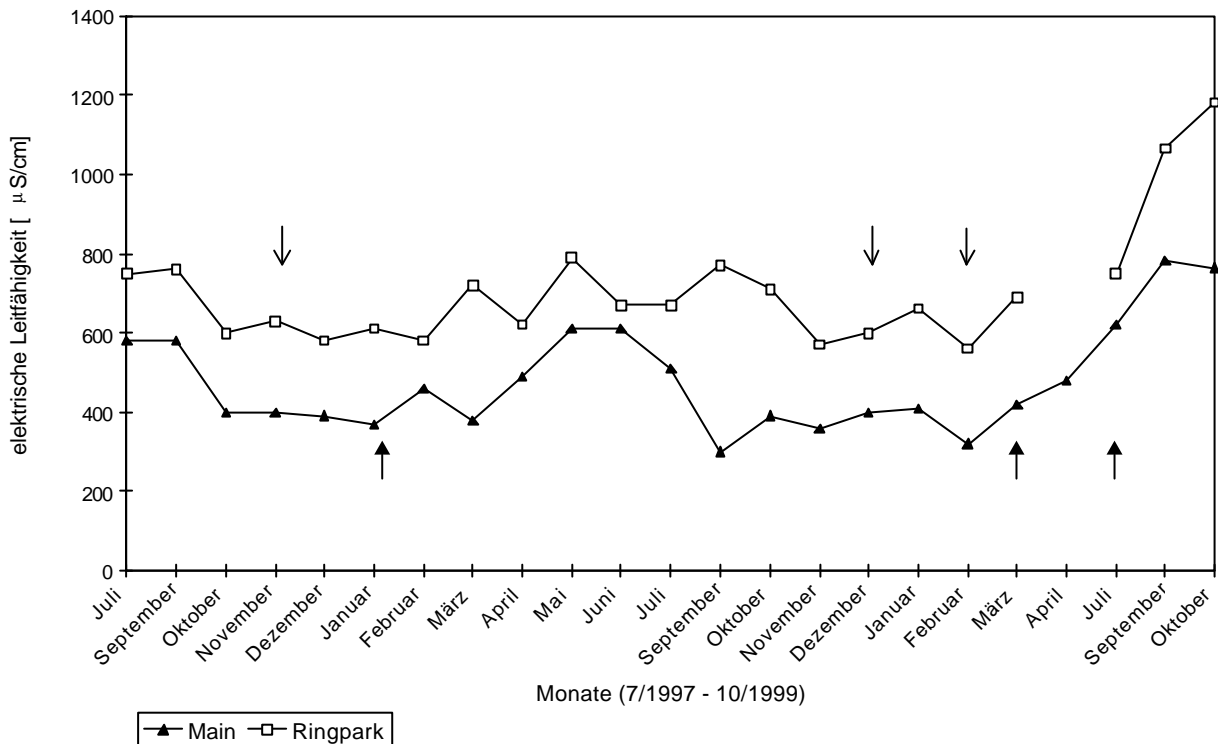


**Abb. E.5:** Temperatur in den Probenahmestellen # 4 (Main) und # 8 (Ringpark) über 30 Monate hinweg. Die Pfeile deuten auf Proben hin, in denen keine Legionellen nachgewiesen werden konnten



(ausgefüllte Pfeile: Main, einfache Pfeile: Ringpark).

**Abb. E.6:** pH-Wert in den Probenahmestellen # 4 (Main) und # 8 (Ringpark) über 30 Monate hinweg. Die Pfeile deuten auf Proben hin, in denen keine Legionellen nachgewiesen werden konnten (ausgefüllte Pfeile: Main, einfache Pfeile: Ringpark).



**Abb. E.7:** Elektrische Leitfähigkeit in den Probenahmestellen # 4 (Main) und # 8 (Ringpark) über 30 Monate hinweg. Die Pfeile deuten auf Proben hin, in denen keine Legionellen nachgewiesen werden konnten (ausgefüllte Pfeile: Main, einfache Pfeile: Ringpark).

### E.3.2 Nachweis von *Legionella* spp.

Die Detektion der Legionellen erfolgte mittels drei verschiedener Ansätze: FISH, Kultivierung, PCR. Hierbei erwies sich die *in situ* Hybridisierung als beste Methode, da sie auch nicht kultivierbare Bakterien erfasste (siehe Kapitel E.3.4) und eine sehr hohe Sensitivität zeigte. Den Angaben zur Verbreitung der Legionellen werden daher die Ergebnisse der FISH zugrunde gelegt (Kapitel E.3.3).



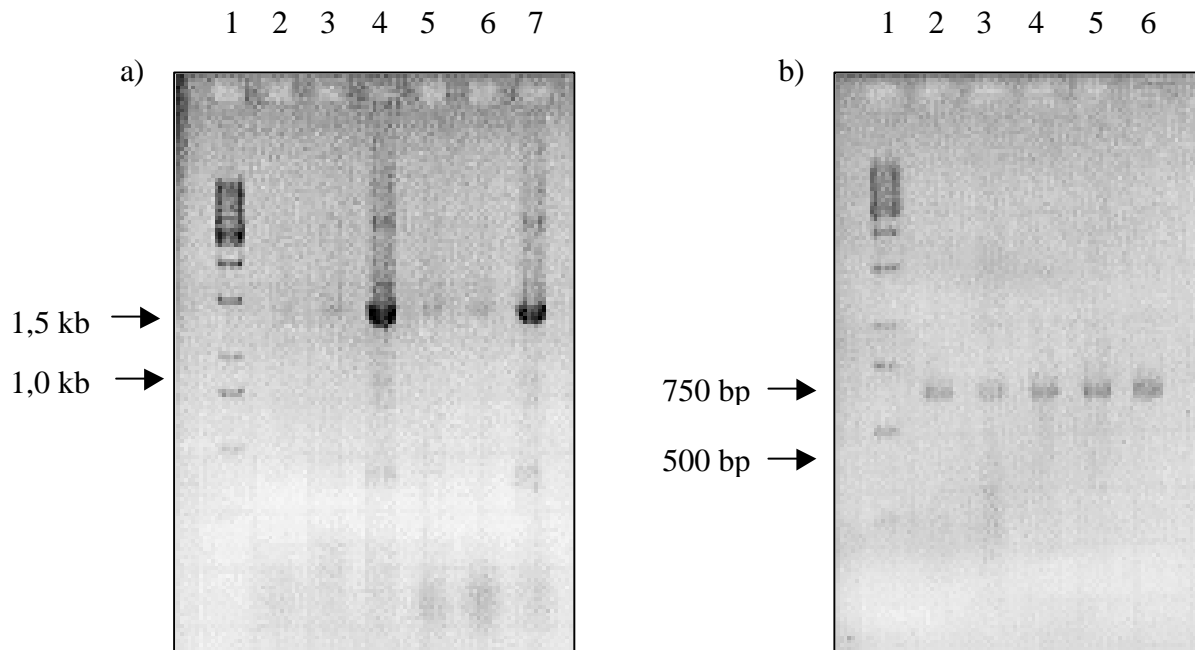
Für den PCR-Nachweis wurde eine DNA-Extraktion nach Pabst et al. durchgeführt (Pabst et al. 1997). Die beschriebene Vorgehensweise erwies sich als gut geeignet, hatte allerdings den Nachteil, dass alle in der Probe enthaltene DNA (eukaryotisch und prokaryotisch) isoliert wird. Der Anteil an *Legionella*-DNA, die als Target für die Primer verwendet wurde, war daher so gering, dass eine sogenannte nested PCR durchgeführt werden musste. Im ersten Schritt wurde ein etwa 1,3 kb langer Abschnitt der eubakteriellen 16S rDNA amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde einer zweiten PCR unterzogen, um einen ca. 660 Basen langen Abschnitt der *Legionella*-16S rDNA zu amplifizieren. Aufgrund der geringen Menge an Target-DNA mussten für beide Reaktionen die einzelnen Schritte in jedem der 35 Zyklen auf die 1,5-fache Länge verlängert werden, um eine deutlich sichtbare Bande auf dem Agarosegel zu erzielen (Abb. E.8). Für *L. pneumophila* standen leider keine geeigneten Primer zur Verfügung, die innerhalb des *Legionella*-PCR-Produkts spezifisch binden, daher konnte ein PCR-Nachweis nur auf der Gattungsebene stattfinden. Da die PCR im Vergleich zur FISH-Methode eine sehr geringe Sensitivität aufwies, wurde sie nur stichprobenartig durchgeführt.

### E.3.3 Bestimmung von *Legionella* spp. in Umweltproben

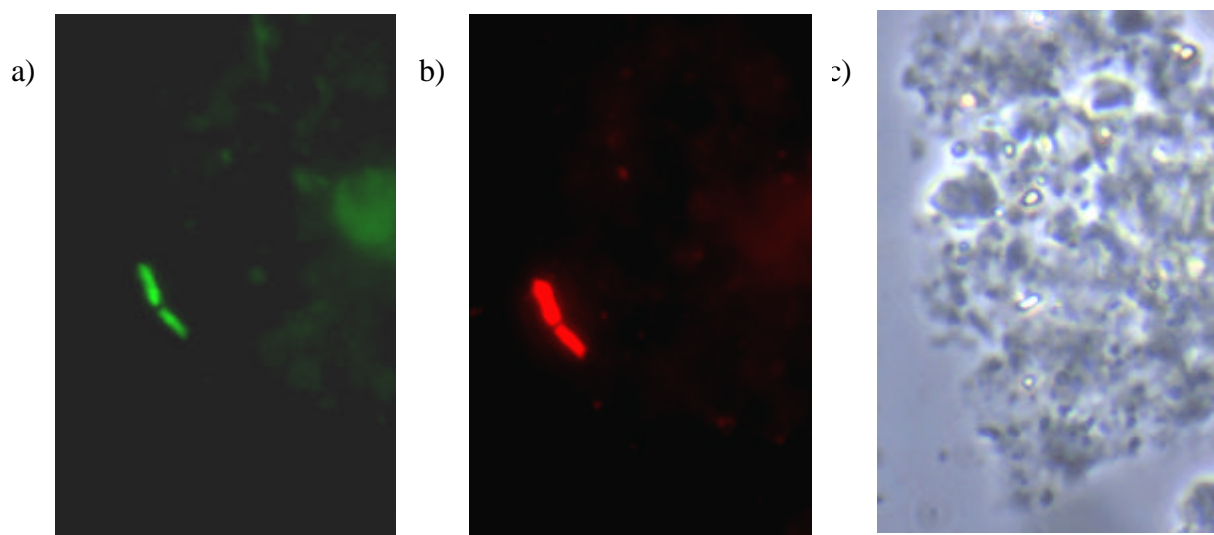
Legionellen konnten mit PCR und FISH zwar nachgewiesen, aber nicht bis auf die Art bestimmt werden. Daher wurde das *Legionella*-PCR-Produkt aus den Proben 4-22 und 8-21 (Tab. E.2) mit den *Legionella*-Primern ansequenziert, um einen Hinweis auf die in diesen Gewässern vorhandenen Arten zu erhalten. Die Sequenz wurde mit den in der Datenbank BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) gespeicherten Sequenzen verglichen. Im Sequenziergel waren häufig verschiedene Banden auf gleicher Höhe zu sehen, was auf das Vorhandensein mehrerer Arten hindeutet. Beim Sequenzvergleich wurden zahlreiche *Legionella*-Arten mit der gleichen Prozentzahl an Übereinstimmung in der 16S rDNA gefunden (je nach Länge der auswertbaren Sequenz bis zu 100 % für *L. birminghamensis*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. donaldsoni*, *L. dumoffii*, *L. feelii*, *L. geestiana*, *L. gormanii*, *L. gresilensis*, *L. jordansii*, *L. nautarum*, *L. parisiensis*, *L. pneumophila*, *L. quateirensis*, *L. sainthelesi*, *L. steigerwaldti*, *L. worliensis*, LLAP 1/2/4/7/8/9/11/12).

### E. 3.4 Verbreitung von *Legionella* spp.

Von den 28 Proben aus den sechs Mainstandorten waren 21 Proben (vier Standorte) *Legionella*-positiv (Tab. E.2). Die gemessene Temperatur betrug 2,0 - 21,1 °C; die pH-Werte lagen bei 7,59 - 8,52; die elektrische Leitfähigkeit schwankte zwischen 360 - 782  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Einer der beiden *Legionella*-negativen Mainstandorte wies eine relativ starke Strömung auf (# 6).



**Abb. E.8:** Nachweis von *Legionella* spp. (Tab. E.2) mittels PCR. a) Eubakterielle Primer 63f + 1387r; 1: 1 kb-Leiter, 2 und 3: DNA aus 4-13, 4 und 7: *E. coli*-Lysat, 5 und 6: DNA aus 8-13. b) Nested PCR mit *Legionella*-Primern leg225 + leg858; 1: 1 kb-Leiter, 2 und 3: PCR-Produkt von 4-13, 4 und 5: PCR-Produkt von 8-13, 6: *L. anisa*-Lysat.



**Abb. E.9:** *In situ* Hybridisierung von *L. pneumophila* in einer Biofilmprobe aus dem Main (1-1). Die Bilder a, b und c zeigen jeweils identische Ausschnitte. a) LEG705-FLUOS, b) LEGPNE1-cy3, c) Phasenkontrast.

Aus zwei Standorten konnte *L. pneumophila* nachgewiesen werden (# 1, 5; Abb. E.10). In # 5 wurden folgende physikalische Parameter gemessen: Temperatur 22,2 °C, pH 7,74, elektrische Leitfähigkeit 650 µS/cm.

In der insgesamt 23 mal untersuchten Probenahmestelle # 4 wurde nie *L. pneumophila* gefunden, viermal konnten keine *Legionella* spp. nachgewiesen werden. Diese negativen Ergebnisse waren weder jahreszeitlich noch durch signifikante Veränderungen der physikalischen Parameter gekennzeichnet (Abb. E.5 - E.7).

Der Reichenberger Bach zwischen Würzburg und Reichenberg (# 21) wies sowohl *Legionella* spp. als auch *L. pneumophila* auf. Die gemessenen Wasserparameter waren: Temperatur 15,4 °C, pH 8,07, elektrische Leitfähigkeit 670 µS/cm.

Von den 14 Stillgewässerstandorten (38 Proben) waren 12 *Legionella*-positiv (außer # 10, 13; Tab. E.2). Sie wiesen eine weite Bandbreite der gemessenen Wasserparameter auf: Temperatur 3,1 - 22,5 °C, pH 7,32 - 8,7, elektrische Leitfähigkeit 300 - 1183 µS/cm.

Vier der untersuchten Habitate waren *L. pneumophila*-positiv (# 9, 12, 15, 18). Hier hatten die physikalischen Parameter folgende Werte: Temperatur 11,0 - 19,6 °C, pH 7,64 - 8,7, elektrische Leitfähigkeit 580 - 1050 µS/cm.

Aus dem Springbrunnen # 18 konnten sowohl *Legionella* spp. als auch *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Die Wasserparameter betragen: Temperatur 13,2 °C, pH 8,7, elektrische Leitfähigkeit 759 µS/cm.

Die Probenahmestelle # 8 wurde insgesamt 22 mal beprobt, wobei bis auf drei Proben alle *Legionella* spp.-positiv waren. Die *Legionella*-negativen Probenahmen fanden alle im Winter statt (November, Dezember, Februar); hierbei mussten zwei Mal reine Wasserproben gezogen werden, da

der Teich bis auf eine kleine Fläche am Ufer zugefroren war. Die Wasserparameter wiesen keine auffälligen Besonderheiten auf (Abb. E.5 - E.7).

Insgesamt betrachtet sind weder für *Legionella* spp. noch für *L. pneumophila* signifikante Präferenzen für die untersuchten Parameter erkennbar (Tab. E.3). Die Bakterien sind sowohl in Fließ- als auch in Stillgewässern verbreitet und sind in der Lage, eine relativ große Bandbreite bezüglich Temperatur und elektrischer Leitfähigkeit zu tolerieren. Die in den Habitaten gemessenen pH-Werte bewegen sich in einem verhältnismässig engen Bereich und lassen ebenfalls keine Vorlieben der Legionellen erkennen.

**Tab. E.3:** Vorkommen von Legionellen in Umweltproben.

	Fließgewässer	Stillgewässer
Anzahl an Proben	28	38
Art der Probe:		
Biofilm [%]	100	81,6
Wasser [%]	0	36,8
Bakterien:		
<i>Bacteria</i> [%] *	100	100
<i>Legionella</i> spp. [%] **	82,1	78,9
<i>L. pneumophila</i> [%] ***	11,1	11,1
physikalische Parameter:		
pH	7.74 - 8.35	7.3 - 8.7

---

elektrische Leitfähigkeit [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	320 - 782	300 - 1183
Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	2.0 - 22.2	3.0 - 22.5

---

- \* positives Signal bei Hybridisierung mit EUB338
- \*\* positives Signal bei Hybridisierung mit LEG705
- \*\*\* positives Signal bei Hybridisierung mit LEGPNE1

### E.3.5 Isolierung von *Legionella* spp.

Um die mittels FISH und PCR nachgewiesenen Legionellen genauer zu charakterisieren, wurden von jeder gezogenen Wasser- bzw. Biofilmprobe Aliquots auf VPC-BCYE ausplattiert. Trotz der Säure- oder Hitzebehandlung der Proben und der in den Agarplatten enthaltenen Antibiotika wuchs eine beträchtliche Anzahl an begleitenden Bakterien und Pilzen. Nur ein einziges Mal gelang es, einen *Legionella*-Stamm zu isolieren (Probe 18-1).

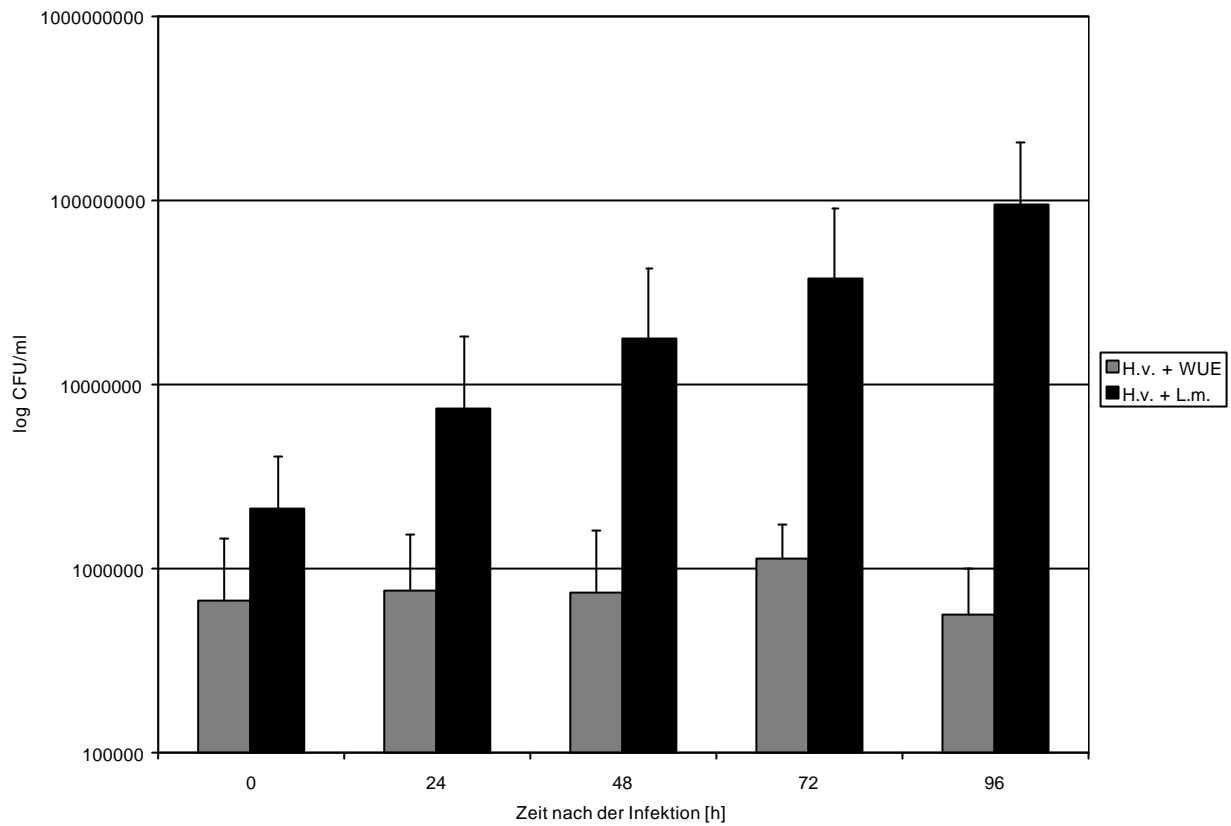
Dieses Isolat WUE 18-1 wuchs auf BCYE-Platten, jedoch nur mit Cystein- und Eisen-Supplementierung. In der *in situ* Hybridisierung konnte eine positive Reaktion mit der *Legionella-ceae*-spezifischen Sonde LEG705 beobachtet werden, es erfolgte keine Bindung an die *L. pneumophila*-spezifische Sonde LEGPNE1. WUE 18-1 zeigte die richtige Bande in der PCR mit den *Legionella*-spezifischen Primern leg225 und leg858. Die Sequenzierung dieses amplifizierten PCR-Produkts ergab hohe Ähnlichkeiten mit der 16S rDNA von *L. maceachernii* bzw. *L. micdadei*. Da beide Arten auf der DNA-Ebene eng verwandt sind, war eine exakte Identifizierung erst nach Immunoassays mit polyklonalem Kaninchenserum bzw. monoklonalen Antikörpern gegen *L. micdadei* (in beiden Fällen positive Reaktion) möglich (Lück et al. 1995). Zusätzlich wurde eine gaschromatografische Analyse des Fettsäuremusters der Zellwand durchgeführt. Auch diese Untersuchung ergab, dass es sich bei dem Isolat um *L. micdadei* handelt. Der Zuordnungskoeffizient lag hier mit 0,673 sogar weit über dem geforderten Minimum von 0,5 (Lück, pers. Mitt.).

In Infektionen von Amöben der Art *H. vermiformis* zeigte das Isolat im Gegensatz zu *L. micdadei* ATCC 33218 keine Replikation, war jedoch in der Lage zu persistieren (Abb. E.10). In *A. castellanii* vermehrte es sich nach 72 Stunden um zwei log-Stufen. Nach 96 Stunden ging die Anzahl an intrazellulären Bakterien wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. E.11).

### E.3.6 Isolierung und Bestimmung von Amöben

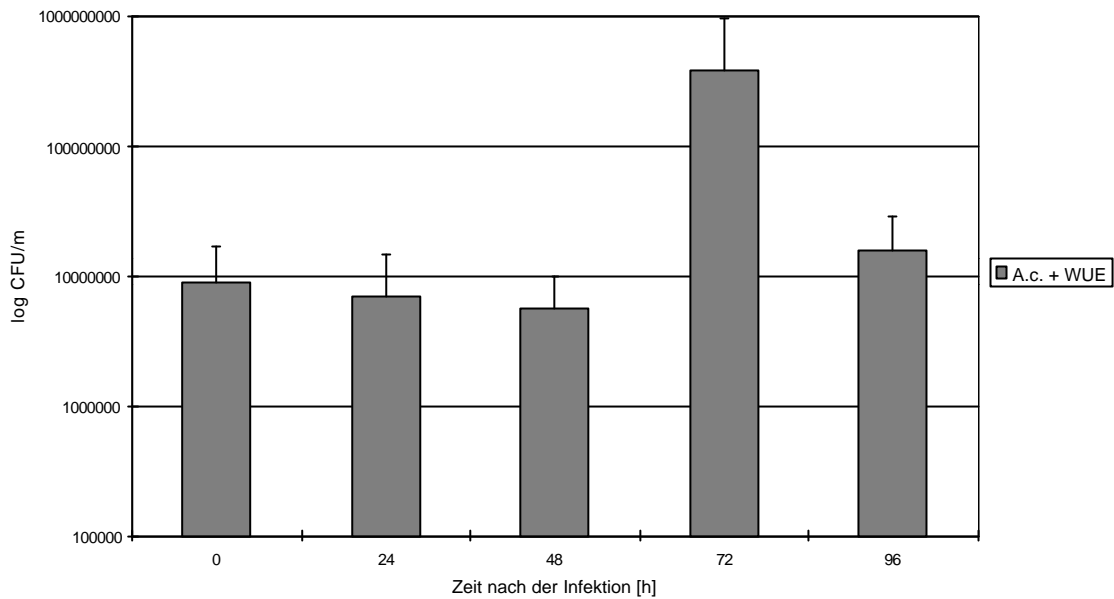
Von den *Legionella*-positiven Standorten wurden die regelmäßig gezogenen Proben aus einem Fließgewässer (# 4) und einem Stillgewässer (# 8) ab September 1998 zusätzlich auf das Vorkommen von Amöben als möglichen Wirtsorganismen untersucht. Der Springbrunnen im Hofgarten (#

18), in dem sowohl *Legionella* spp. als auch *L. pneumophila* durch FISH bzw. *L. micdadei* durch



Kultur nachgewiesen wurde, wurde einmal auf Amöben hin beprobt.

**Abb. E.10:** Infektion von *H. vermiformis* (H.v.) mit *L. micdadei* ATCC 33218 (L.m.) bzw. WUE 18-1 (WUE);  $1,3 \times 10^6$  Amöben/ml, MOI = 10.



**Abb. E.11:** Infektion von *A. castellanii* (A.c.) mit *L. micdadei* WUE 18-1 (WUE);  $2 \times 10^7$  Amöben/ml, MOI = 10.

Die verschiedenen Amöben wurden auf NNA-Platten vereinzelt, um die Isolate möglichst in Reinkultur zu erhalten. Manche Stämme ließen sich nur wenige Male passagieren, und eine dauerhafte Kultivierung wurde oft durch die Überwucherung der Amöben mit Pilzen erschwert. Die kultivierbaren Isolate wurden nach den morphologischen Kriterien Größe, Verhältnis Länge zu Breite, Vorhandensein und Beschaffenheit der Zyste, Form der Trophozoiten, Vorhandensein und Beschaffenheit von Schwimm- und Flagellatenstadien, Form und Bildungsweise der Pseudopodien klassifiziert. Anschließend folgte die weitere Identifizierung entsprechend ihrer Temperaturtoleranz durch Inkubation bei 37 °C, 40 °C bzw. 42 °C. Die Ergebnisse dieser Bestimmung wurden mit den Sonden HART498 und NAEG1088 verifiziert (Tab. E.4).

**Tab. E.4:** rRNA-Hybridisierung der Umweltamöben.

Stamm	Probe	<u>Hybridisierung mit den Sonden *</u>	
		HART498	NAEG1088



<i>Acanthamoeba</i> spp., Gruppe II	4-21	-	-	
<i>Didascalus</i> -like <i>Naegleria</i>	8-22		-	+
<i>Echinamoeba</i> spp.	8-20, 8-21, 8-22, 18-2	-	-	
<i>Echinamoeba</i> -like Amöben	4-22, 8-21, 8-22	-	-	
<i>Hartmannella</i> spp.	4-19		+	-
<i>Naegleria gruberi</i> -Komplex	4-21, 4-23, 8-20, 8-21, 8-22, 18-20	-	+	
<i>Platyamoeba placida</i>	18-2		-	-
<i>Saccamoeba</i> spp.	8-22		-	-
<i>Thecamoeba quadrilineata</i>	4-21		-	-
<i>Vexillifera</i> spp.	8-19		nd	nd

\* +: starkes Fluoreszenzsignal, -: kein Fluoreszenzsignal, nd: nicht durchgeführt

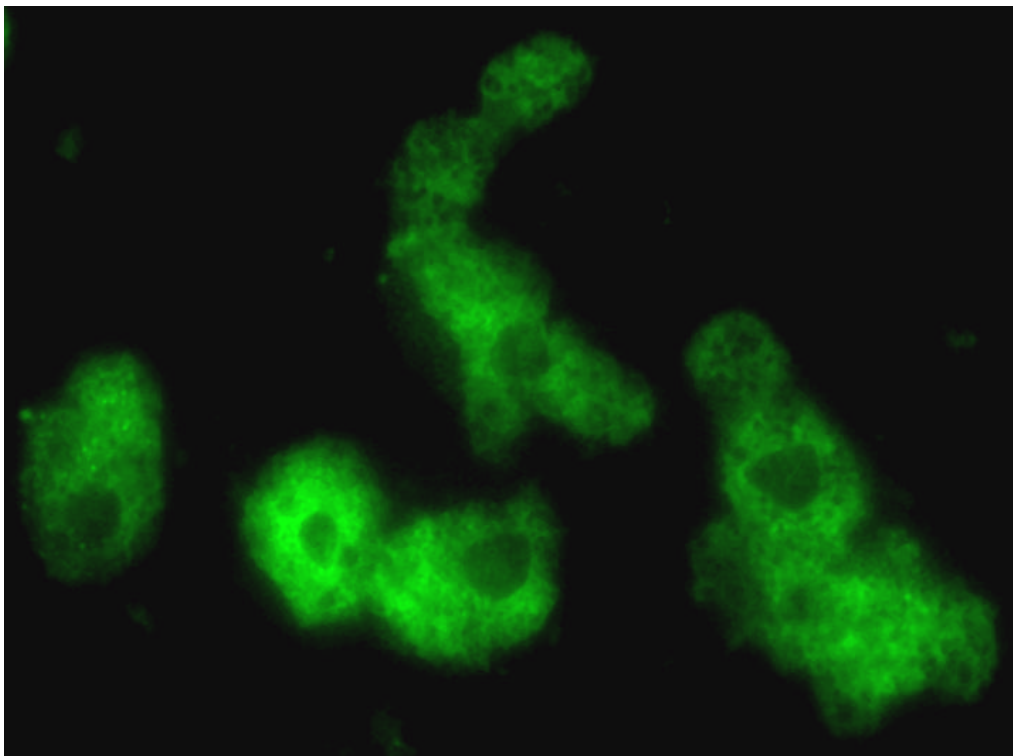
Insgesamt konnten Stämme aus acht Amöbengattungen kultiviert und bestimmt werden. Die am häufigsten gefundene Amöbengattung war *Naegleria*. Sie war in allen beprobten Standorten vorhanden und konnte auch zu verschiedenen Jahreszeiten nachgewiesen werden. Diese Gattung ist nach morphologischen Merkmalen relativ gut bestimmbar (Page und Siemensma 1991), die anschließende *in situ* Hybridisierung mit der 18S rRNA-Sonde NAE1088 ergab ein positives Signal. Die meisten kultivierten Spezies gehören zum nicht humanpathogenen *N. gruberi*-Komplex, da sie sich bei 42 °C nicht mehr vermehrten sondern enzystierten. Die drei aus der Probe 8-22 isolierten Naeglerien zeichnen sich durch sehr spärliche Flagellierung aus. Ein Stamm bildet zudem die Flagellaten erst relativ spät (nach über zwei Stunden) aus und besitzt die Tendenz, mehrkernige (zwei bis fünf) Trophozoi-ten zu bilden.

Aus dem Ringpark (# 8) wurde im Oktober eine sogenannte *Didascalus*-like Amöbe kultiviert. Die isolierten Amöben ähneln sehr stark Naeglerien. Sie bilden jedoch Zysten mit unauffälligen, kleinen, nicht verdickten Poren und besitzen keinen perinukleären Raum um den Kern. Der vorliegende Stamm besitzt sehr große Kerne und Endosomen, er bildet spät (nach zwei bis drei Stunden) nur wenige Flagellaten aus. Diese Merkmale weisen ihn als *Didascalus* aus (Page und Siemensma 1991), während die fehlende Schleimhülle und die porenbesitzenden Zysten eher auf eine untypische

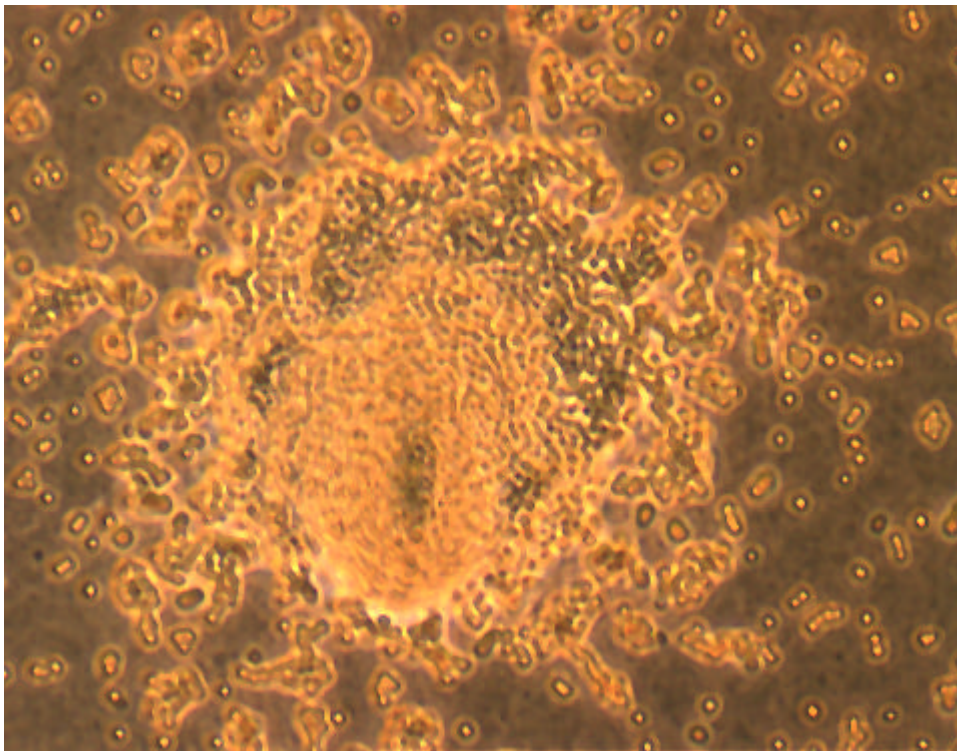
*Naegleria* hindeuten. Die *in situ* Hybridisierung mit der *Naegleria*-spezifischen Sonde NAEG1088 ergab ein eindeutig positives Signal (Abb. E.12).

Ebenfalls häufig waren *Echinamoeba* spp. sowie *Echinamoeba*-like Amöben. Letztere weisen zwar die morphologischen Merkmale der Echinamoeben auf, bilden allerdings keine Zysten. Sie werden daher als ‘*Echinaemoeba*-like’ oder ‘unidentifizierbare Mini-Amöben’ bezeichnet (Rohr et al. 1998). *Echinamoeba* spp. war in den Stillgewässern # 8 und # 18 zu finden, während die Mini-Amöben aus dem Teich # 8 und aus dem Main # 4 nachgewiesen werden konnten. Außerdem wurden Echinamoeben (# 8, 18) und Mini-Amöben (# 8) isoliert, die ein ‘soziales’ Wachstum zeigten (Abb. E.13). Das heißt, sie wanderten in Kulturen, die einige Tage alt waren, aufeinander zu und bildeten sowohl zwei- als auch dreidimensionale Aggregate. Dieses Phänomen war auch noch nach mehrmaligem Passagieren zu beobachten.

Verschiedene Gattungen wurden jeweils nur in einzelnen Proben gefunden. So konnte im Juli aus dem Main *Acanthamoeba* spp. isoliert werden. Die Acanthamoeben konnten aufgrund ihrer Endozysten-Struktur und ihrer Temperaturtoleranz (Vermehrung nur bis 37 °C,ENZYSTIERUNG bei 40 °C) der Gruppe II zugeordnet werden. Zu dieser Gruppe gehören *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina* und *A. rhyssodes*.



**Abb. E.12:** *In situ* Hybridisierung des Umweltisolats *Naegleria* sp. (*Didascalus*-like, aus einem Teich im Ringpark) mit NAEG1088-FLUOS.



**Abb. E.13:** Soziales Wachstum eines Umweltisolats von *Echinamoeba* spp. (aus einem Springbrunnen). Das Bild zeigt aggregierende Amöben auf *Klebsiella*-NNA-Platten.

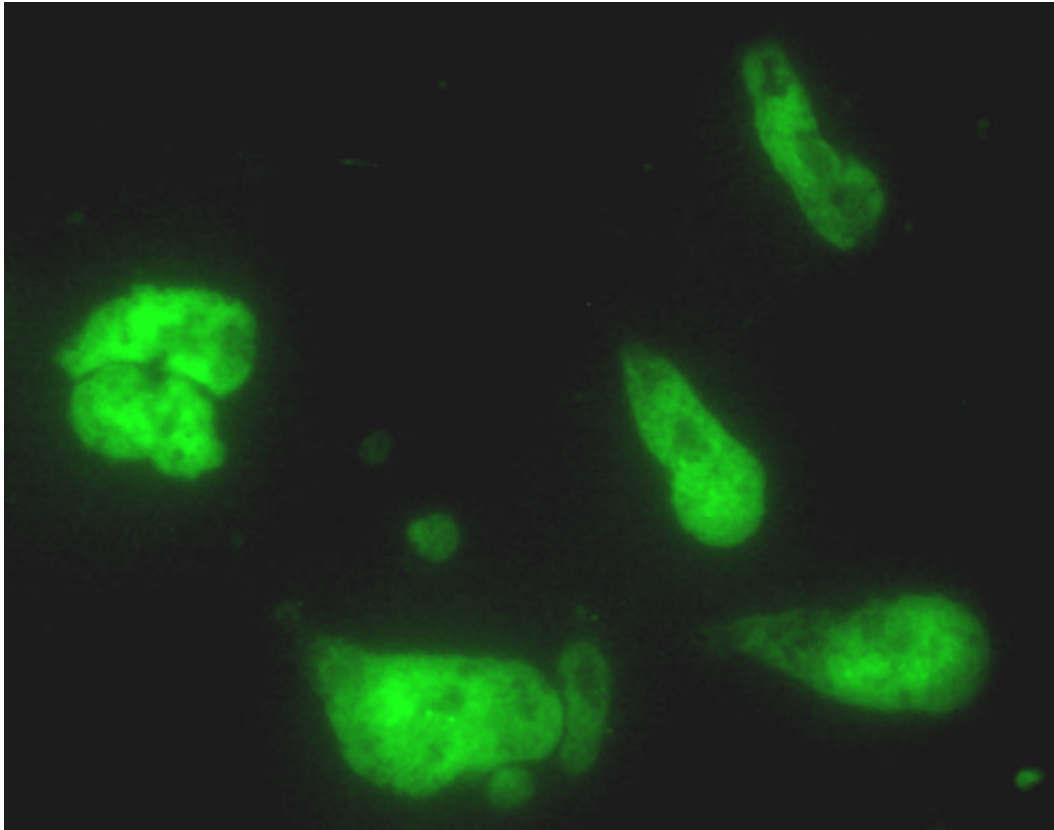
Ebenfalls aus dem Main wurde im März *Hartmannella* spp. kultiviert. Eine genauere Einordnung in eine der vier bekannten Arten war auf morphologischer Basis nicht möglich. Der isolierte Stamm zeigte ein eindeutig positives Signal in der *in situ* Hybridisierung mit HART498 (Abb. E.14).

Aus dem Springbrunnen im Hofgarten wurde im Dezember *Platyamoeba placida* isoliert. Auch bei diesem Isolat konnte ein soziales Wachstum beobachtet werden, das heißt, die Amöben bildeten nach einigen Tagen auf NNA-Platten Plaques aus.

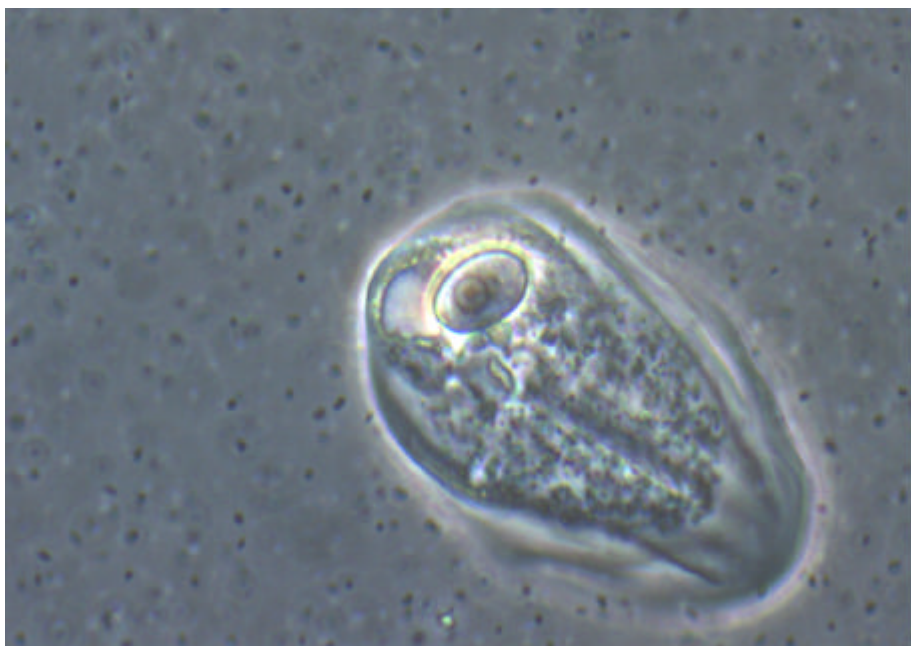
*Saccamoeba* spp. wurde im Oktober im Ringpark-Teich gefunden. Bei dem vorliegenden Isolat handelt es sich um einen Stamm, der Art *S. stagnicola* sehr ähnlich ist. Allerdings bildet er weder Zysten noch enthält er Kristalle. Er zeigt ebenfalls eine Art von sozialem Wachstum. Die Amöben ernährten sich neben den auf den NNA-Platten als Futterorganismen kultivierten Klebsiellen von Agar.

*Thecamoeba quadrilineata* wurde aus einer Sommerprobe aus dem Main isoliert. Diese relativ große Amöbe wanderte erst sehr spät aus dem Filter aus. Sie ernährte sich außer von den Klebsiellen von gleichzeitig aus derselben Probe kultivierten Naeglerien (Abb. E.15).

*Vexillifera* spp. konnte nur ein einziges Mal im Frühjahr aus dem Ringpark-Teich isoliert werden. Der Stamm überlebte jedoch das Überimpfen auf eine neue Agarplatte nicht und konnte daher nicht mehr einer Hybridisierung mit den 18 rRNA-gerichteten Sonden unterzogen werden.



**Abb. E.14:** *In situ* Hybridisierung des Umweltisolats *Hartmannella* sp. (aus dem Main) mit HART498-FLUOS.



---

**Abb. E.15:** *Thecamoeba quadrilineata* (aus dem Main). Die Amöbe ist umgeben von Futterbakterien (*K. aerogenes*), in ihrem Vorderende ist neben der Vakuole eine phagozytierte Zelle von *Naegleria* spp. zu erkennen.

---

## E.4 mRNA-Hybridisierung

Ziel war es, die Expression des *mip*-Gens von *L. pneumophila* mittels FLUOS- bzw. DIG-markierten Transkriptsonden *in situ* nachzuweisen. Die Sequenz der konstruierten Polyribonukleotidsonde (antisense) ist zu einem 282 Basen langen Abschnitt des *mip*-Gens von *L. pneumophila* Philadelphia 1 homolog (b 1108 - 1399, nach Engleberg et al. 1989). Sie kann unter geeigneten Versuchsbedingungen an die *mip*-mRNA binden. Als Negativkontrolle wurde die komplementäre Sondensequenz (sense) verwendet, die homolog zur mRNA ist und daher nicht an sie binden kann.

Zur Amplifikation wurde zunächst das mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* aus dem Plasmid pRK30 ausgeschnittene DNA-Stück in die Vektoren pBluescript KS II und pBluescript SK II ligiert. Dieses Plasmid konnte dann mittels Elektroporation bzw. heat shock in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden. Die unter Selektionsdruck (50 mg Ampicillin/l) erhaltenen Klone wurden mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion auf das Vorhandensein eines Inserts gescreent. Die Überprüfung des Inserts fand durch PCR mit uni- und reverse-Primern und anschließender nicht radioaktiver Sequenzierung mit denselben Primern statt.

Die Ligation in den Vektor pBluescript KS II sowie die anschließende Transformation mittels Hitzeschock bzw. Elektroporation in kompetente *E. coli*-Zellen resultierte in wenigen weißen Klonen, die auch das richtige Insert trugen. Die Ligation in pBluescript SK II ergab zwar auch einige weiße Klone, die jedoch entweder gar kein oder ein unvollständiges Insert aufwiesen.

Daher wurden die Matrizen für die Sonden schließlich mittels PCR amplifiziert. Jeweils einer der Primer trug am 5'-Ende einen T7- bzw. T3-Promotorschwanz. In der folgenden *in vitro* Transkription wurde das Transkript durch die T7-Polymerase mit DIG-11-UTP markiert bzw. durch die T3-Polymerase mit FLUOS-12-UTP markiert. Die Lage der Promotorsequenz am Vorwärts- oder am Rückwärtsprimer entscheidet darüber, ob das Transkript die antisense- oder die sense-Sonde (Negativkontrolle) ergibt.

Die Spezifität der Sonden wurde zunächst in Dot blot-Hybridisierungen mit membrangebundener RNA verschiedener Bakterien getestet. Dabei erwies sich das unter D.13.4 beschriebene Protokoll zur RNA-Isolierung (nach Schmid 1998) sowohl für Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien als sehr effizient. Bei allen verwendeten Mikroorganismen waren im Agarosegel deutliche Banden

---

der 5S, 16S und 23S rRNA erkennbar. Die mRNA war aufgrund ihrer naturgemäß nur sehr geringen Menge nicht auf dem Gel zu erkennen.

#### **E.4.1 Dot blot-Hybridisierung mit DIG-markierten Polyribonukleotidsonden**

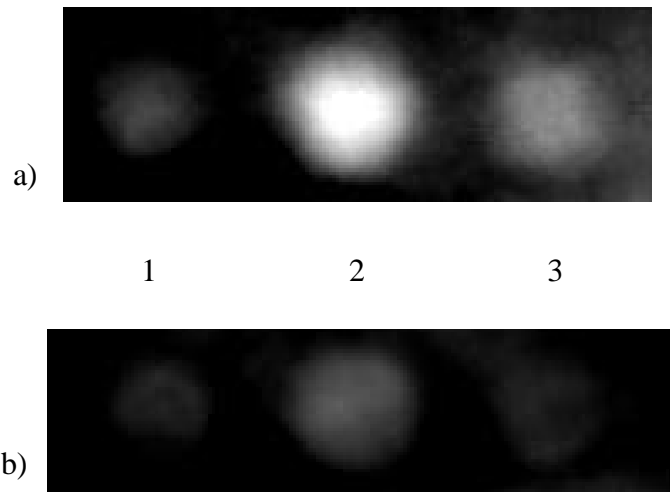
Um die Spezifität der Transkriptsonden zu testen, wurden Hybridisierungen mit membrangebundener RNA aus verschiedenen Bakterien durchgeführt.

Die Gesamt-RNA aus drei *L. pneumophila*-Stämmen, *L. micdadei*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *Listeria monocytogenes* wurde isoliert, auf eine Membran transferiert und mit den DIG-markierten Sonden *mip*-Poly-antisense und *mip*-Poly-sense hybridisiert. Die Hybridisierungssignale wurden nach Inkubation der hybridisierten Membran mit dem chemilumineszierenden Substrat ECL mit Hilfe einer Fotonenkamera detektiert.

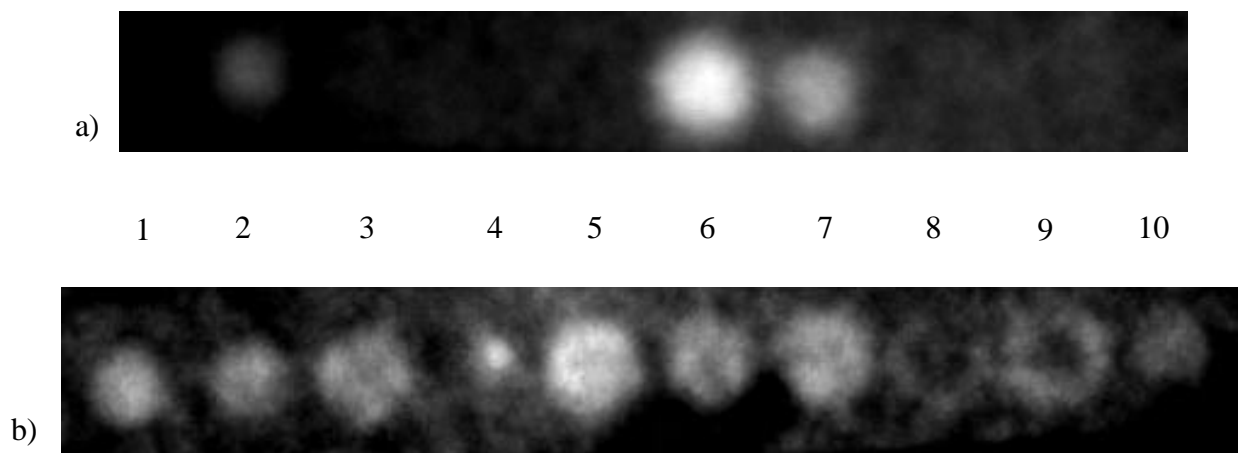
Nach Hybridisierung mit *mip*-Poly-antisense bei 60 % Formamid im Hybridisierungspuffer und einer Hybridisierungstemperatur von 56 °C leuchtete *L. pneumophila* Corby am stärksten, *L. pneumophila* Philadelphia und *Listeria monocytogenes* zeigten jeweils ein schwaches Signal. Mit der Kontrollsonde *mip*-Poly-sense ergaben die drei untersuchten Stämme unter den gleichen Hybridisierungsbedingungen dieselben Signalintensitäten wie mit der antisense-Sonde (Abb. E.16).

Bei einer Erhöhung des Formamidgehalts im Hybridisierungspuffer auf 70 % und gleichbleibender Temperatur von 56 °C zeigten mit der antisense-Sonde *L. pneumophila* U21 und *L. micdadei* starke Signale. Eine Erhöhung auf 80 % Formamid resultierte in einem bei allen untersuchten Stämmen deutlich sichtbaren Positiv- bzw. Falsch-Positiv-Signal (Abb. E.17). Die sense-Sonde wurde bei diesen Hybridisierungsbedingungen nicht getestet.





**Abb. E.16:** Dot blot von RNA aus *L. pneumophila* Corby (1), *L. pneumophila* Philadelphia (2), *Listeria monocytogenes* (3). a) *mip*-Poly-antisense, Hybridisierung mit 60 % Formamid bei 56 °C; b) *mip*-Poly-sense, Hybridisierung mit 60 % Formamid bei 56 °C.



**Abb. E.17:** Dot blot von RNA aus *L. pneumophila* Corby (1), *L. micdadei* (2), *Listeria monocytogenes* (3), *L. pneumophila* Philadelphia (4), *L. pneumophila* Corby (5), *L. pneumophila* U21 (6), *L. micdadei* (7), *E. coli* (8), *Pseudomonas aeruginosa* (9), *Listeria monocytogenes* (10).

a) *mip*-Poly-antisense, Hybridisierung mit 70 % Formamid bei 56 °C; b) *mip*-Poly-antisense, Hybridisierung mit 80 % Formamid bei 56 °C.

#### E.4.2 *In situ* Hybridisierung mit FLUOS- und DIG-markierten Polyribonukleotidsonden

Mit dem Ziel, die Zugänglichkeit verschiedener Legionellen für Transkriptsonden zu untersuchen sowie die Spezifität der Sonden *in situ* zu testen, wurden Hybridisierungen an ganzen Zellen durchgeführt.

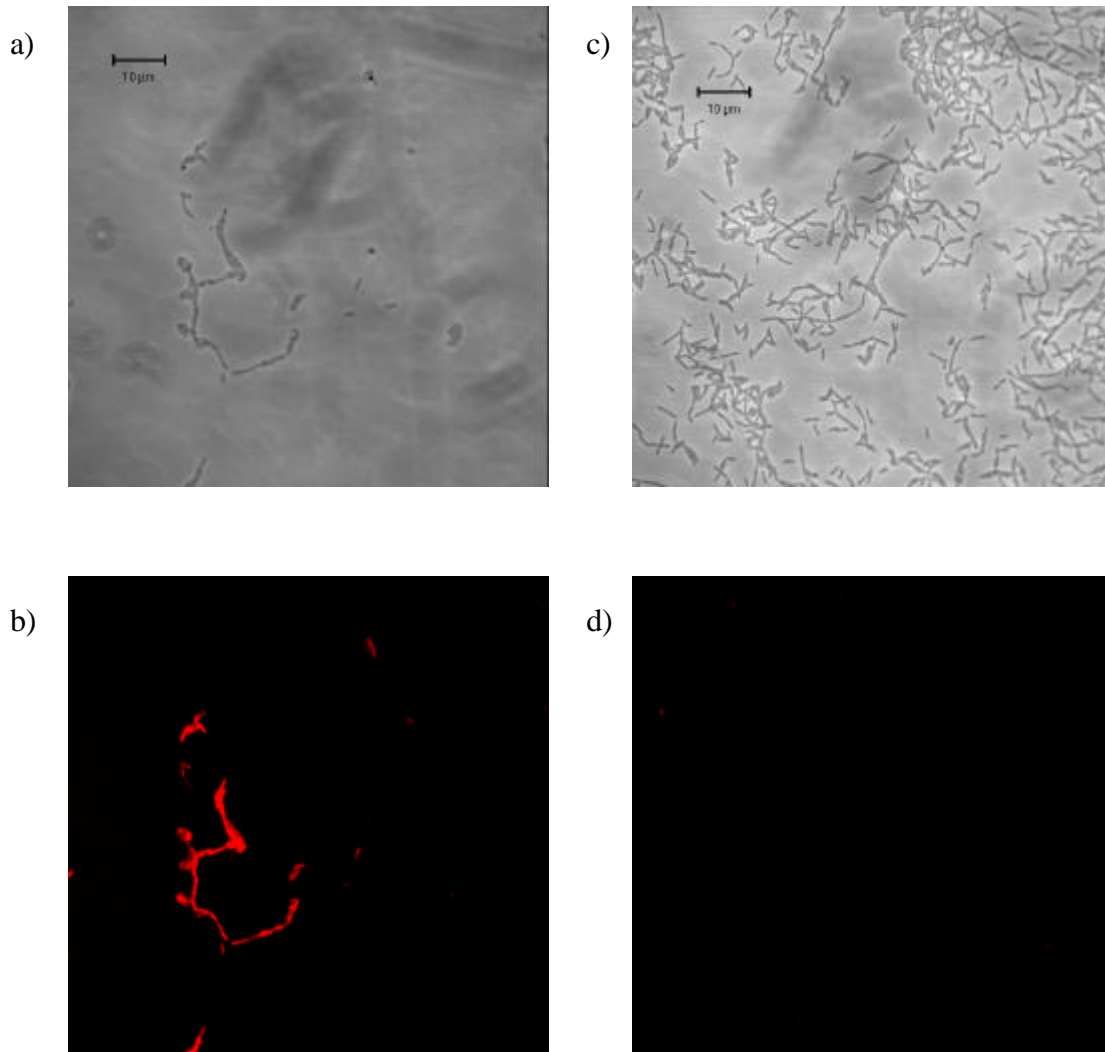
Für die Hybridisierung ganzer Zellen wurden Übernachtskulturen von *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *Bordetella pertussis* und *Listeria monocytogenes* mit 4 % Paraformaldehyd bzw. EtOH (*Listeria monocytogenes*) fixiert und anschließend hybridisiert.

Die Hybridisierungen mit FLUOS-markierten Sonden konnten direkt am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Die DIG-markierten Sonden mussten nach der Hybridisierung zunächst indirekt durch Inkubation mit anti-DIG-POD-F<sub>ab</sub>-Fragmenten mit dem Enzym Peroxidase markiert werden und konnten dann nach Verwendung des Tyramid-Signal-Amplifikationssystems (TSA) ebenfalls im Fluoreszenz- bzw. konfokalen Laserscanning-Mikroskop detektiert werden.

Die Hybridisierungen mit den FLUOS-markierten antisense-Polyribonukleotidsonden ergaben mit 90 % Formamid und 200 ng Sonde im Hybridisierungspuffer bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C nur ein kaum sichtbares Signal. Im Gegensatz dazu leuchteten die Bakterien nach Hybridisierungen mit der DIG-markierten antisense-Sonde unter den gleichen Bedingungen aufgrund der Signalverstärkung durch das TSA-System sehr stark. Demnach war die vorhandene Menge an *mip*-mRNA für eine direkte Sichtbarmachung der Hybridisierung nicht ausreichend. Im weiteren wurden daher alle Versuche nur noch mit DIG-markierten Sonden durchgeführt (Abb. E.18).

Die Sonden wurden nun auf ihre Spezifität getestet. Dazu wurde der Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer schrittweise von 0 % bis 90 % erhöht, die Hybridisierungstemperatur variierte zwischen 50 °C und 60 °C. Ausserdem wurden die Menge an eingesetzter Sonde (50 - 200 ng/well) und die Menge an anti-DIG-POD-F<sub>ab</sub>-Fragmenten (1 - 2 µl/Objektträger) verändert, sowie zusätzliche Enzymbehandlungen (RNasin, DNase, RNase) bzw. Wasch- und/oder Blocking-Schritte ins Protokoll eingefügt. Der RNase-Inhibitor sollte den Abbau der Ziel-mRNA verhindern (1 µl/20 µl Hybridisierungspuffer nach der Prähybridisierung zugeben). Der DNase-Verdau diente dem Abbau der DNA, um eine Bindung beider Sonden an die *mip*-DNA-Stränge auszuschließen (1 µl/20 µl H<sub>2</sub>O, vor der Prähybridisierung 30 min bei 37 °C). Die Zugabe von RNase (nach der Entwässerung) bzw. eine Hybridisierung ohne Zugabe von Sonden wurden als Kontrollversuche durchgeführt. Zusätzliche Waschschrte (nach der Hybridisierung) dienten der Entfernung nicht gebundener Sonden bzw. An-

antikörper. Durch das zusätzliche Blocking (vor der Antikörperzugabe) wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Außer dem TSA-Blocking-Reagenz wurden auch Kompetitoren gegen die Domäne III der 23S rRNA von *E. coli* bzw. gegen die *lis*- und *iap*-Gene von *Listeria monocytogenes* eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. E.5 aufgelistet.



**Abb. E.18:** *In situ* Nachweis der *mip*-mRNA in *L. pneumophila* Philadelphia. Die Detektion der hybridisierten Zellen erfolgte mit dem TSA-System. Die Bilder a und b (Hybridisierung mit *mip*-Poly-antisense) bzw. c und d (Hybridisierung mit *mip*-Poly-sense) zeigen jeweils identische Ausschnitte.

a) Phasenkontrast, b) anti-DIG-POD-F<sub>ab</sub>-Fragmente, TSA-System,

c) Phasenkontrast, d) anti-DIG-POD-F<sub>ab</sub>-Fragmente, TSA-System.





---

Bis zu diesem Zeitpunkt hat keine der vorgenommenen Variationen ein zufriedenstellendes Resultat erbracht. Die antisense-Sonde hybridisierte entweder auch mit den Negativ-Kontrollstämmen oder die sense-Sonde ergab Signale mit den *Legionella*-Zielstämmen.

#### **E.4.3 *In situ* Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotidsonden**

Zur Erhöhung der Spezifität des mRNA-Nachweises wurden vier 20 bis 24 Basen lange DNA-Oligonukleotidsonden simultan eingesetzt, die jeweils am 5'-Ende DIG-markiert waren (Tab. D.3). Die Sequenzen waren identisch zu Abschnitten aus der RNA-Polynukelotidsonde. Die Hybridisierungssignale wurden nach der Hybridisierung mittels Inkubation mit anti-DIG-POD-F<sub>ab</sub>-Fragmenten und dem TSA-System im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Die Verwendung von Oligonukleotiden zum *in situ* Nachweis der *mip*-mRNA brachte leider auch nicht den erwünschten Erfolg. Es wurden, wie mit den Transkriptsonden, Testreihen mit Variationen bezüglich verschiedener Parameter durchgeführt (siehe E.4.2).

Es wurden außerdem Hybridisierungen mit jeder Sonde einzeln durchgeführt, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Oligonukleotiden zu erkennen und auszuschließen. Diese Einzelhybridisierungen resultierten jedoch in einem zu schwachen und damit nicht auswertbaren Signal.

Insgesamt zeigte keine der Hybridisierungen ein korrektes Resultat (Tab. E.6). Wie bei den Versuchen mit den Polyribonukleotidsonden zeigten entweder die nicht-*Legionella*-Stämme Falsch-Positiv-Signale mit der antisense-Sonde oder es gab Fehlpaarungen verschiedener Bakterienstämme mit der sense-Negativkontrollsonde.



