

D. Material und Methoden

D.1 Bakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien, ihre Kulturbedingungen sowie ihre jeweilige Herkunft und Referenz sind in Tab. D.1 aufgeführt.

Tab. D.1: Verwendete Bakterien.

Organismus	T _{Opt.} [°C], 5% CO ₂ (+), Normal- Atmosphäre (-)	Medium	Herkunft	Referenz
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	37, -	BHI		M. Schmid, TUM
<i>Burkholderia cepacia</i> LC 21-3b	37, -	LB	Isolat aus der Kartoffelknolle	G. Berg, Univ. Rostock
<i>Burkholderia cepacia</i> L 16-3-11	37, -	LB	Isolat aus der Rhizosphäre der Kartoffelknolle	G. Berg, Univ. Rostock
<i>Escherichia coli</i> K-12 DH5 α	37, -	LB		Hanahan 1983
<i>E. coli</i> K-12 HB101	37, -	LB		Boyer und Roulland-Dussoix 1969
<i>Klebsiella aerogenes</i>	37, -	LB		M. Schleicher, LMU München
<i>Legionella anisa</i>	37, +	BCYE, YEB		Fields et al. 1990
<i>L. bozemanii</i>	37, +	BCYE, YEB	Isolat aus Menschenlunge	ATCC 33217
<i>L. erythra</i>	37, +	BCYE, YEB		P. Fettes, Univ. Ulm
<i>L. hackeliae</i> , Serogruppe 1	37, +	BCYE, YEB	Typstamm	ATCC 33250
<i>L. longbeachae</i> , Sg. 1	37, +	BCYE, YEB	Typstamm	ATCC 33462
<i>L. lytica</i>	30, +	BCYE	Typstamm	Birtles et al. 1996, Springer et al. 1992
<i>L. micdadei</i>	37, +	BCYE, YEB	Isolat aus Menschenblut	ATCC 33218
<i>L. oakridgensis</i>	37, +	BCYE		P. Fettes, Univ. Ulm
<i>L. pneumophila</i> Bloomington, Sg. 3	37, +	BCYE, YEB	Typstamm	ATCC 33155
<i>L. pneumophila</i> Corby	37, +	BCYE, YEB	Patientenisolat	Jepras et al. 1985
<i>L. pneumophila</i> Los Angeles, Sg. 4	37, +	BCYE, YEB	Typstamm	ATCC 33156

Organismus	T _{Opt.} [°C], 5% CO ₂ (+), Normal- Atmosphäre (-)	Medium	Herkunft	Referenz
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia, Sg. 1	37, +	BCYE, YEB	Isolat aus Menschenlunge, passagiert über Meerschweinchen	ATCC 33152
<i>L. pneumophila</i> U21, Sg. 6	37, +	BCYE, YEB	Umweltisolat	Bender et al. 1991
<i>L. pneumophila</i> 667, Sg. 4	37, +	BCYE, YEB	Patientenisolat	Bender et al. 1991
LLAP 10	30, +	BCYE		CDC, Atlanta/USA
<i>Listeria monocytogenes</i> R III	37, -	BHI		M. Schmid, TUM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SS712	37, -	LB		Bender et al. 1991

D.2 Amöben

Die verwendeten Amöben, ihre Kulturbedingungen und die dazugehörige Herkunft und Referenz sind in Tab. D.2 aufgelistet.

Tab. D.2: Verwendete Amöben.

Organismus	T _{Opt.} [°C]	Medium	Herkunft	Referenz
<i>Acanthamoeba castellanii</i> C3	RT	PYG	Trinkwasserreservoir	R. Michel, SdB Koblenz
<i>A. polyphaga</i>	RT	PYG		ATCC 30461
<i>A. sp.</i> UWC9	RT	PYG	Patientenisolat, Kontaktlinse	Fritsche et al. 1993
<i>Hartmannella vermiformis</i>	35	PYNFH		Fields et al. 1990
<i>Naegleria lovaniensis</i>	35	SCGYEM		R. Michel, SdB Koblenz
<i>Vahlkampfia ovis</i>	23	NNA + <i>K.a.</i>	Rhodos, Wasserlache	R. Michel, SdB Koblenz
<i>Vannella sp.</i> #5	23	NNA + <i>K.a.</i>	Trinkwasserleitung	R. Michel, SdB Koblenz

Referenzen: ATCC American Type Culture Collection, Rockville/USA

CDC Center for Disease Control and Prevention, Atlanta/USA

LMU Lehrstuhl für Zellbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

SdB Medizinische Mikrobiologie, Sanitätsdienst der Bundeswehr, Koblenz

TUM Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München

D.3 Vektoren, Plasmide

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tab. D.3 beschrieben.

Tab. D.3: Für die Klonierung verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Plasmid-kodierte Eigenschaften	Herkunft
pBluescript II KS	Amp ^R , <i>lacZ</i> -Gen, T3-, T7-Promotor	Stratagene, Heidelberg
pBluescript II SK	Amp ^R , <i>lacZ</i> -Gen, T3-, T7-Promotor	Stratagene, Heidelberg

Das für die Amplifikation von *mip* verwendete Plasmid pRK30 enthält das komplette *mip*-Gen (ohne Promotor) aus *L. pneumophila* Philadelphia JR32 in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Mannheim) integriert, es trägt außerdem das Gen für Ampicillin-Resistenz und das *lacZ*-Gen (Köhler, unveröff.).

D.4 Geräte

Folgende Geräte wurden während der Durchführung der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

Analysenwaage	Chyo JL 180
Autoklav	Fedegari FOM/B50; Fedegari Teknomara 9191E
Brutschrank	Heraeus B5050E; Mammert Tv40b
Cleanbench	Nunc Microflow 50726
DNA-Sequenzierer	MWG-Biotech Li-Cor DNA Sequencer Modell 4000; ABI PRISM TM
Dot-Blot-Apparatur	Minifold [®] -Apparatur, Schleicher & Schüll
Eismaschine	Scotman AF-20
Elektroporator	Gene Pulser Transfection, BioRad
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiolab mit 50 W-Hockdruck-Quecksilberlampe, Zeiss Filtersets 00 und 10, Kameras: Intas Lowlight CCD; Nikon F301
Fotometer	Unicam 8625, Pharmacia
Fotonenkamera	Hammamatsu C2400-47, Hammamatsu Photonics
Gel-Elektrophorese-Apparatur	BioRad; Pharmacia GNA-100
Geldokumentation	Gel Doc 2000, BioRad

Grobwaage	Chyo MP 3000
Hybridisierungssofen	Bachofer
Konfokales Laserscanning-Mikroskop	Zeiss LSM-510 mit Helium-Neon- und Argon-Lasern, Kamera: Zeiss MC-100
Magnetrührer	Sorvall RT 600
Mikrowelle	Moulinex
Netzgeräte	Consort E 452
PCR-Gerät	Eppendorf Mastercycler Personal
pH-Meter	WTW pH 523
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss DSM 962, Kamera: Contax
Schüttler	Innova TM 4300
Spektralfotometer	Beckmann Fotometer DU 650#
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 C
Tragbare Messgeräte für pH, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit	GPH014, Greisinger Electronic; LF54, WTW Weilheim; GTH175/MO, Greisinger Electronic; MultiLine 4, WTW Weilheim
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H Uniequipe
Vortexer	GLW
Wasserbad	GFL 1083, Köttermann
Wasserentsalzungsanlage	Milli-Q-Plus, Millipore
Zentrifuge	Beckman J 2-21

D.5 Chemikalien

Die während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Größenmarker, Enzyme und Filme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Chemikalien	AppliChem, Darmstadt; Becton-Dickinson, Augsburg; Bayer, Leverkusen; Boehringer Ingelheim, Heidelberg; Boehringer Mannheim, Mannheim; Difco, Augsburg; Fluka, Deisenhofen; Gerbu, Gaiberg; Gibco-BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Oxoid, Wessel; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.
DNA-Größenmarker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Enzyme	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig; Boehringer Mannheim; Epicentre Technologies; Gibco-BRL; Merck; Promega, Mannheim
Filme	Agfa, Fuji, Konica

D.6 Oligonukleotide, Farbstoffe

Neue rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden wurden von Dr. W. Ludwig, TU München, mittels vergleichender Sequenzanalyse der in der Datenbank der TU München enthaltenen rDNA-Sequenzen durch das Programmpaket ARB (Strunk und Ludwig 1996) entwickelt. Die markierten Sonden wurden von den Firmen Interactiva (Neu-Ulm) und MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und markiert (Tab. D.4). Für die rRNA-Hybridisierung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FLUOS (5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccimidester) bzw. cy3 (5,5'-Disulfo-1,1'-di(χ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarbo-cyanin-N-hydroxy-succimidester) verwendet (Tab. D.5). Die Oligonukleotide für die mRNA-Hybridisierung waren mit Digoxigenin (DIG) markiert (Tab. D.6).

Tab. D.4: Oligonukleotidsonden für die rRNA-Hybridisierung.

Bezeichnung	Sequenz	Target	Referenz
BET42a	5'- GCCTTCCCACCTTCGTTT -3'	23S: bp1027-1043*; β -Proteobakterien	Manz et al. 1992
EC1531	5'- CACCGTAGTGCCTCGTCATCA -3'	23S: bp 1521-1541*; <i>E. coli</i>	Poulsen et al. 1994
EUB338 1990	5'- GCTGCCTCCCGTAGGAGT -3'	16S: bp 338-355*; <i>Bacteria</i>	Amann et al.
EUK516	5'- ACCAGACTTGCCCTCC -3'	18S: bp 501-516*; <i>Eukaryota</i>	Amann et al. 1990
GAM42a	5'- GCCTTCCCACATCGTTT -3'	23S: bp 1027-1043*; γ -Proteobakterien	Manz et al. 1992
GSP	5'- TTCACGGTAAACGATCTGGGCC -3'	18S: bp 936-957; <i>Acanthamoeba</i> spp.	Stothard et al. 1999
HART498	5'- TCGCGGAGAGGTGTCGGT -3'	18S: bp 498-515**; <i>Hartmannella</i> spp.	diese Arbeit
LEG705	5'- CTGGTGTTTCCTCCGATC -3'	16S: bp 705-722*; <i>Legionellaceae</i>	Manz et al. 1995
LEGPNE1	5'- ATCTGACCGTCCCAGGTT -3'	16S: bp 621-638*; <i>L. pneumophila</i>	Grimm et al. 1998
NAEG1088	5'- GTGGCCCACGACAGCTTT -3'	18S: bp 1088-1105***; <i>Naegleria</i> spp.	diese Arbeit

- * Position bei *E. coli*
 ** Position bei *H. vermiformis*
 *** Position bei *N. lovaniensis*

Tab. D.5: Für die rRNA-Hybridisierung verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluoreszenz-Farbstoff	Absorbptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Molarer Extinktions-Koeffizient e [$1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}$]
FLUOS	494	518	$7,5 \times 10^4$
cy3	554	570	$1,3 \times 10^5$

Tab. D.6: Oligonukleotidsonden für die mRNA-Hybridisierung.

Bezeichnung *	Sequenz
133a	5'- TTC TTC CCC AAA TCG GCA CCA ATG -3'
201a	5'- ACT CAT AGC GTC TTG CAT GCC -3'
276a	5'- TTA TTT TCA TCC GCT TTC TTA TTG -3'
319a	5'- TGG CTT GTT TTT GTT TTC AGT TAA -3'
110s	5'- CAT TGG TGC CGA TTT GGG GAA GAA -3'
181s	5'- GGC ATG CAA GAC GCT ATG AGT -3'
253s	5'- CAA TAA GAA AGC GGA TGA AAA TAA -3'
296s	5'- TTA ACT GAA AAC AAA AAC AAG CCA -3'

- * a steht für die antisense-Sonden, s steht für die sense-Sonden

Primer für die PCR wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Roth (Karlsruhe) synthetisiert (Tab. D.7). Die zum Sequenzieren mit dem Li-Cor Sequenzierer verwendeten Primer waren mit IRD-800 markiert.

Tab. D.7: Für die PCR verwendete Primer.

Zur Amplifizierung von bakterieller 16S rDNA:

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
616V	5'- AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3'	Springer 1992
630R	5'- CAK AAA GGA GGT GAT CC -3'	Springer 1992
63f	5'- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC -3'	Marchesi et al. 1998
1387r	5'- GGG CGG (AT)GT GTA CAA GGC -3'	Marchesi et al. 1998

Zur Amplifizierung von *Legionella*-spezifischer 16S rDNA:

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
leg225	5'- AGA TTA GCC TGC GTC CGA T -3'	Miyamoto et al. 1997
leg858	5'- GTC AAC TTA TCG CGT TTG CT -3'	Miyamoto et al. 1997

Zur Amplifizierung eines *L. pneumophila*-spezifischen *mip*-Genabschnitts (in der vorliegenden Arbeit erstmals verwendet):

Bezeichnung	Sequenz
vorw-mip	5'- GGCTAAGCGTACTGCTGAATT -3'
t3-vorw-mip	5'- ATTAACCCTCACTAAAGGGACGGCTAAGCGTACTGCTGAATT -3'
t7-vorw-mip	5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCTAAGCGTACTGCTGAATT -3'
rueck-mip	5'- TCTGTCCATCCAGGGATAAC -3'
t3-rueck-mip	5'- ATTAACCCTCACTAAAGGGACTCTGTCCATCCAGGGATAAC -3'
t7-rueck-mip	5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGTCTGTCCATCCAGGGATAAC -3'

Zur Amplifizierung bzw. Sequenzierung eines Inserts aus einem Plasmid:

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
uni	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'	Sambrook et al. 1989
reverse	5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT G -3'	Sambrook et al. 1989

D.7 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Lösungen wird über eine Reinstwasseranlage entsalztes und filtriertes Wasser (im folgenden $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) verwendet. Die Lösungen werden, sofern nicht anders angegeben, in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven für 20 min bei 121 °C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen (manche Medienzutaten) werden nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugegeben (Sterilfilter 0,2 µm Porengröße, Millipore, Eschborn).

Die Lösungen zur Isolierung und weiteren Bearbeitung von RNA werden einer speziellen Behandlung unterzogen. Um die RNasen zu inaktivieren werden alle Lösungen, die kein Tris enthalten, vor dem Autoklavieren mit 0,1% DEPC versetzt und über Nacht (ÜN) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Tris-haltigen Lösungen werden mit bereits autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, DEPC angesetzt und autoklaviert. Alle Plastikteile wie Pipettenspitzen und Eppendorf-Reagenzgefäße (ERG) werden zweimal autoklaviert. Weiterhin werden beim Arbeiten mit RNA stets Handschuhe getragen, die einzelnen Arbeitsschritte erfolgen auf Eis.

D.8 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung

Alle Bakterien und Amöben werden mit den in den Katalogen der jeweiligen Stammsammlungen aufgeführten Medien kultiviert (ATCC 1985).

Die Bakterien werden aerob bei der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml Flüssigmedium ÜN mit Belüftung in einem Schüttler oder auf festigten Nährmedien in Petrischalen angezogen. Die Legionellen-Anzucht auf Agarplatten erfolgt in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre für drei bis fünf Tage.

Von allen Bakterienstämmen werden zur längerfristigen Stammerhaltung Glycerinkulturen (Glycerin : Zellsuspension = 1 : 1) angelegt, die bei -80 °C gelagert werden.

Die axenische Anzucht der Amöben erfolgte in 75 cm³- bzw. 25 cm³-Zellkulturflaschen mit jeweils 20 ml bzw. 10 ml Flüssigmedium. Alle 14 Tage (*Acanthamoeba* und *Naegleria*) bzw. alle drei bis vier Tage (*Hartmannella*) werden nach lichtmikroskopischer Kontrolle 250 µl Kultur in frisches Medium überimpft.

Die Stammhaltung erfolgt für *Acanthamoeben* in Glycerinkulturen (Glycerin : Zellsuspension in PYG = 1 : 1). Die *Hartmannellen* werden in 5 ml PYNFH + 5 ml hitzeinaktiviertem FCS aufgenommen, zu dieser Suspension wird tropfenweise eine Mischung aus 8 ml PYNFH + 2 ml DMSO zugegeben. Die Stammkulturen müssen sofort auf Eis gestellt und dann bei -20 °C für zwei Stunden und bei -80 °C ÜN tiefgefroren werden, um anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden. Das Auftauen der Kulturen erfolgt möglichst rasch, um eine negative Wirkung des Zellgiftes DMSO auf die Zellen zu minimieren. Die aufgetauten Kulturen werden zentrifugiert, einmal mit Medium gewaschen (um das DMSO zu eliminieren) und schließlich in Medium aufgenommen und kultiviert.

Die Amöben, die sich nicht axenisieren ließen (Umweltisolate), sowie *Vahlkampfia ovis* und *Vannella* sp. werden auf Non-Nutrient-Agar-Platten (NNA) mit *Klebsiella aerogenes* als Futterbakterium bei 23 °C gehalten. Die Stämme müssen ca. alle 14 Tage auf neue Platten überimpft werden. Dazu wird nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Kultur ein Agarblöckchen mit möglichst vielen Trophozoiten unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten und (mit den Amöben nach unten) auf eine neue NNA-Platte mit Bakterienrasen gelegt. Eine Stammhaltung ist hier nicht möglich.

D.8.1 *Legionella*

- **10 N KOH:**

KOH-Plätzchen 561 g/1000 ml H₂O _{bidest.}
autoklavieren

- **BCYE-Agar (buffered charcoal yeast extract):**

ACES 5 g
Hefeextrakt 10 g
H₂O _{bidest.} ad 900 ml
mit 10 N KOH pH 6,9 einstellen
Aktivkohle 2 g
Agar 15 g
H₂O _{bidest.} ad 980 ml
autoklavieren
L-Cystein 0,4 g/10 ml H₂O _{bidest.}, sterilfiltriert
Fe^{III}(NO₃)₃ x 9 H₂O 0,25 g/10 ml H₂O _{bidest.}, sterilfiltriert
zum abgekühlten Medium zugeben, Platten gießen

- **YEB-Flüssigmedium (buffered yeast extract):**

ACES 10 g
Hefeextrakt 10 g
H₂O _{bidest.} ad 900 ml
mit 10 N KOH pH 6,9 einstellen
L-Cystein 0,4 g/10 ml H₂O _{bidest.}, sterilfiltriert
Fe^{III}(NO₃)₃ x 9 H₂O 0,25 g/10 ml H₂O _{bidest.}, sterilfiltriert
H₂O _{bidest.} ad 1000 ml
sterilfiltrieren

D.8.2 Non-*Legionella*-Bakterien

- **BHI-Medium (Brain Heart Infusion):**

BHI (Difco) 37 g
H₂O _{bidest.} ad 1000 ml
autoklavieren

- **LB-Medium (Luria-Bertani):**

Pepton aus Casein 10 g

Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
evtl. Agar	15 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
autoklavieren	

D.8.3 Amöben

- **Amöbenpuffer (für *Acanthamoeba*):**

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	9,86 g/100 ml H ₂ O bidest.
autoklavieren	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,45 g/100 ml H ₂ O bidest.
autoklavieren	

KH ₂ PO ₄	3,4 g/100 ml H ₂ O bidest.
autoklavieren	

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,735 g/100 ml H ₂ O bidest.
autoklavieren	

(NH ₄) ₂ Fe ^{II} (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,196 g/100 ml H ₂ O bidest.
sterilfiltrieren	

von jeder Stammlösung je 10 ml bzw. von CaCl₂-Lösung nur 8 ml

Natrium(tri)citrat x 2 H ₂ O	1 g
H ₂ O bidest.	ad 1000ml
autoklavieren	

- **PYG-Medium 712 (für *Acanthamoeba*) (ATCC 1985):**

Proteose Pepton (Oxoid)	20 g
Hefeextrakt	1 g
Amöbenpuffer	ad 950 ml
autoklavieren	
Glucose	18 g/50 ml H ₂ O bidest.
sterilfiltrieren und zum abgekühlten Medium zugeben	

- **Puck's Saline F (für *Hartmannella*):**

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,016 g
KCl	0,285 g
KH ₂ PO ₄	0,083 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,154 g
H ₂ O bidest.	ad 990 ml
autoklavieren	
Glucose	1,1 g/10 ml H ₂ O bidest.
sterilfiltrieren und zur abgekühlten Lösung zugeben	

- **Pufferlösung für PYNFH-Medium (für *Hartmannella*) (ATCC 1985):**

KH_2PO_4	7,24 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 400 ml
autoklavieren	

- **PYNFH-Medium 1034 (für *Hartmannella*) (ATCC 1985):**

Bacto peptone (Difco)	10 g
Hefeextrakt	10 g
Ribonucleic acid (Sigma)	1 g
Folsäure	15 mg
Hemin	1 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 880 ml
autoklavieren	
Pufferlösung	20 ml
FCS, hitze-inaktiviert	100 ml
pH 6,5 einstellen	
sterilfiltrieren	

- **SCGYEM (Chang-Medium, für *Naegleria*) (Page und Siemensma 1991):**

Casein nach Hammarsten (Merck)	10 g
Na_2HPO_4	1,325 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 800 ml
1 h rühren	
autoklavieren (15 min bei 110 °C !)	

Glucose	2,5 g
KH_2PO_4	0,8 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad 50 ml
autoklavieren (15 min bei 110 °C !)	

Hefeextrakt	5 g/50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
sterilfiltrieren	
FCS	100 ml
sterilfiltrieren	

- **Non-Nutrient-Agar (NNA) (Page und Siemensma 1991):**

Agar	15 g/1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
autoklavieren	

- **Salzlösung nach Prescott & James (PJ-Saline) (Page und Siemensma 1991):**

$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,433 g
KCl	0,162 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 100 ml
KH_2PO_4	0,512 g/100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,280 g/100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

je 1 ml jeder autoklavierten Grundlösung
H₂O bidest. ad 1000 ml

D.9 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte der Bakterienkulturen wird in Kunststoffküvetten mit 1 : 100-Verdünnungen im Spektralfotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gemessen. Dabei gilt für die Legionellen der Richtwert: OD₆₀₀ = 0,1 entspricht 10⁸ Bakterien/ml. Der jeweilige Blindwert wird durch eine Messung mit dem für die Verdünnung verwendeten sterilen Medium bzw. in H₂O_{bidest.} ermittelt.

D.10 Infektionsassays

Lösungen:

- Amöbepuffer (für *Acanthamoeba*, D.8.3)
- Assay-Medium (für *Hartmannella*, D.8.3):
Puck's Saline F : PYNFH (ohne FCS!) = 1 : 1

Durchführung:

Für Infektionen werden axenisch gehaltene *Acanthamoeben* und *Hartmannellen* verwendet. Die Amöbenkulturen werden in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt und auf eine definierte Zellzahl (2×10^7 *Acanthamoeben*/ml bzw. $1,3 \times 10^6$ *Hartmannellen*/ml) eingestellt. Dazu werden die Amöben abzentrifugiert (*Acanthamoeba* 10 min bei 400 rpm zentrifugieren, *Hartmannella* 15 min bei 900 rpm) und das Amöbepellet in der entsprechenden Menge Amöbepuffer bzw. Assaymedium aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wird 1 h bis ÜN in je einem well einer 24-well-Platte (Falcon) bei 37 °C inkubiert, um die Amöben adhären zu lassen und "auszuhungern". Die Legionellen werden mit einer MOI von 10 (in Amöbepuffer bzw. Assaymedium) zugegeben, 3 min bei 1200 rpm aufzentrifugiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgt eine Behandlung mit 80 µg Gentamicin/ml für 1 h bei 37 °C, um nicht pha-

gozytierte Bakterien abzutöten. Die Amöben werden dann nach einmaligem Waschen mit Antibiotika-freiem Amöbenpuffer bzw. Assaymedium versetzt (Null-Stunde). Zum Zeitpunkt Null sowie alle weiteren 24 h werden Aliquots aus der Amöben-Suspension entnommen und zur Bestimmung der Keimzahl in Verdünnungsreihen ausplattiert bzw. hybridisiert. Anhand der Veränderung der Keimzahl von $t = 0$ bis $t = 96$ kann die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien abgelesen werden.

D.11 Zellfixierung

D.11.1 Fixierung von Bakterien (nach Amann et al. 1990)

Lösungen:

- EtOH 50 %, 80 %, 96 %

- HCl_{conc.}

- **1 M NaOH:**

NaOH-Plättchen 4 g /100 ml H₂O_{bidest.}
autoklavieren

- **10 x PBS:**

NaCl 8 g
Na₂HPO₄ x 2 H₂O 1,25 g
KCl 0,2 g
KH₂PO₄ 0,2 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml
autoklavieren

Die Gebrauchslösungen (3 x PBS, 1 x PBS) werden durch Verdünnung der Stammlösung mit H₂O_{bidest., steril} hergestellt.

Durchführung:

Unter dem Abzug werden 99 ml H₂O_{bidest.} auf dem Magnetrührer auf 60 – 65 °C erhitzt. Anschließend werden 6 – 9 g Paraformaldehyd (PFA) zugegeben und unter Rühren gelöst (Rührfisch). Die Lösung wird tropfenweise mit 1 M NaOH bis zur Klärung versetzt. Danach werden

49,8 ml 3 x PBS zugegeben und die Lösung auf 20 °C abgekühlt. Mit HCl_{conc.} wird der pH 7,2 – 7,4 eingestellt. Die Lösung wird sterilfiltriert (0,2 µm-Filter) und in geeigneten Aliquots bei – 20 °C eingefroren.

D.11.1.1 Fixierung für die mRNA-Hybridisierung

Ein Teil Übernachtskultur (10 ml) wird mit drei Teilen 4 %iger PFA-Lösung (30 ml) in 50 ml-Greiner-Röhrchen gemischt und 3 h bei 4 °C fixiert. Nach 10 min zentrifugieren (5000 rpm, Kühlraum) wird das Pellet in 10 ml 1 x PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min, 5000 rpm, Kühlraum) wird das Pellet in 1 x PBS : EtOH_{abs} 1: 1 aufgenommen (ca. 5 ml Gesamtvolumen) und in ERGs bei –20 °C eingefroren.

D.11.1.2 Fixierung für die rRNA-Hybridisierung

Die Probe wird auf Sechs-Felder-Objektträger (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim) aufgetropft (10 – 30 µl Zellsuspension) und luftgetrocknet (Thermostat bei 37 °C). 20 µl 4 % PFA-Lösung werden aufgetropft und in feuchter Kammer (Petrischale mit in H₂O getränktem Zellstoff) 1 h bei RT fixiert. Das Fixans wird abgezogen und der Objektträger (OT) mit 1 x PBS gewaschen. Die Entwässerung erfolgt über eine EtOH-Reihe für je 3 min mit 50 %, 80 %, 96 % EtOH (je 20 µl auftropfen und nach 3 min wieder abziehen, oder für je 3 min in Greiner-Röhrchen stellen). Der luftgetrocknete OT kann bei 4 °C ÜN aufbewahrt werden.

D.11.2 Fixierung von Amöben für die rRNA-Hybridisierung

Lösungen:

- PJ-Saline (D.8.3)
- 0,05 % Agarose in PJ-Saline
- 1 x PBS (D.11.1)
- **2 % PFA in 1 x PBS:**
4 % PFA-Lösung 1 : 1 mit 1 x PBS verdünnen

- EtOH 80 %

Durchführung:

Amöbentrophozoiten werden von der Agarplatte mit 1 ml PJ-Saline vorsichtig abgeschwemmt, in 1,5 ml-ERG überführt und abzentrifugiert (6 min, 900 rpm).

Amöben aus Flüssigkultur werden in 2 ml-ERG abzentrifugiert (6 min, 900 rpm) und das Pellet mit 1 ml PJ-Saline gewaschen.

Das Zellpellet wird in handwarm abgekühlter 0,05 % Agarose in PJ-Saline vorsichtig resuspendiert. Von dieser Suspension werden 20 µl je Aussparung auf Sechs-Felder-Objektträger aufgetropft und nach Aushärtung der Agarose (4 °C) luftgetrocknet (Thermostat bei 37 °C). Zur Fixierung werden 20 µl 2 % PFA-Lösung aufgetropft (1 h bei RT in feuchter Kammer). Das Fixans wird abgezogen. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS wird mit 80 % EtOH für 10 sec entwässert. Der OT wird bei RT luftgetrocknet.

D.12 *In situ* rRNA-Hybridisierung

Lösungen:

- 1 x PBS (D.11.1)

- **0,5 M EDTA:**

EDTA	136,1 g/ 950 ml H ₂ O bidest.
mit 10 N NaOH pH 8,0 einstellen	
H ₂ O bidest.	ad 1000ml
autoklavieren	

- **10 N NaOH:**

NaOH-Plätzchen	120 g/300 ml H ₂ O bidest.
autoklavieren	

- **5M NaCl:**

NaCl	292,2 g/1000 ml H ₂ O bidest.
------	--

autoklavieren

- **10 % (w/v) SDS:**

Natriumdodecylsulfat 10 g/100 ml H₂O_{bidest.}
autoklavieren

- **1 M Tris/HCl:**

Tris 121 g/950 ml H₂O_{bidest.}
mit HCl_{conc.} pH 8,0 einstellen
H₂O_{bidest.} ad 1000ml
autoklavieren

- **Hybridisierungspuffer:**

5 M NaCl 360 µl
1 M Tris/HCl, pH 8,0 40 µl
Formamid x µl
10 % (w/v) SDS 2 µl
H₂O_{bidest} ad 2 ml

- **Waschpuffer:**

1 M Tris/HCl, pH 8,0 1 ml
5 M NaCl y µl
0,5 M EDTA, pH 8,0 500 µl (ab 20 % Formamid im Hybridisierungspuffer)
H₂O_{bidest} ad 50 ml
10 % (w/v) SDS 50 µl

- Citifluor AF2 (Citifluor Ltd., London)

Durchführung:

Je 30 µg (150 µg für eukaryotische Sonden) cy3- bzw. 50 µg (150 µg für eukaryotische Sonden) FLUOS-Sonde in Hybridisierungs-Puffer (ad 20 µl) mit der gewünschten Stringenz (siehe Referenzen in Tab. D.5) werden auf die Aussparungen der OT mit der fixierten, trockenen Probe aufgetropft und in einer feuchten Kammer für 1,5 h bei 46 °C inkubiert (2 h bei Eukaryoten). Der Hybridisierungs-Mix wird abgezogen und der OT zweimal mit vorgewärmtem Waschpuffer (46 °C) gewaschen. Dazu werden 20 µl Waschpuffer aufgetropft und in feuchter Kammer 15 - 20 min bei 46 °C inkubiert oder OT wird in Waschpuffer in 50 ml-Greiner-Röhrchen gestellt und 15 - 20 min bei 46 °C inkubiert. Der OT wird danach mit H₂O_{bidest.} vorsichtig abgespült, luftgetrocknet und mit Citifluor eingedeckelt. Zur Aufbewahrung werden die trockenen Präparate ohne Citifluor (mit H₂O_{bidest.} abspülen) bei -20 °C eingefroren.

D.13 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

D.13.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräp.)

Lösungen:

- **Selektivmedium:**

Ampicillin 50 mg/l LB-Medium (D.8.2)

- **Lösung 1:**

75 mM Tris/HCl, pH 8,0
30 mM EDTA, pH 8,0
150 mM Glucose

- **Lösung 2 (immer frisch ansetzen!):**

H₂O_{bidest., steril} 1,2 ml
10 N NaOH 150 µl
10 % SDS (w/v) 150 µl

- **Lösung 3 (3 N Na-Acetat):**

Natrium-Acetat 24,61 g/100 ml H₂O_{bidest.}
pH 4,8 einstellen

- **Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol:**

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 25 : 24 : 1
2 min zentrifugieren, aus unterer Phase benötigtes Volumen entnehmen

- EtOH 70 %, 96 %

- **RNase A:**

10 mg in 10 ml H₂O_{bidest., steril} lösen, 10 min bei 100 °C aufkochen,
bei -20 °C einfrieren

Durchführung:

Aus ÜN-Kultur werden 3 ml in ERGs 3 - 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand sauber abgezogen. Die Zellen werden in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, 5 min bei RT stehengelassen und auf Eis abgekühlt. Dann wird 200 µl Lösung 2 zugegeben und dreimal stark geschüttelt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wird 150 µl eiskalte Lösung 3 zugeben und das ERG dreimal leicht umgedreht. Nach 5 min auf Eis wird die Suspension 5 min bei 13000 rpm

zentrifugieren. Zur Entfernung der Proteine wird der Überstand (ca. 450 µl) zu 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol in ein neues ERG pipettiert und 2 min geschüttelt. Nach 2 min bei 14000 rpm zentrifugieren wird die obere wässrige Phase (ca. 400 µl) zu 1ml eiskaltem 100 % EtOH in ein neues ERG pipettiert und dieses dreimal leicht umgedreht. Anschließend wird zweimal je 5 - 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgekippt und 500 µl eiskalter 70 % EtOH zum Pellet zugegeben. Nach zweimaligem Zentrifugieren (3 min, 14000 rpm) wird der Überstand sauber abgezogen. Danach wird das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl H₂O_{bidest., steril} resuspendiert. Nach dem RNA-Verdau (1µl RNase A zugeben, 30 min bei 37 °C) wird die Suspension bei -20 °C eingefroren.

D.13.2 Isolierung und Fällung von DNA aus Bakterien (High Pure PCR Template Preparation Kit von Boehringer Mannheim)

Lösungen:

- High Pure PCR Template Preparation Kit von Boehringer Mannheim (enthält Lysozym, Proteinase K, Bindungs-, Wasch- und Elutionspuffer)
- EtOH 70 %, 96 %
- Isopropanol
- 3 N Na-Acetat, pH 4,8 (D.13.1)
- 1 x PBS (D.11.1)

Durchführung:

Die nach Vorschrift isolierte DNA wird durch Zugabe von 0,1 Volumen Na-Acetat und 0,7 Volumen 96 % EtOH ÜN bei -80 °C oder 1 h auf Flüssig-Stickstoff gefällt. Nach 15 min zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C) wird das Pellet mit kaltem 70 % EtOH gewaschen und erneut abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C). Die DNA wird nun in der Vakuumzentrifuge 15 min getrocknet und in 10 - 20 µl H₂O_{bidest., steril} aufgenommen.

D.13.3 Isolierung von DNA aus Umweltproben (nach Pabst et al. 1997)

Lösungen:• **Lysis-Puffer:**

Tris-Acetat	7,248 g
Na-Acetat	1,641 g
EDTA	292,25 mg
SDS	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

autoklavieren

- Isopropanol 75 %, 100 %

Durchführung:

Die Biofilmprobe wird in 50 ml Probenwasser kräftig geschüttelt und filtriert (Faltenfilter, Schleicher & Schuell). Nach 15 min zentrifugieren (5000 rpm) wird das Pellet in 500 µl Lysis-Puffer aufgenommen, in ein 1,5 ml-ERG überführt und 30 sec gevortext. Die Zellen werden durch 20 min Inkubation bei 99 °C lysiert. Nach 1 min zentrifugieren (13.000 rpm, RT) werden 400 µl Überstand mit 400 µl 100 % Isopropanol in neues ERG überführt und vorsichtig gemischt. Nach 15 min zentrifugieren (13.000 rpm, 4 °C) wird das Pellet zweimal mit 500 µl 75 % Isopropanol gewaschen. Die DNA wird nach der letzten Zentrifugation 15 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30 µl H₂O_{bidest., steril} aufgenommen.

D.13.4 Isolierung von RNA aus Bakterien (nach Schmid 1998)Lösungen:• **AE-Puffer:**

20 mM Na-Acetat
1 mM EDTA
mit Eisessig pH 5,5 einstellen

- saures Phenol, pH 4,0 - 4,5
-
- EtOH 70 %, 96 %
-
- Glasperlen
- _{steril}
- (0,10 - 0,11 mm, Braun, Melsungen)
-
- H
- ₂
- O
- _{bidest., DEPC}

- **3 M Na-Acetat:**

Natrium-Acetat 24,61 g/100 ml H₂O_{bidest.}
pH 5,2 einstellen

- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (D.12.1)

- RNasin (Boehringer Mannheim)

- **25 % (w/v) SDS-Lösung:**

Natriumdodecylsulfat 25 g/100 ml H₂O_{bidest.}

Durchführung:

Aus einer logarithmischen Kultur werden 2 ml für 5 min zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C) und das Pellet mit 500 µl eiskalten AE-Puffer gewaschen. Die sedimentierten Zellen werden in 500 µl eiskaltem AE-Puffer aufgenommen und mit 50 µl 25 % SDS und 600 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (auf 60 °C vorgewärmt) versetzt. Um die bakteriellen Zellwände zu zerschlagen, werden etwa 400 µl sterile Glasperlen zugegeben und der Ansatz 2 - 5 min sonifiziert. Zur weiteren Lyse wird der Isolierungsansatz 10 min bei 60 °C im Wasserbad und anschließend 2 - 3 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min zentrifugieren (14000 rpm, 4 °C) wird die obere, nukleinsäurehaltige Phase möglichst quantitativ abgezogen, in ein neues ERG überführt und zur Proteinextraktion mit 1 ml saurem Phenol ausgeschüttelt. Die Phenolextraktion muss so oft wiederholt werden, bis keine deutlich sichtbare Interphase mehr auftritt. Die obere, nukleinsäurehaltige Phase wird schließlich in ein neues ERG pipettiert. Die RNA wird nach Zugabe von 0,1 Vol. 3M NaAc und 2,5 Vol. EtOH_{abs} 5 h bis ÜN durch Inkubation bei -20 °C ausgefällt. Nach 20 min zentrifugieren (14000 rpm, 4 °C) wird der Überstand vorsichtig abgezogen und das Pellet mit 300 - 500 µl EtOH (70 %) gewaschen. Die RNA wird anschließend durch 20 min zentrifugieren (14000 rpm, 4 °C) sedimentiert und in der Vakuumzentrifuge 5 min getrocknet. Das Pellet wird in 80 - 100 µl H₂O_{bidest., DEPC} aufgenommen und zur Inaktivierung von RNasen mit 0,8 - 1 µl RNasin versetzt. Die isolierte RNA kann bei -20 °C gelagert werden.

D.14 PCR

Lösungen:

- Primer
- PCR-Supermix (Gibco-BRL):
(enthält Nucleotide, MgCl₂, Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.})
- Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim)
- 10 x PCR-Puffer (Boehringer Mannheim)
- Nukleotide (Promega)
- PCR-Kit (Qiagen, Hilden)

Durchführung:

Während einer PCR wird ein DNA-Fragment (durch zwei invers zueinander angeordnete Oligonukleotide begrenzt) mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase amplifiziert. Als Template kann sowohl isolierte Bakterien-DNA als auch lysierte Bakterien (Kolonie picken, in 50 µl H₂O_{bidest., steril} in 1,5 ml-ERG mit Schraubdeckel resuspendieren, 5 min bei 110 °C aufkochen, bei –20 °C einfrieren) verwendet werden.

Je PCR wird ein 40 µl-Ansatz unter Verwendung von 1 µl Template und je 1 µl Primer in ein 0,5 ml-ERG auf Eis pipettiert. Für die Primer 63f + 1387r werden Polymerase und Puffer von Boehringer Mannheim verwendet, für die Primer 616V + 630R der PCR-Kit von Qiagen. Alle anderen PCR-Ansätze werden mit PCR-Supermix angesetzt. Die PCR-Produkte werden bei Bedarf bei –20 °C gelagert.

Tab. D.8: PCR-Bedingungen.

	63f+1387r	616V+630R	leg225+leg858	t3-/t7-mip
Initiale Denaturierung (bei allen PCR-Reaktionen)				95 °C, 5 min
Denaturierung	95 °C, 1 min	95 °C, 1 min	95 °C, 10 sec	95 °C, 50 sec
Annealing	55 °C, 2 min	50 °C, 1,5 min	64 °C, 1 min	58 °C, 70 sec
Elongation	72 °C, 2 min	72 °C, 1,5 min	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
Abschließende Elongation (bei allen PCR-Reaktionen)	72 °C, 5 min			
Abkühlen auf 4 °C (bei allen PCR-Reaktionen)				

D.15 Qualitative Analyse von Nukleinsäuren

Lösungen:

- **50 x TAE-Puffer:**

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
H ₂ O <small>bidest.</small>	ad 1000 ml

autoklavieren

- **10 x TBE-Puffer:**

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	9,3 g
H ₂ O <small>bidest.</small>	ad 1000 ml

autoklavieren

Gebrauchslösungen (Laufpuffer und Puffer für die Gelbereitung = 1 x TAE-Puffer bzw. 0,5 x TBE-Puffer) aus der Stammlösung durch Verdünnung mit H₂O bidest. herstellen.

- **Agarosegel:**

1 g Agarose mit 100 ml 1 x TAE-Puffer bzw. 1,2 g Agarose mit 100 ml 0,5 x TBE-Puffer versetzen, in einem Mikrowellenofen aufkochen. Auf 50 - 60 °C abgekühlte Agaroselösung in eine vorbereitete Gelkammer mit eingesetzten Kamm gießen, aushärten lassen.

- 1 kb- bzw. 100 bp-Größenmarker

- **Stop-Puffer:**

25 % (w/v) Ficoll
0,5 % (w/v) Bromphenolblau
0,5 % (w/v) Xylencyanol
50 mM EDTA

- **Ethidiumbromid-Stammlösung:**

10 mg EtBr/ml H₂O_{bidest.}
Die Gebrauchslösung wird durch 1 : 15-Verdünnung mit H₂O_{bidest.} hergestellt.

Durchführung:

Zur qualitativen Analyse der einzelnen Nukleinsäure-Präparationen wird eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wird das feste Agarosegel mit der Elektrophorese-Kammer in die mit Laufpuffer gefüllte Apparatur eingelegt. Je 15 µl der zu untersuchenden PCR-Produkte werden mit 3 µl Stop-Puffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt bei einer Stromstärke von etwa 100 mA und maximal 150 V Spannung nach ihrem Molekulargewicht. Nach Beendigung des Laufs (ca. 1 - 1,5 h) wird das Gel in einer Färbewanne für 20 - 30 min mit EtBr-Lösung gefärbt. Überschüssiges EtBr wird durch Spülen mit H₂O_{bidest.} entfernt. Auswertung und Dokumentation der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgen unter UV-Licht mit einem Videodokumentationssystem.

D.16 Quantitative Analyse von Nukleinsäuren

Lösungen:

- **Carbonatpuffer (1 M NaHCO₃/Na₂CO₃):**

NaHCO₃ 84,01 g/1000 ml H₂O_{bidest.}
mit 1M Na₂CO₃ pH 9,0 einstellen

Durchführung:

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Clark und Swika 1977) wird ein geeignetes Aliquot der Nukleinsäurelösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt und die OD in einem Spektralfotometer gemessen.

Für die Berechnung der Konzentration gelten folgende Näherungswerte (Cryer et al. 1975):

doppelsträngige DNA:	$\text{OD}_{260 \text{ nm}} = 1$ entspricht $\cong 50 \mu\text{g/ml}$
einzelsträngige DNA:	$\text{OD}_{260 \text{ nm}} = 1$ entspricht $\cong 20 \mu\text{g/ml}$
einzelsträngige RNA:	$\text{OD}_{260 \text{ nm}} = 1$ entspricht $\cong 37 \mu\text{g/ml}$

Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen lassen sich durch Bestimmen der Extinktionen bei 230, 260 und 280 nm und Bildung der Quotienten E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} nachweisen. Für eine hinreichende Reinheit gelten dabei folgende Richtwerte (Marmur 1961, Sambrook et al. 1989):

$$E_{260}/E_{280} \geq 1,8$$

$$E_{260}/E_{230} \geq 2,2$$

Zur Vermessung der Polyribonukleotidsonden im Spektralfotometer werden Aliquots der Transkriptsondenlösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (bei DIG-11-UTP-markierten Transkripten) oder mit Carbonatpuffer (bei FLUOS-12-UTP-markierten Transkripten) verdünnt (5 μl Sonde und 495 μl Verdünnungslösung) und ein Wellenlängenscan erstellt. Aus der OD bei λ_{max} lässt sich die Konzentration an RNA bestimmen (Trebesius 1995).

D.17 Sequenzierung

Lösungen:

- AmpliTaq[®]FS BigDyeTerminator
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- SequiTherm EXCEL[™] II Long-Read[™] DNA Sequencing Kit-LC (Biozym, Hessisch O-
dendorf)

Durchführung:

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem sogenannten Ketten-Abbruch-Verfahren (Sanger et al 1977). Es werden vier Reaktionen angesetzt, wobei jeder Ansatz alle vier Desoxynukleotide und jeweils ein Didesoxynukleotid enthält. Man nimmt an, dass die Polymerase nach Einbau eines Didesoxynukleotids kein weiteres Nukleotid an den DNA-Strang anhängen kann. Statistisch gesehen passiert dieser Kettenabbruch an jeder Position des DNA-Stranges. Nach Auftrennung der Fragmente im nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel kann die Sequenz des vollständigen DNA-Stranges abgelesen werden.

Das zu sequenzierende PCR-Produkt wird mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung aufgereinigt. Je nach verwendetem Sequenziergerät wird eine Sequenzier-PCR mit nur einem IRD-800-markierten Primer und dem entsprechenden Sequenzier-Kit (SequiTherm für den Li-Cor-Sequenzierer) bzw. einem unmarkierten Primer, markierten Nukleotiden und dem Kit AmpliTaq (für den ABI PRISM-Sequenzierer) nach der jeweiligen Anleitung durchgeführt.

D.18 Klonierung

D.18.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Lösungen:

- One-Phor-All-Buffer (Pharmacia Amersham Biotechnologies, Braunschweig)
- Enzyme *EcoRI*, *HindIII* (Pharmacia Amersham Biotechnologies, Braunschweig)
- RNase A (nur nötig, wenn das Plasmid nicht unmittelbar nach der Plasmidpräp RNase-behandelt wurde!) (D.13.1)
- Stop-Puffer (D.15)
- 1 x TAE-Puffer (D.15)
- 1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer
- Ethidiumbromid-Stammlösung (D.15)

Durchführung:

Restriktionsendonukleasen können DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen spalten. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen *EcoRI* und *HindIII* entstehen dabei Fragmente mit überhängenden Enden (sticky end).

Für einen 50 µl-Ansatz werden in ein 1,5 ml-ERG pipettiert:

0,1 Volumen One-Phor-All-Buffer (10 x), 0,1 Volumen RNase A-Lösung, je 1 µl Restriktionsenzym, x µl Plasmid pRK30, ad 50 µl H₂O bidest., steril.

Der Verdau wird bei 37 °C für 1,5 h bis ÜN inkubiert und durch Zugabe von 6 µl Stop-Puffer beendet. Mit dem gesamten Ansatz wird eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (D.15). Die gewünschte Bande wird unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 ml-ERG überführt und mit dem GENE CLEAN[®]-Kit (D.18.2) aufgereinigt.

D.18.2 Eluierung von DNA aus Agarose-Gelen

Lösungen:

- GENE CLEAN[®]-Kit (BIO 101, Dianova, Hamburg)
(enthält Natriumjodid-Lösung, Glasmilch-Suspension, NewWash-Puffer)

Die eluierten Nukleinsäuren (Durchführung entsprechend der Anleitung des Herstellers) werden in neues ERG überführt und bei –20 °C gelagert.

D.18.3 Ligation

Lösungen:

- Klonierungsvektoren pBluescript II KS und pBluescript II SK (Stratagene)
- Ligase-Puffer (10 x, Gibco BRL)
- T4-Ligase (Gibco BRL)

Durchführung:

Die T4-Ligase verknüpft zwei DNA-Fragmente, die zueinander komplementäre Enden besitzen (Vektor und Insert). Die verwendeten Vektoren besitzen die identische Multiple Cloning Site, jedoch in umgekehrter Richtung. Dies hat den Vorteil, dass durch Schneiden mit denselben Enzymen das zu ligierende Insert in einen Vektor in Vorwärts- und im anderen Vektor in Rückwärts-Orientierung eingefügt wird. Dadurch erhält man die Matrize für die sense- und die anti-sense-Sonde.

Für einen 20 µl-Ansatz wird in ein 1,5 ml-ERG pipettiert:

4 µl Ligase-Puffer + 1 µl T4-Ligase + 2 - 3 µl DNA-Fragmente (Vektor : Insert 1 : 1 bzw. 1 : 3 bzw. 1 : 5), ad 20 µl H₂O_{bidest., steril.} Als Negativkontrolle bleibt ein Ansatz ohne Zusatz von Insert. Die Ansätze werden im Wasserbad bei 14 °C ÜN inkubiert. Anschließend wird die Ligase durch Hitze inaktiviert (10 min, 70 °C).

D.18.4 Herstellung Glycerin-kompetenter Zellen für die Elektroporation

Lösungen:

- LB-Medium (D.8.2)
- Glycerin 10 %

Durchführung:

Es werden 200 ml LB-Medium mit 2 ml *E.coli*-ÜNK angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Die Kultur wird auf Eis abgekühlt, auf sterile 50 ml-Röhrchen verteilt und 5 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C). Die Pellets werden mehrmals mit folgenden Mengen an sterilem, eiskaltem Glycerin gewaschen: 1. 200 ml, 2. 100 ml, 3. 10 ml, 4. 5 ml. Zuletzt werden die Zellen in 1 ml Glycerin resuspendiert und in 100 µl-Aliquots bei -80 °C eingefroren. Als Test wird je ein Aliquot auf LB-Agarplatten bzw. LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum, gegen das das Resistenzgen auf dem zu transformierenden Plasmid wirkt, ausgestrichen; auf letzterer Platte dürfen die kompetenten Zellen nicht wachsen!

D.18.5 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen für den heat shock

Lösungen:

- LB-Medium (D.8.2)
- **100mM CaCl₂:**
CaCl₂ 1,47 g/100 ml H₂O *bidest.*
autoklavieren
- Glycerin 86 %

Durchführung:

Es werden 49 ml LB-Medium mit 1 ml ÜNK *E.coli* DH5 α angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 – 0,8 inkubiert. Der Ansatz wird auf Eis abgekühlt, auf sterile 50 ml-Röhrchen verteilt und 5 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C). Die Pellets werden in 12,5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut 5 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C). Die Pellets werden nun zusammen in 1,25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Danach werden 520 μ l 86 % Glycerin zugegeben und Aliquots à 150 μ l bei -80 °C eingefroren. Als Test wird je ein Aliquot auf LB-Agarplatten bzw. LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum, gegen das das Resistenzgen auf dem zu transformierenden Plasmid wirkt, ausgestrichen; auf letzterer Platte dürfen die kompetenten Zellen nicht wachsen!

D.18.6 Transformation mittels Elektroporation

Lösungen:

- **LB-Agarplatten (D.8.2) mit XGal, IPTG, Antibiotikum:**
10 mM IPTG 500 μ l/l
2 % XGal 3 ml/l
Ampicillin 50 mg/l

- **SOC-Medium:**

LB-Medium	4,8 ml
1 M Glucose	100 µl
1 M MgSO ₄	50 µl
1 M MgCl ₂	50 µl

Durchführung:

Während einer Transformation können kompetente Bakterien ein Plasmid aufnehmen, das unter Selektionsdruck (Antibiotika) in der Zelle erhalten bleibt.

Die trockenen Elektroporationsküvetten (in EtOH gelagert) werden 2 min UV-bestrahlt und auf Eis gekühlt. Auf Eis werden 50 µl Glycerin-kompetente *E. coli* aufgetaut, mit 3 µl Ligationsansatz (ca. 200 ng DNA) versetzt und 5 min auf Eis gekühlt. Die Suspension wird in kalte Elektroporationsküvetten pipettiert und in die Elektroporationskammer geschoben (Puls mit 2,3 kV, 200 Ω, 25 µF). Die Suspension wird nun mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und im Schüttler inkubiert (37 °C, 1,5 - 2 h). Danach werden Aliquots auf Antibiotikum-haltige LB-Agarplatten ausplattiert (je 100 µl aus unverdünnter Suspension, aus 1 : 10- und aus 1 : 100-Verdünnung) und ÜN im Brutschrank (37 °C) inkubiert.

D.18.7 Transformation mittels heat shock

Lösungen:

- LB-Agarplatten mit XGal, IPTG, Antibiotikum (D.18.6)
- SOC-Medium (D.18.6)

Durchführung:

Auf Eis werden 150 µl CaCl₂-kompetente *E. coli* aufgetaut, mit 20 µl Ligationsansatz versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Der heat shock wird wie folgt durchgeführt: Suspension für 45 sec in 42 °C-Thermoblock stellen, 2 - 3 min auf Eis abkühlen. Danach wird 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zupipettiert und im Schüttler inkubiert (37 °C, 1,5 h). Aliquots (siehe D.18.6) werden auf Antibiotikum-haltige LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN im Brutschrank (37 °C) inkubiert.

D.18.8 Identifizierung rekombinanter Klone

Das Screening rekombinanter Klone erfolgte nach dem Prinzip der Blau-Weiß-Selektion (Sambrook et al. 1989). Dazu werden die transformierten Bakterien auf LB-Platten, die neben dem Induktor IPTG auch ein Antibiotikum (Ampicillin) und XGal enthalten, ausplattiert. Nach Inkubation ÜN bei 37 °C werden die weißen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf Antibiotikum-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Die so vereinzelt Klone können durch PCR mit den Primern uni und reverse auf das Vorhandensein des Inserts getestet werden. Zur genaueren Untersuchung des Inserts werden die Klone mit einem sterilen Zahnstocher in Antibiotikum-haltiges LB-Flüssigmedium (3 ml im Reagenzglas) überführt und ÜN durch Inkubation im Schüttler bei 37 °C angezogen. Aus dieser Kultur werden die Plasmide mit Insert nach den entsprechenden Isolierungsmethoden für Plasmid-DNA isoliert (D.13.1) und mit Restriktionsenzymen geschnitten (D.18.1) bzw. sequenziert (D.17).

D.19 mRNA-Hybridisierung

D.19.1 *In vitro* Transkription

Lösungen:

- ATP, CTP, GTP (Boehringer Mannheim)
- DIG-11-UTP (Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat, Boehringer Mannheim)
- FLUOS-12-UTP (Fluorescein-12-Uridin-5'-Triphosphat, Boehringer Mannheim)
- DNase I, RNase-frei (Boehringer Mannheim)
- T3-RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim), für die FLUOS-12-UTP-Markierung
- T7-RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim), für die DIG-11-UTP-Markierung
- 10 x Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim)
- **10 M Ammonium-Acetat-Lösung:**

NH₄-Acetat 77,08 g/100 ml H₂O bidest., DEPC

- **0,2 M EDTA-Lösung:**

EDTA 5,44 mg/100 ml H₂O_{bidest., DEPC}
 mit 10 N NaOH pH 8,0 einstellen
 autoklavieren

- EtOH_{abs.} 70 %, 96 %

- **10 x Markierungsgemisch (10 x Ribo-NTP-Mix):**

ATP	10,0 mM
CTP	10,0 mM
GTP	10,0 mM
UTP	6,5 mM
FLUOS-12-UTP oder DIG-11-UTP	3,5 mM

- **Standardreaktionsansatz:**

1 µg Matrizen-DNA	x µl
10 x Markierungsgemisch	3 µl
10 x Transkriptionspuffer	3 µl
T7- oder T3-RNA-Polymerase	3 µl
RNasin	1,5 µl
H ₂ O _{bidest., DEPC}	ad 30 µl

Durchführung:

Als Matrize für die *in vitro* Transkription dient ein 282 bp großes Stück des *mip*-Gens aus *L. pneumophila*, das mittels PCR vervielfältigt wurde (bp 1108-1389) (Engleberg et al. 1989). An den Vorwärts- oder Rückwärts-Primer wird jeweils am 5'-Ende die T3- bzw. T7-Sequenz angehängt, da die RNA-Polymerase diese Promotorsequenz für die Amplifikation benötigt. Durch Sequenzierung des Amplifikats und Sequenzvergleich der erhaltenen Daten mit der Sequenzdatenbank BLAST kann die korrekte Sequenz des PCR-Produkts überprüft werden.

Das PCR-Produkt wird in der Vakuumzentrifuge auf 1 µg eingengt und in 19,5 µl H₂O_{bidest., DEPC} aufgenommen. Für die Reaktionsansätze wird das T7-PCR-Produkt mit dem DIG-11-UTP-Markierungsgemisch bzw. das T3-PCR-Produkt mit dem FLUOS-12-UTP-Markierungsgemisch vorsichtig durchmischt (ohne Auf- und Abziehen des Pipettenspitzeninhalts) und 3 h bei 37 °C (Thermoblock) inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl DNase I, RNase-frei, und anschließender Inkubation für 15 min bei 37 °C (Thermoblock) wird die Matrizen-DNA abgedaut. Nach Zugabe von 3 µl EDTA-Lösung zum Abstoppen der DNase-Behandlung werden die Transkripte mit 16 µl 10 M NH₄Ac-Lösung und 156 µl eiskaltem EtOH_{abs.} versetzt und durch Inkubation für mindestens 3 h bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wird 20 min zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C), an-

schließlich werden die sedimentierten Transkripte mit 1 ml EtOH _{70 %} gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min (14000 rpm, 4 °C) wird die transkribierte RNA kurz im Vakuum getrocknet (SpeedVac), in 50 µl H₂O _{bidest., DEPC} aufgenommen und zum Schutz vor RNasen mit 2 µl RNasin versetzt. Konzentration und Markierungseffizienz werden fotometrisch ermittelt. Die Transkriptsonden werden aliquotiert und bei -20 °C eingefroren (200 ng pro *in situ* Hybridisierung nötig).

D.19.2 Nukleinsäuretransfer mittels Dot blot (nach Schmid 1998)

Die Membranhybridisierungen werden mit DIG-markierten Polyribonukleotidsonden, die mit spezifischen, POD-markierten anti-DIG-F_{ab}-Fragmenten detektiert werden können, durchgeführt. Alle Lösungen enthalten zum Schutz vor RNasen 0,1 % DEPC.

Lösungen:

- Formaldehyd (37 %)
- Formamid
- **10 x MOPS-Puffer, pH 6,0:**

200 mM MOPS	41,85 g
50 mM Na-Acetat	4,1 g
10 mM EDTA	3,72 g
H ₂ O _{bidest., DEPC}	ad 1000 ml
Lösung steril filtrieren und im Dunkeln aufbewahren	
- **Dot-Blot-Puffer:**

Formamid	6,0 ml
1 x MOPS-Puffer (20 mM)	1,2 ml
Formaldehyd (37 %)	1,944 ml
RNA je nach Konzentration	5 - 15 µl

Durchführung:

Zur Proben Denaturierung wird die RNA mit 150 µl Dot-Blot-Puffer versetzt, 10 min bei 65 °C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Die Proben werden in die gereinigte und nach Herstellerangaben zusammengebaute Dot-Blot-Apparatur einpipettiert. Durch Anlegen eines Vakuums für etwa 45 min wird die RNA auf die Membran (HybondTM-N+, Amersham, Braun-

schweig) übertragen, danach werden 100 - 150 µl Dot-Blot-Puffer nachgesaugt. Die Membran wird nun mit einer sterilen Pinzette entfernt und die membrangebundene RNA durch 2 - 3 minütige Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) auf der Membran immobilisiert (Church und Gilbert 1984). Die Membran kann in Whatman-Papier eingeschlagen aufbewahrt werden.

D.19.3 Dot blot-Hybridisierung

Lösungen:

- **Prähybridisierungslösung:**

20 x SSC	28,1 ml
10 % (w/v) Blockierungsvorratslösung	22,5 ml
10 % (w/v) N-Lauryl-Sarcosin	1,125 ml
10 % (w/v) SDS	225 µl

- **Hybridisierungspuffer:**

5 M NaCl	360 µl
1 M Tris/HCl, pH 8,0	40 µl
10 % (w/v) N-Lauryl-Sarcosin	20 µl
10 % (w/v) 10 % SDS	2 µl
10 % (w/v) Blockierungsvorratslösung	800 µl
Formamid	x µl
H ₂ O bidest., DEPC	ad 2 ml

- **Waschpuffer:**

1 M Tris/HCl, pH 8,0	1 ml
5 M NaCl	y µl
10 % (w/v) SDS	50 µl
H ₂ O bidest., DEPC	ad 50 ml

- anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragmente (Boehringer Mannheim)

- **Puffer 1 (DIG-Detektion):**

150 mM NaCl	8,8 g
100 mM Maleinsäure	11,61 g
H ₂ O bidest., DEPC	ad 1000 ml
mit NaOH-Plättchen pH 7,5 einstellen	

- **Puffer 2 (DIG-Detektion):**

10 % (w/v) Blockierungsvorratslösung auf 1,5 % mit Puffer 1 verdünnen

- **Puffer 3 (DIG-Detektion):**

100 mM Tris	12,11 g
100 mM NaCl	5,84 g
50 mM MgCl ₂	10,16 g
H ₂ O bidest., DEPC	ad 1000 ml
mit HCl _{conc.} pH 9,5 einstellen	

- **Waschpuffer (DIG-Detektion):**

Puffer 1 : 0,3 % Tween-20 = 1 : 1

- **20 x SSC-Lösung, pH 7,0 (Standard-Saline-Citrat):**

NaCl	175,32 g
Dinatriumcitrat-Dihydrat	88,23 g
H ₂ O bidest., DEPC	ad 1000 ml

- **Stripping-Lösung (0,1 x SSC + 0,5 % SDS):**

20 x SSC	250 µl
10 % (w/v) SDS	2,5 ml
H ₂ O bidest., DEPC	ad 50 ml

- ECL–Western-Blotting-Reagens (Pharmacia Amersham Biotechnologies, Braunschweig):
alle Reaktionslösungen (Detektions-Lösung 1 und 2) sind im Kit enthalten

Durchführung:

Die Hybridisierung erfolgt in gereinigten Glasröhren (20 x 3 cm, Bachofer, Reutlingen) in einem Hybridisierungssofen mit Drehmotor. Dazu wird die Membran mit einer sterilen Pinzette in die Röhre geschoben, mit 20 ml Prähybridisierungslösung versehen und 1 - 1,5 h bei 35 °C prähybridisiert. Anschließend wird die Prähybridisierungslösung durch 2 ml Hybridisierungspuffer, der 150 ng DIG-markierte Sonde enthält, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt ÜN bei 56 °C im Hybridisierungssofen. Danach wird der Hybridisierungspuffer durch 10 ml Waschpuffer ersetzt. Zwei sich anschließende Waschschrte (15 min bei 48 °C im Hybridisierungssofen) dienen der Entfernung nicht bzw. unspezifisch gebundener Sonde.

DIG-Detektion:

Die hybridisierte Membran wird für 5 min in Puffer 1 inkubieren. Danach wird Puffer 1 durch 20 ml Puffer 2 ersetzt (zur Absättigung der Membran, um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern), 60 min bei 35 °C inkubieren. Nach Abkippen von Puffer 2 wird für 40 min Puffer 2 mit anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragmenten zugegeben (Antikörper : Puffer 2 = 1 : 5000, d.h. 4 µl AK + 20 ml Puffer 2). Anschließend wird die Membran zweimal gewaschen (je 15 min mit

je 100 ml Waschpuffer). Nach 5 min Equilibrierung in 20 ml Puffer 3 wird die Membran kurz in 1 x PBS geschwenkt. Nun können die Hybridisierungssignale mit dem ECL-Western-Blotting-Reagens detektiert werden. Dazu wird die mit indirekt POD-markierten Polyribonukleotidsonden hybridisierte Membran mit einer sterilen Pinzette auf eine in Frischhaltefolie eingeschlagene Glasplatte transferiert und mit der fertig bereiteten Detektionslösung (1 : 1 Gemisch aus Detektionslösung 1 und 2, etwa 6 ml für 11 x 14 cm-Membran) versehen.

Das 'Enhanced-Chemiluminescence-System' liefert nach Umsetzung von zyklischem Diacylhydrazid (Luminol) unter Verwendung von Phenol als chemischem Enhancer mit dem Enzym Peroxidase Photonen. Diese Photonen lassen sich durch eine ultrasensitive Fotonenkamera nachweisen (zusammen mit dem Bildverarbeitungssystem Argus-20 und den Optionen 'Photon-Counting' und 'Accumulation').

D.19.4 *In situ* Hybridisierung ganzer Zellen auf dem Objektträger

Lösungen:

- Formamid
- 5 M NaCl (D.12)
- 1 M Tris/HCl, pH 8,0 (D.12)
- 0,5 M EDTA, pH 8,0 (D.11)
- 10 % (w/v) SDS (D.11)
- 10 % (w/v) N-Lauryl-Sarcosin
- 10 % (w/v) Blockierungsvorratslösung
- 20 x SSC-Lösung (D.19.3)
- **Hybridisierungspuffer:**

5 M NaCl	30 µl
1 M Tris/HCl, pH 8,0	40 µl
Formamid	x µl
H ₂ O bidest., DEPC	ad 2 ml
10 % (w/v) SDS	2 µl

Durchführung:

In die Aussparungen der OT werden zu den fixierten Zellen 19 µl Hybridisierungspuffer und 100 ng (1 µl) der jeweiligen Polyribonukleotidsonde bzw. je 100 ng Oligonukleotidsonde pipettiert. Anschließend wird der OT in eine feuchte Kammer (50 ml-Probengefäß mit in Hybridisierungspuffer getränktem Zellstoff) überführt. Nach einem Denaturierungsschritt (30 min bei 80 °C) folgt die Hybridisierung (3 h bei 46 °C). Im anschließenden Waschschrift wird die überschüssige Sonde mit Waschpuffer abgeschwemmt (10 min bei 46 °C). Waschpuffer und Salze werden durch vorsichtiges Spülen mit H₂O_{bidest., DEPC} entfernt.

Zur DIG-Detektion folgt eine Inkubation mit anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragmenten. Dazu werden in jede Aussparung der OT 17 µl F_{ab}-Inkubationspuffer und 3 µl anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragmente (200 µg/ml) pipettiert. Der OT wird in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundene F_{ab}-Fragmente werden durch 10 min waschen in Waschpuffer (RT) entfernt. Die Hybridisierungssignale werden nun mit dem TSA[™]-direct-(Red)-Kit detektiert.

Lösungen:

- **10 x TNT-Waschpuffer:**

1M Tris	121,14 g
1,5M NaCl	87,66 g
0,5 % (v/v) Tween [®] 20	5 ml
H ₂ O _{bidest., DEPC}	ad 1000 ml
nicht autoklavieren, Gebrauchslösung 1 : 10 mit H ₂ O _{bidest., DEPC} verdünnen	

- **TSA^ä-direct-(Red)-Kit (NEN^ä Life science Products, Boston):**

Cy3-Tyramid-Stammlösung:

Cy3-Tyramid in 300 µl H₂O_{bidest., DEPC} lösen.
Lösung bei 4 °C gelagert etwa 3 Monate haltbar.

Cy3-Tyramid Inkubationslösung (pro Objektträger 102 µl = 17 µl pro Aussparung):

H ₂ O _{bidest., DEPC}	50 µl
Amplifikations-Diluent	50 µl
Cy3-Tyramid-Stammlösung	2 µl

Durchführung:

Bei allen Schritten muss darauf geachtet werden, dass die Aussparungen des OT nicht austrocknen! Der OT wird in eine Petrischale überführt, mit 1 x TNT-Waschpuffer überschichtet und 5 min unter leichtem Schütteln inkubiert (RT). Der Waschpuffer wird nun abgekippt und durch frischen Waschpuffer ersetzt. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal ausgeführt. Es folgt

eine Inkubation mit der cy3-Tyramid-Inkubationslösung für 8 min im Dunkeln (RT). Danach wird erneut dreimal mit 1 x TNT-Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Der OT wird anschließend unter Luftstrom getrocknet und mit Citifluor AF2 eingedeckelt.

D.20 Habitatbeschreibungen

Lösungen:

- **3 M KCl (für die Aufbewahrung der pH-Elektrode):**

KCl 223,68 g/1000 ml H₂O_{bidest.}
autoklavieren

Durchführung:

Zur Charakterisierung der Gewässer werden mit Hilfe von tragbaren Meßgeräten pH-Wert, Temperatur und elektrische Leitfähigkeit gemessen. Zudem werden biologische Parameter wie Vegetation und Fauna protokolliert. Die Messungen erfolgen jeweils vormittags, um eventuelle diurne Schwankungen zu vermeiden.

D.21 Isolierung von Legionellen aus Umweltproben (nach Morris et al. 1997) und Passage von Umweltproben durch Amöben

Lösungen:

- **Selektivmedium (VPC-BCYE):**

Vancomycin 10 µg/ml
Polymyxin B 20 µg/ml (= 80 U/ml)
Cycloheximid 50 µg/ml
zum autoklavierten, abgekühlten BCYE-Medium (D.7.1) zugeben

- **KCl-HCl-Puffer:**

0,2 M HCl 16,7 g/l

0,2 M KCl 14,9 g/l
 18 Teile KCl und 1 Teil HCl mischen, pH 2,2 einstellen
 autoklavieren

- **0,1 N KOH:**

KOH 5,61 g/1000 ml H₂O bidest.

- **K_xH_xPO₄-Puffer:**

KH₂PO₄ 6,75 g
 K₂HPO₄ 8,75 g
 H₂O bidest. ad 950 ml
 mit KOH pH 7,0 einstellen
 H₂O bidest. ad 1000 ml
 autoklavieren

Durchführung:

Jede Probennahme erfolgt vormittags, um Tageschwankungen auszuschließen. Biofilmtragendes Material (Blätter, Gräser, Moose, Wurzeln, Zweige, Federn, Algen) bzw. Wasserproben (ca. 300 ml) werden vor Ort in sterilen Glasflaschen gesammelt. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgt innerhalb von max. 2 h, so lange werden sie bei 4 °C gelagert. Die Biofilme werden in 100 ml K_xH_xPO₄-Puffer unter Schütteln abgewaschen (30 min, 4 °C). Die Puffersuspension bzw. die Wasserprobe wird über einen Faltenfilter filtriert, um grobe Partikel zu entfernen. Mit Hilfe einer autoklavierbaren Vakuumfiltriereinheit (Nalgene, Wiesbaden) können die Mikroorganismen aus dem ersten Filtrat (Lsg. A) auf einem sterilen 0,2 µm-Polycarbonatfilter konzentriert werden. Ein Teil dieses Filters wird zur Isolierung von Amöben verwendet (D.22); der andere Teil wird in 8 ml Faltenfiltrat bei 4 °C für 2 h geschüttelt, um die Bakterien wieder abzuwaschen (Lsg. B). Aus dieser Suspension wird 1 ml entnommen und mit 1 ml KCl-HCl-Puffer gemischt (15 min, RT), nach der Inkubation wird die Lösung durch Zugabe von 1 ml 0,1 N KOH neutralisiert (Lsg. C) (CDC 1994). Der Rest von Lösung B wird für 30 min im Wasserbad bei 50 °C inkubiert (Lsg. D).

Aus den Lösungen A und B werden jeweils 30 µl auf je zwei VPC-BCYE-Platten ausplattiert, aus den Lösungen C und D je 100 µl. Die Platten werden bis zu 15 Tage im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂) und regelmäßig auf mögliche *Legionella*-Kolonien hin kontrolliert. *Legionella*-ähnliche Kolonien werden gepickt und auf BCYE-Platten ausgestrichen.

Um nicht-kultivierbare Legionellen (VBNC) wieder kultivierbar zu machen, wird jeweils 1 ml aus den Lösungen A, B, C und D zu je 1 ml Amöbensuspension (*Acanthamoeba* in Amöbenpuf-

fer oder *Hartmannella* in Assaymedium) pipettiert und bis zu einer Woche inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Alle 24 h werden 100 µl-Aliquots auf VPC-BCYE-Platten ausplattiert.

Aus den Lösungen A, B, C, und D werden jeweils 1 ml in ein 1,5 ml-ERG überführt und zentrifugiert (8000 rpm, 10 min). Je 18 µl Zellpellet werden auf einen Sechs-Felder-Objektträger pipettiert und für die anschließende Fixierung und *in situ* Hybridisierung luftgetrocknet (Thermoblock, 37 °C).

D.22 Charakterisierung von *Legionella*-Isolaten

Aus Umweltproben vereinzelte Klone mit dem typischen *Legionella*-Erscheinungsbild auf BCYE-Platten werden mit *Legionella*-spezifischen Primern in der PCR bzw. mit Sonden durch *in situ* Hybridisierung überprüft. Die mit diesen Methoden als Legionellen identifizierte Klone werden durch Sequenzierung eines 16S rDNA-Stückes bzw. im Amöben-Infektionsassay näher charakterisiert.

Die Serotypisierung mittels polyklonaler Kaninchenantikörper bzw. monoklonaler Antikörper sowie die gaschromatografische Analyse des Fettsäuremusters der Zellwand wurden von Dr. P. Ch. Lück, TU Dresden, durchgeführt.

D.23 Isolierung von Amöben aus Umweltproben

Lösungen:

- NNA-Platten mit Futterbakterien (D.8.3)

Durchführung:

Ein Stück des Polycarbonatfilters (D.21) mit den aufkonzentrierten Bakterien wird (Bakterien nach unten) auf eine NNA-Platte gelegt und bei 23 °C inkubiert. Rings um den Filter können bereits nach einigen Tagen "auswandernde" Amöben beobachtet und isoliert werden. Dazu wird ein Agarblöckchen mit den Amöben mit einer sterilen Lanzette ausgeschnitten, mit den Amöben

nach unten auf eine neue NNA-Platte gelegt und vorsichtig ein Stück verschoben. Die Amöben wandern aus dieser Schleifspur aus bzw. vom Agarblöckchen weg und können bestimmt werden.

D.24 Bestimmung von Amöben

Lösungen:

- PJ-Saline (D.8.3)

Durchführung:

Die morphologische Bestimmung der Amöben aus Umweltproben erfolgt nach Page und Siemensma (1991) unter dem Lichtmikroskop. Dazu werden die Amöbenkulturen auf den Agarplatten lichtmikroskopisch kontrolliert und eine Stelle mit möglichst vielen Trophozoiten und evtl. vorhandenen Zysten markiert. Das markierte Agarblöckchen wird steril mit einer ausgeglühten Lanzette (Hartenstein, Würzburg) ausgeschnitten und die Amöben in einem Tropfen PJ-Saline auf einen OT abgeschwemmt. Die Zysten und Trophozoiten werden sofort bestimmt. Der OT wird dann in eine feuchte Kammer überführt; nach ein bis sechs Stunden können die Exzystierung bzw. der Übergang in Flagellaten- oder Schwimmformen beobachtet werden, die entsprechenden Formen werden protokolliert.