
Inhaltsverzeichnis

A. Zusammenfassung	1
B. Summary	4
C. Einleitung	6
C.1 Biologie von <i>Legionella</i> spp.	6
C.1.1 Allgemeine Merkmale	6
C.1.2 Verbreitung in der Umwelt.....	8
C.1.3 Intrazelluläre Vermehrung in Protozoen.....	9
C.1.4 Pathogenese der Legionellose.....	12
C.1.5 Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i>	15
C.1.6 Nachweismöglichkeiten für <i>Legionella</i> spp.	19
C.2 Biologie freilebender Süßwasser-Amöben	20
C.3 Zielsetzung der Arbeit	22
D. Material und Methoden	23
D.1 Bakterien	23
D.2 Amöben	24
D.3 Vektoren, Plasmide	25
D.4 Geräte	25
D.5 Chemikalien	26
D.6 Oligonukleotide, Farbstoffe	27
D.7 Puffer und Lösungen	30
D.8 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung	30
D.8.1 <i>Legionella</i>	32
D.8.2 Non- <i>Legionella</i> -Bakterien.....	32
D.8.3 Amöben.....	33
D.9 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	35
D.10 Infektionsassays	35
D.11 Zellfixierung	36
D.11.1 Fixierung von Bakterien (nach Amann et al. 1990)	36

D.11.1.1	Fixierung für die mRNA-Hybridisierung.....	37
D.11.1.2	Fixierung für die rRNA-Hybridisierung.....	37
D.11.2	Fixierung von Amöben für die rRNA-Hybridisierung.....	37
D.12	<i>In situ</i> rRNA-Hybridisierung.....	38
D.13	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	40
D.13.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräp.).....	40
D.13.2	Isolierung und Fällung von DNA aus Bakterien (High Pure PCR Template Preparation Kit von Boehringer Mannheim).....	41
D.13.3	Isolierung von DNA aus Umweltproben (nach Pabst et al. 1997).....	42
D.13.4	Isolierung von RNA aus Bakterien (nach Schmid 1998).....	42
D.14	PCR.....	44
D.15	Qualitative Analyse von Nukleinsäuren.....	45
D.16	Quantitative Analyse von Nukleinsäuren.....	46
D.17	Sequenzierung.....	47
D.18	Klonierung.....	48
D.18.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	48
D.18.2	Eluierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	49
D.18.3	Ligation.....	49
D.18.4	Herstellung Glycerin-kompetenter Zellen für die Elektroporation.....	50
D.18.5	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen für den heat shock.....	51
D.18.6	Transformation mittels Elektroporation.....	51
D.18.7	Transformation mittels heat shock.....	52
D.18.8	Identifizierung rekombinanter Klone.....	53
D.19	mRNA-Hybridisierung.....	53
D.19.1	<i>In vitro</i> Transkription.....	53
D.19.2	Nukleinsäuretransfer mittels Dot blot (nach Schmid 1998).....	55
D.19.3	Dot blot-Hybridisierung.....	56
D.19.4	<i>In situ</i> Hybridisierung ganzer Zellen auf dem Objektträger.....	58
D.20	Habitatbeschreibungen.....	60
D.21	Isolierung von Legionellen aus Umweltproben (nach Morris et al. 1997) und Passage von Umweltproben durch Amöben.....	60
D.22	Charakterisierung von <i>Legionella</i>-Isolaten.....	62
D.23	Isolierung von Amöben aus Umweltproben.....	62
D.24	Bestimmung von Amöben.....	63

E. Ergebnisse	64
E.1 <i>In situ</i> rRNA-Hybridisierung von Bakterien.....	64
E.1.1 Evaluierung einer neuen <i>L. pneumophila</i> -spezifischen Oligonukleotidsonde	64
E.2 <i>In situ</i> rRNA-Hybridisierung von Amöben.....	67
E.2.1 Zellfixierung.....	67
E.2.2 Entwicklung von neuen gattungsspezifischen Oligonukleotidsonden.....	68
E.2.3 Kombination von 16S rRNA- und 18S rRNA-gerichteten Gensonden.....	70
E.3 Umweltuntersuchungen.....	71
E.3.1 Gewässercharakterisierung	71
E.3.2 Nachweis von <i>Legionella</i> spp.....	78
E.3.3 Bestimmung von <i>Legionella</i> spp. in Umweltproben.....	79
E. 3.4 Verbreitung von <i>Legionella</i> spp.	79
E.3.5 Isolierung von <i>Legionella</i> spp.....	83
E.3.6 Isolierung und Bestimmung von Amöben.....	83
E.4 mRNA-Hybridisierung	90
E.4.1 Dot blot-Hybridisierung mit DIG-markierten Polyribonukleotidsonden.....	91
E.4.2 <i>In situ</i> Hybridisierung mit FLUOS- und DIG-markierten Polyribonukleotidsonden....	93
E.4.3 <i>In situ</i> Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotidsonden.....	97
F. Diskussion.....	100
F.1 rRNA-Hybridisierung.....	100
F.1.1 <i>Legionella</i>	102
F.1.2 Amöben.....	103
F.2 Umweltuntersuchungen.....	106
F.2.1 <i>Legionella</i>	106
F.2.2 Amöben.....	109
F.3 mRNA-Hybridisierung	113
G. Literatur	118
H. Anhang.....	135
H.1 Abkürzungen.....	135
H.2 Sequenz-Alignment der <i>L. pneumophila</i>-spezifischen Sonde LEGPNE1	137

H.3 Lage der untersuchten Gewässer im Würzburger Ringpark.....	138
H.4 Publikationen.....	139
H.5 Beiträge zu Tagungen.....	139
H.6 Lebenslauf	141