

Reporterassays und Oligonukleotid-Mikroarrays
zur
Überwachung der Bildung von Wasserblüten
und zur
frühen Erkennung ihrer potentiellen Toxizität

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Pat Schreiter

aus Taipeh, Republik China

Hauptberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. W. Schwack

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juni 2002

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2002

Zusammenfassung

Seit einigen Jahrzehnten werden cyanobakterielle Blüten in Gewässern immer häufiger beobachtet. Diese beeinflussen die Wasserqualität und Trinkwasserversorgung nachhaltig und verursachen hohe Kosten bei der Wasseraufbereitung. Die genaue Ursache für die Entstehung cyanobakterieller Blüten ist noch unklar. Es wurde jedoch beobachtet, daß bestimmte Muster der Nährstoffverfügbarkeit, im wesentlichen Phosphor, die cyanobakterielle Massenentwicklung fördern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf einem Promotor-Reporter-System basierender Assay zur Detektion der P-Verfügbarkeit für Cyanobakterien entwickelt. Die genomische DNA des als Sensor dienenden Cyanobakteriums enthielt die *Reporter::Promotor*-Konstruktion *PphoA::luxAB*, wobei *PphoA* der Promotor des Gens der alkalischen Phosphatase (*phoA*) ist und *luxAB* das Gen der Luziferase aus dem Leuchtbakterium *Vibrio harveyi* kordiert. Durch Phosphor-Limitierung wurde der Promotor in diesem Reporterstamm angeschaltet, was zur Expression der *luxAB* führte und ein Meßsignal in Form von Biolumineszenz lieferte. Um den Sensor in einem handlichen Format zu realisieren, wurde dieser Reporterstamm in Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Eigenschaften des immobilisierten Sensors wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht und die Durchführungsparameter des daraus entstandenen Assays optimiert. Kombiniert mit ökologischen und physiologischen Daten kann dieser Sensor als Frühwarnsystem für die Entstehung einer Wasserblüte dienen.

Eine häufig mit cyanobakteriellen Blüten einhergehende Umweltbelastung und Gesundheitsbedrohung besteht in der Produktion von Toxinen. Als besonders problematische Klasse von Giftstoffen sind Microcystine zu nennen, die unter anderem von der Gattung *Microcystis* produziert werden. Microcystine zeichnen sich durch eine erhebliche Lebertoxizität aus. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher Oligonukleotid-Mikroarrays zur Detektion von *Microcystis*-Stämmen entwickelt. Oligonukleotid-Sonden für Genotypisierung wurden anhand einer 16S rRNA-Datenbank entworfen und auf Objektträgern immobilisiert. Zusätzlich zu den 16S rRNA-Sonden wurden Sonden zur Detektion des Gens der Microcystin-Synthetase (*mcy*) immobilisiert. Die Fragmente der 16S rDNA sowie des *mcy*-Gens wurden mittels PCR aus dem DNA-Extrakt der Mikroorganismen in einer Wasserprobe amplifiziert, durch Einbau von fluoreszierenden Nukleotiden markiert und mit den Sonden hybridisiert. Anhand der Hybridisierungsmuster konnten dann die in einer Probe vorhandenen *Microcystis*-Stämme ohne zeitaufwendige Anreicherung und Kultivierung dieser Probe im Labor identifiziert werden. Eine positive Hybridisierung mit *mcy*-Sonden ist ein Hinweis auf eine vorhandene oder potentielle Bildung von Microcystinen. Dieser Oligonukleotid-Mikroarray ermöglicht eine schnelle Identifizierung der in Wasserblüten beteiligten *Microcystis*-Stämme und eine einfache Beurteilung der Gefährdung durch „blühende“ Gewässer.

Abstract

Since a few decades cyanobacterial blooms are more and more frequently observed. Besides their negative effects on water quality, they result in high cost during water treatment. The reason of cyanobacterial mass occurrence is not yet clear. It has been, however, reported, that some patterns of the availability of nutrients, especially P, N, and Fe, strongly promote cyanobacterial proliferation. In this study one assay based on the promoter-reporter system to monitor the P-availability for cyanobacteria was developed. The genomic DNA of the cyanobacterial reporter strain harbours the *pormoter::reporter* construction of *PphoA::luxAB*, where the *PphoA* is the promoter of the gen *phoA* encoding the alkaline phosphatase and *luxAB* is the gen encoding the luciferase from the luminescent bacterium *Vibrio harveyi*. The promoter was switched on by the phosphorus deficiency leading to an expression of *luxAB*, which could be quantified by its enzymatic reaction. In order to realize the sensor in an easy-to-use format, the reporter strain was immobilized in microtiterplates. In this study the properties of the immobilized sensors were investigated, and their parameters were optimized. Combined with ecological and physiological data this sensor could be used as an early warning system for water blooms.

One risk associated with cyanobacterial blooms is their toxin production. Microcystins are one of the particularly problematic hepatotoxic substances from cyanobacteria and produced by several genera, including *Microcystis* spp. Hence, oligonucleotide-microarrays for the detection of *Microcystis* spp. were developed in this study. Based on the 16S rRNA database oligonucleotide-probes for genotyping were designed and immobilized on slides. In addition, probes for the detection of the gen encoding microcystin synthetase (*mcy*) were also immobilized. The fragments of 16S rDNA and *mcy* of microorganism in water samples were amplified and fluorescent labeled by PCR, and then hybridized with the immobilized probes. According to the hybridization patterns the *Microcystis* spp. in water samples could be identified without cultivation and enrichment in the laboratories. The positive hybridization with the *mcy*-probes is the evidence for the presence or potential outbreak of microcystin production. This oligonucleotide-microarray enables a quick detection of the *Microcystis* spp. in water samples and indication of the risk in water containing cyanobacterial blooms.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cyanobakterien	1
1.1.1	Cyanobakterielle Blüten	2
1.1.2	Cyanotoxine	4
1.1.2.1	Microcystine und Microcystin-Synthetase	6
1.2	Mikrobielle Reporterassays	11
1.2.1	Regulation des Phosphorhaushalts in Cyanobakterien	13
1.3	Oligonukleotid-Mikroarrays	14
1.4	Methoden und Problematik der Klassifizierung von Bakterien	15
1.4.1	<i>Microcystis</i>	16
1.5	Aufgabenstellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalien, Bioreagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.2	Medien und Lösungen	22
2.3	Mikrobiologische Methoden	22
2.3.1	Stämme und Anzuchtbedingungen	22
2.3.2	Stammhaltung	22
2.3.3	Analytische Methoden	23
2.3.3.1	Charakterisierung von APL-Flüssigkultur	23
2.3.3.2	Induktion und Messung der Luziferase-Aktivität des immobilisierten Reporterstamms	24

2.3.3.3	Analytenspektrum	24
2.3.3.4	Validierung	25
2.4	Präparative Methoden	25
2.4.1	Konstruktion der Beleuchtungseinrichtung	25
2.4.2	Herstellung des Sensors im immobilisierten Format	25
2.4.2.1	Immobilisierung in Polyacrylamid	25
2.4.2.2	Immobilisierung in Agar	26
2.4.3	Herstellung des Oligonukleotid-Mikroarrays	26
2.4.3.1	Herstellung der Poly-L-Lysin-Objektträger	26
2.4.3.2	Immobilisierung der Oligonukleotid-Sonden auf Poly-L-Lysin-Objektträger	27
2.5	Molekulare Methoden	28
2.5.1	Entwurf von Oligonukleotid-Sonden	28
2.5.1.1	Oligonukleotid-Sonden zur Genotypisierung	28
2.5.1.2	Oligonukleotid-Sonden zur Detektion von <i>mcy</i>	28
2.5.2	Extraktion von Nukleinsäuren aus Kulturen und Umweltproben	29
2.5.2.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	29
2.5.2.2	DNA-Isolierung mittels QIAamp [®] Kit	29
2.5.3	Bestimmung von DNA-Konzentration	30
2.5.4	Targetvorbereitung	30
2.5.4.1	Amplifikation einzelner Targets mittels Single-PCR	31
2.5.4.2	Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung einzelner Targets mittels Single-PCR	31
2.5.4.3	Amplifikation mehrerer Targets mittels Multiplex-PCR	32
2.5.4.4	Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung mehrerer Targets mittels Multiplex-PCR	32
2.5.4.5	Fluoreszenzmarkierung mittels Random-Priming	32
2.5.4.6	Fluoreszenzmarkierung mittels Nick-Translation	33

2.5.5	Aufreinigung von DNA nach PCR, Random-Priming und Nick-Translation	33
2.5.6	Elektrophoretische Methoden	33
2.5.6.1	Agarosegel	33
2.5.6.2	Polyacrylamidgel für die Sequenzierung	34
2.5.7	Sequenzierung	34
2.5.8	Hybridisierung	35
2.5.8.1	Detektion und Auswertung der Hybridisierung	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Entwicklung eines Reporterassays im immobilisierten Format zur Detektion des bioverfügbaren Phosphors	37
3.1.1	Charakterisierung des Reporterstamms in Flüssigkultur	38
3.1.2	Immobilisierung des Reporterstamms	39
3.1.2.1	Immobilisierung im Polyacrylamid	39
3.1.2.2	Immobilisierung im Agar	39
3.1.2.3	Einfluß der Zelldichte auf die Lumineszenzmessung	41
3.1.3	Optimierung und Charakterisierung des CyanoSensors	41
3.1.3.1	Einfluß der Beleuchtungsintensität auf die Induktion	42
3.1.3.2	Einfluß der Substratmenge auf die Lumineszenzmessung	42
3.1.3.3	Einfluß der Kultivierungsgeschichte auf den CyanoSensor	43
3.1.3.4	Induktionsdauer	44
3.1.3.5	Lagerungsstabilität	45
3.1.3.6	Analytenspektrum des CyanoSensors	46
3.1.3.7	Messung der PO_4^{3-} -Konzentration in künstlichen Proben mittels CyanoSensor	46
3.2	Entwicklung eines Oligonukleotid-Mikroarrays zur Detektion von <i>Microcystis</i> -Stämmen und des Gens der Microcystin-Synthetase	47
3.2.1	Herstellung des Oligonukleotid-Mikroarrays	48
3.2.1.1	Methodische Optimierung	48

3.2.2	Vorbereitung der Targets	49
3.2.2.1	Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung einzelner Targets mittels Single-PCR	49
3.2.2.2	Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung mehrerer Targets mittels Multiplex-PCR	51
3.2.3	Oligonukleotid-Sonden	52
3.2.3.1	Arraylayout	53
3.2.4	Methodische Entwicklungen in der Hybridisierung zum Erreichen der Sondenspezifität	55
3.2.4.1	Enzymatische Behandlung der Targets vor Hybridisierung	56
3.2.4.2	Hybridisierungsdauer	56
3.2.4.3	Hybridisierungstemperatur	57
3.2.4.4	Ionenstärke des Hybridisierungspuffers	57
3.2.4.5	Einfluß vom Formamid im Hybridisierungspuffer auf die Sondenspezifität	57
3.2.5	Einsatzfähigkeit der CyanoArrays zur gleichzeitigen Genotypisierung und Detektion von <i>mcy</i>	59
3.2.5.1	Hybridisierung der mittels Single-PCR erzeugten einzelnen Targets mit dem CyanoArray	59
3.2.5.2	Hybridisierung der mittels Multiplex-PCR erzeugten Targets mit dem CyanoArray	61
3.2.6	Spezielle Untersuchungen: Einsetzbarkeit von Random-Priming und Nick-Translation zur Fluoreszenzmarkierung	65
3.2.6.1	Random-Priming	65
3.2.6.2	Nick-Translation	67
3.2.7	Anwendung des CyanoArrays in Umweltproben	67
3.2.7.1	Einfluß der DNA-Extraktion auf Targetvorbereitung	69
3.2.7.2	Hybridisierungsergebnisse der Umweltproben	69
4	Diskussion	71
4.1	Entwicklung des CyanoSensors zur Detektion des bioverfügbaren Phosphors	71
4.1.1	Einfluß der Immobilisierung auf den Reporterassay	72

4.1.1.1	Immobilisierungsmatrizes	72
4.1.1.2	Optimierung der Immobilisierung	72
4.1.2	Optimierung des CyanoSensors	73
4.1.3	Charakterisierung des CyanoSensors	75
4.1.4	Vergleich des CyanoSensors mit der Flüssigkultur als Sensor	77
4.2	Entwicklung des CyanoArrays zur Detektion von <i>Microcystis</i> und <i>mcy</i>	78
4.2.1	Entwurf der Sonden	78
4.2.2	Optimierung der Targetvorbereitung	81
4.2.3	Bewertung des CyanoArrays	83
4.2.3.1	Genotypisierung	83
4.2.3.2	Detektion von <i>mcy</i>	84
4.2.3.3	Anwendung des CyanoArrays	85
5	Zusammenfassung und Ausblick	87
A	Anhang	89
A.1	Medien und Lösungen	89
A.2	Abkürzungen	93
A.3	Aufbau der Beleuchtungseinrichtung	94
B	Literaturverzeichnis	95

Kapitel 1

Einleitung

Bei der Überwachung in der Produktion von Lebensmitteln und Medikamenten, in der Umweltanalytik und in der klinischen Diagnostik hat die empfindliche, selektive und präzise Bestimmung einer Vielzahl von Verbindungen eine große Bedeutung. Durch die Fortschritte in den instrumentellen analytischen Methoden, z. B. der Gaschromatographie, der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, der Massenspektrometrie und der Atomabsorptionsspektrometrie, konnte eine hohe Selektivität in der Spurenanalytik erzielt werden. Sie sind aber oft auf spezielle Laboreinrichtungen angewiesen, erfordern einen hohen Aufwand und sind deshalb in Vor-Ort-Messungen nur bedingt einsetzbar. Daher liegt ein Schwerpunkt der analytischen Forschungsarbeit auf der Entwicklung einfach zu bedienender Methoden mit vergleichbarer Selektivität und Empfindlichkeit.

Mit biologischen Elementen wie Antikörpern, Rezeptoren und Enzymen lassen sich *in vitro* Testsysteme, teilweise in für Felduntersuchungen tauglichem Format, entwickeln. Mit ganzen Zellen können *in vivo* Detektionssysteme entwickelt werden. Dabei können die Entwicklungs- und Herstellungskosten aufgrund des Verzichts auf eine aufwendige Proteinisolation und -reinigung wesentlich gesenkt werden. Ein *in vivo* Testsystem ist in der Regel stark abhängig vom physiologischen Zustand der verwendeten Zellen. Dies scheint zunächst als Nachteil solcher *in vivo* Detektionssysteme. Doch genau davon kann man in der Analytik Gebrauch machen, um aus den Meßdaten Aussagen über die Wirkung der zu detektierenden Substanz in einem lebenden System zu treffen, was häufig eine wesentlichere Aussage als eine reine Mengenangabe von Analyten ist. Dies ist mittels chemischer Methoden nicht möglich.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von *in vivo* und *in vitro* Assays auf der molekularbiologischen Grundlage.

1.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien gehören, wie Funde in Stromatolithen aus dem Präkambrium zeigen, zu den ältesten Lebewesen auf der Erde (Schopf und Packer 1987). Sie können sauerstoffentwickelnde Photosynthese betreiben und verfügen über die dafür erforderlichen Pigmente,

die den Cyanobakterien auch ihre Farbe geben. Aus diesen Gründen wurden früher Cyanobakterien dem Pflanzenreich zugeordnet und sind historisch bedingt noch bis heute unter den Namen Blaualgen oder Blaugrünalgen bekannt. Aus ihrer prokaryotischen Struktur sowie cytologischen und genetischen Beschaffenheit lassen sich Cyanobakterien aus phylogenetischer Sicht eher zu den Bakterien zählen (Rippka et al. 1979).

Die ökologische Diversität der Cyanobakterien ist sehr bemerkenswert. Obwohl die meisten in Gewässern leben, tauchen sie auch in terrestrischen Nischen auf. Selbst in Habitaten mit extremen Bedingungen, z. B. in Thermalquellen, Erdkrusten in der Wüste und Gletschereis, sind sie anzutreffen (Whitton und Potts 2000). Dies läßt auf eine hohe Anpassungsfähigkeit der Cyanobakterien schließen und erklärt ihren Erfolg in der Evolutionsgeschichte. Cyanobakterien kommen außerdem häufig vergesellschaftet mit anderen Lebewesen vor, wie Bakterien, Pilzen, Algen, Invertebraten und höheren Pflanzen. Dabei liefern die Cyanobakterien im allgemeinen gebundenen Stickstoff und oft auch organischen Kohlenstoff, während der Partner für die essentiellen Mineralstoffe und CO₂ sorgt, so daß eine (pseudo-)symbiotische Gemeinschaft vorliegt.

Außer der Photosynthese verfügen viele Cyanobakterien über die wichtige Fähigkeit, molekularen Stickstoff zu fixieren. Daher wurden Cyanobakterien in der Landwirtschaft als Düngemittel eingesetzt (Padhy 1985). Abgesehen von einigen sogenannten nichtheterocystischen diazotrophen Cyanobakterien, die über spezielle physiologische Strategien für die N₂-Fixierung unter aeroben Bedingungen verfügen, findet in anderen Cyanobakterien die N₂-Fixierung im Kompartiment Heterocyst unter Ausschluß von Sauerstoff statt (Stal 2000). In der Umweltwirtschaft wurden Cyanobakterien sogar als mögliche „Sonnenenergieumwandler“ zur Gewinnung von molekularem Wasserstoff vorgestellt, da sie im Gegensatz zu Pflanzen die Fähigkeit zur gleichzeitigen Entwicklung von O₂ und H₂ besitzen (Kentemnich et al. 1990).

Cyanobakterien werden seit alters her auch als Nahrungsquelle für Tiere und Menschen verwendet. Am bekanntesten ist die planktonische Species *Spirulina lantensis*, die traditionell zum Nahrungszweck verwendet wurde und immer noch ein Bestandteil der asiatischen Küche ist (Carmichael 1994). Heute genießen Material und Präparate aus solchen „Algen“ große Beliebtheit als Schönheits- und Gesundheitsmittel. Neben solchen Präparaten, deren Wirkung noch nicht vollständig geklärt und daher umstritten ist, wurden allerdings viele biologisch aktive Substanzen mit antimikrobiellen, cytotoxischen, antineoplastischen, antiviralen, herzwirksamen, immunmodulatorischen, wachstumsstimulierenden und spezifisch enzymaktivitätshemmenden Wirkungen in cyanobakteriellen Metaboliten gefunden (Carmichael 1992; Namikoschi und Rinehart 1996). So dienen Cyanobakterien als Quelle neuer biogener Wirkstoffe in der Pharmakologie.

1.1.1 Cyanobakterielle Blüten

In der Natur können sich manche Cyanobakterien (Tab. 1.1) im geeigneten physiologischen Zustand und unter günstigen Umweltbedingungen, vor allem in warmen, eutrophen Gewässern mit hoher Beleuchtung und stabilem Wetter, massenhaft vermehren (Carmichael 1994). Aufgrund ihrer zellulären Gasvakuolen treiben sie als Schaum oder Schlieren an der Wasseroberfläche und sind als Wasser- bzw. Algenblüten bekannt.

Tab. 1.1: Hauptvertreter der wasserblütenbildenden Cyanobakterien (Oliver und Ganf 2000).

Gattung	N ₂ -Fixierung	Familie	Order
<i>Anabaena</i>	+	Nostocaceae	Nostocales
<i>Anabaenopsis</i>	+	Nostocaceae	Nostocales
<i>Aphanizomenon</i>	+	Nostocaceae	Nostocales
<i>Nodularia</i>	+	Nostocaceae	Nostocales
<i>Cylindrospermopsis</i>	+	Nostocaceae	Nostocales
<i>Gloeotrichia</i>	+	Rivulariaceae	Nostocales
<i>Planktothrix</i>	+ / -	Oscillatoriaceae	Oscillatoriales
<i>Spirulina</i>	-	Oscillatoriaceae	Oscillatoriales
<i>Microcystis</i>	-	Chroococcaceae	Chroococcales
<i>Gomphosphaeria</i>	-	Chroococcaceae	Chroococcales
<i>Coelosphaerium</i>	-	Chroococcaceae	Chroococcales

Wegen der negativen Begleiterscheinungen, wie des modrigen Geruchs und grasartigen Geschmacks, beeinträchtigen Wasserblüten in Trinkwasserreservoirien die Wasserqualität und erhöhen die Aufbereitungskosten. Aufgrund des unangenehmen Kontakts wird der Nutzungswert eines wasserblütenhaltigen Gewässers in der Freizeitaktivität wesentlich vermindert. Die zunehmende Sauerstoffzehrung, die durch eine Massenvermehrung von Cyanobakterien und Algen als Folge der Eutrophierung verursacht wird, ist häufig die Ursache des Umkippen eines Gewässers, das dann zum Massensterben von Fischen führt. Das in den letzten Jahrzehnten zunehmende Auftreten der cyanobakteriellen Blüten, die ihrerseits oft mit toxischen Wirkungen verbunden sind, sorgte für die Schlagzeilen in der Öffentlichkeit (Gorham und Carmichael 1988; Falconer 1993; Carmichael 1994) und verlangt nach einer besseren Kenntnis ihrer Entstehung.

Bereits Anfang der sechziger Jahren haben Ökologen und Limnologen den Zusammenhang der Wasserblütenbildung mit der zunehmenden Nährstofffracht erkannt (Sakamoto 1966; Vollenweider 1968). In Modellversuchen und langjährigen Felduntersuchungen wurde beobachtet, daß eine erhöhte Phosphatfracht signifikante Veränderungen in der Zusammensetzung von Phytoplanktonen zugunsten der blütenbildenden Cyanobakterien auslöst (Redfield 1958; Vollenweider 1968; Dillon und Rigler 1975; Klapper 1992; Stabel und Kleiner 1995; Armstrong 1999). Wegen der niedrigen Löslichkeit vieler Phosphatsalze ist Phosphat, im weiteren Sinne Phosphor, oft ein limitierender Faktor in einem aquatischen Ökosystem. Im Vergleich zu anderen Planktonen verfügen einigen cyanobakterielle Gattungen über eine höhere Aufnahmefähigkeit und Speicherkapazität sowie einen niedrigen Schwellenwert von verwertbarem Phosphor mit der Folge, daß sie hinsichtlich des Wachstums beim limitierten Phosphorangebot konkurrenzfähiger sind (Ganf und Oliver 1982; Kromkamp et al. 1989). Zusätzlich können manche Cyanobakterien den lebensnotwendigen Stickstoff in Form von Cyanophycin und in Phycocyanin speichern, was ihre Konkurrenzfähigkeit noch einmal verstärkt (Kromkamp 1987). Im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen liegt der Vorteil von Cyanobakterien mit Gasvakuolen in dieser zellulären Einrichtung. Sie können durch Veränderung ihrer Gasvakuolen ihre vertikale Position im Gewässer ändern und schweben nach der Nährstoffaufnahme aus nährstoffreichen Sedimenten oder tieferen Schichten wieder an die Oberfläche, wo sie die für das Wachstum bevorzugten Temperatur- und Lichtbedingungen vorfinden. Die Bildung der Gasvakuolen und die Auftriebsregulation werden ihrerseits wiederum durch die Energie- und Nährstoffzufuhr reguliert (Oliver und Ganf 2000).

In Abb. 1.1 werden die Hauptfaktoren in der Wasserblütenentwicklung und ihre komplexen Wechselwirkungen miteinander aus zahlreichen Langzeitstudien zusammengefaßt (Oliver und Ganf 2000). Wie sie verdeutlicht, ist die Entstehung der Wasserblüten sehr dynamisch und vielfältig und wurde bislang noch nicht bis ins Detail geklärt. Die in Abb. 1.1 angegebenen Schwellenwerte zur Diskriminierung des bakteriellen Wachstums dürfen nur als aus bisherigen Kenntnissen abgeleitete Hypothese betrachtet werden und dienen in keiner Weise als ein Modell zur Vorhersage der Wasserblütenentstehung. Laut den Ergebnissen verschiedener Studien steht im Mittelpunkt der Wasserblütenentstehung das Phosphorangebot. Obwohl limnologische und ökologische Untersuchungen viele Rechenungsmodelle zur Abschätzung der cyanobakteriellen Biomassenentwicklung anhand des Gehalts an Phosphor oder des Verhältnisses zwischen Konzentrationen von Phosphor und Stickstoff lieferten, gibt es kontroverse Aussagen in den unterschiedlichen Studien (Smith 1982; Smith 1983; Harris 1986; Pick und Lean 1987; Trimbee und Prepas 1987; Elser et al. 1990; Jensen et al. 1994; Scheffer et al. 1997). Vermutlich geht es eher darum, welcher Faktor in einem Gewässer tatsächlich für das cyanobakterielle Wachstum limitierend vorliegt (Horne und Commins 1987; Reynolds 1992) und ob der äußere Zustand bei ausreichendem externen oder zellulären Nährstoffangebot die Zunahme von cyanobakterieller Biomasse fördert (Lewis 1978).

1.1.2 Cyanotoxine

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts hat Francis über Tierversgiftung durch Aufnahme von cyanobakterienhaltigem Wasser in Südaustralien berichtet (Francis 1878). Inzwischen wurden toxischen Substanzen mit hepatotoxischen, neurotoxischen, gastrointestinal störenden, atmungsbeschwerdenden und hautirritierenden Wirkungen von Cyanobakterien gefunden. In Tab. 1.2 werden die Eigenschaften der Cyanotoxine und ihrer Produzenten aufgelistet. Wie Tab. 1.2 und Tab. 1.1 zeigen, treten die meisten Produzenten der Cyanotoxine auch in Wasserblüten auf. Es ist daher nicht verwunderlich, daß in der Öffentlichkeit Wasserblüten eine nicht unbedingt kausale toxische Wirkung assoziieren. Wegen der möglichen toxischen Wirkungen sind die Einnahme von wasserblütenhaltigem Wasser und der Verzehr von cyanobakteriellen Präparaten nicht unbedenklich (Carmichael 1994).

In der Natur produziert eine gesunde cyanobakterielle Population selten extrazelluläre Toxine. Die zellulär gebundene Toxinkonzentration kann jedoch einige Größenordnung höher sein als die Toxinkonzentration in Gewässern. Während des Alterungsprozesses werden die Toxine aus den toten, lysierten Zellen in die Umwelt freigesetzt. Diese Kenntnisse sind besonders wichtig in der Trinkwasseraufbereitung, denn oft werden unsachgemäß Maßnahmen zur Beseitigung der Wasserblüten getroffen, die durch Verwendung von Algiziden wie Kupfersulfat zum Absterben der Cyanobakterien mit der Folge erhöhter Toxinkonzentration im Wasser führen. Die Toxinbildung wird von Umweltfaktoren, dem Nährstoffangebot und dem physiologischen Zustand der Zellen kontrolliert, die bisher keine allgemeine Regel zu kennen scheint. Da viele Bakterien gegen Cyanotoxine resistent sind, ist noch nicht klar, ob sich Cyanobakterien tatsächlich mit Hilfe ihrer Toxine ein Milieu zum Überleben schaffen können und welche biologische Funktionen die Cyanotoxine überhaupt haben (Sivonen und Jones 1999).

Tab. 1.2: Eigenschaften und Produzenten der Cyanotoxine (Sivonen und Jones 1999).

Toxinklasse ^a	Zielorgan in Säugetieren	Cyanobakteriellen Gattung ^b
<i>Zyklische Polypeptide</i>		
Microcystin	Leber	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis</i>
Nodularin	Leber	<i>Nodularia</i>
<i>Alkaloide</i>		
Anatoxin-a	Synapsen	<i>Anabaena, Planktothrix, Anabaenopsis</i>
Anatoxin-a(S)	Synapsen	<i>Anabaena</i>
Aplysiatoxin	Haut	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix</i>
Cylindrospermopsin	Leber ^c	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Lyngbyatoxin-a	Haut, Magen-Darm-Trakt	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxin	Axone	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
<i>Lipopolysaccharide</i>		
LPS	potentielle reizende Wirkung auf alle kontaktierten Gewebe	alle

^aViele Varianten können innerhalb einer toxischen Verbindungsklasse vorkommen.

^bDie Toxine werden nicht von allen Arten innerhalb einer cyanobakteriellen Gattung produziert.

^cDie ganzen Zellen der toxischen Spezies können zur Schädigung anderer Organe und Gewebe, einschließlich Nieren und Lymphsystem, führen.

1.1.2.1 Microcystine und Microcystin-Synthetase

Unter allen toxischen Verbindungen aus Cyanobakterien sind die hepatotoxischen Microcystine die am weitesten verbreiteten und am häufigsten gefundenen Cyanotoxine. Diese Toxine wurden zunächst aus *Microcystis aeruginosa* isoliert und nach dieser Spezies benannt. Die erste chemische Struktur von Microcystinen, ein zyklisches Heptapeptid, wurde Anfang der achtziger Jahre aufgeklärt. Inzwischen wurden mehr als 60 Varianten identifiziert. Alle verfügen über drei invariable D-Aminosäuren (D-Alanin, D-erythro- β -Methylasparaginsäure (MeAsp) und D-Glutaminsäure), zwei variable L-Aminosäuren und zwei ungewöhnliche Aminosäuren, 3-Amino-O-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-diensäure (Adda) und N-Methyl-dehydroalanin (Mdha). In allen invariablen Aminosäuren wurden strukturelle Variationen gefunden, vor allem Methylierung in MeAsp und Mdha sowie Isomeren in der Seitenkette von Adda. Ihre allgemeine Struktur, cyclo-(D-Alanin¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glutamat⁶-Mdha⁷), ist in Abb. 1.2 dargestellt. Je nach den variablen Aminosäuren werden die Microcystine benannt. So enthält beispielsweise Microcystin-LR ein L-Leucin (L) in der Position 2 und ein L-Arginin (R) in der Position 4. Ein toxischer Stamm kann unterschiedliche Varianten von Microcystinen bilden. Meistens dominieren allerdings nur ein oder zwei Verbindungen in einem Stamm (Sivonen und Jones 1999).

Neben *Microcystis* produzieren noch einige andere cyanobakterielle Gattungen Microcystine (Tab. 1.2). *Microcystis* ist jedoch der weitverbreitetste und überall vorkommende Erzeuger dieser Hepatotoxine.

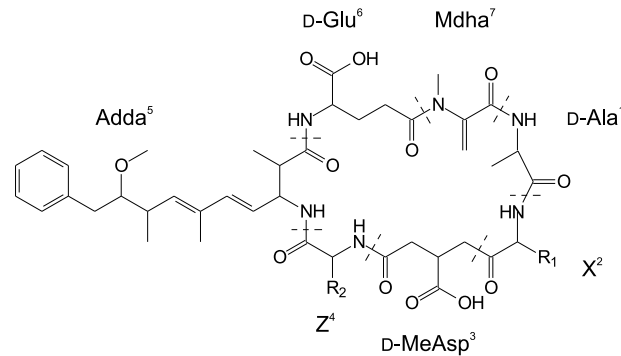


Abb. 1.2: Allgemeine Struktur der Microcystine.

Microcystine sind extrem stabil gegen chemische Hydrolyse sowie Oxidation bei niedrigen pH-Werten. Selbst nach Kochen bleibt ihr toxisches Potential bestehen. In natürlicher Umgebung und bei Dunkelheit bleiben sie bis zu mehrere Monate oder Jahre stabil. Schneller Abbau erfolgt nur unter extremen Bedingungen wie bei pH = 6 und hoher Temperatur, die in der Natur nicht anzutreffen sind. Von der Tatsache, daß sie durch starke Oxidationsmittel wie Ozon oder intensive UV-Bestrahlung abgebaut werden, wird in der Wasseraufbereitung Gebrauch gemacht. In der Natur unterliegen Microcystine im Sonnenlicht einer langsamen Photodegradation. Hinsichtlich der Biodegradation sind Microcystine stabil gegen viele eukaryotische und bakterielle Peptidasen. Es gibt jedoch Berichte von in Gewässern vorkommenden Bakterien, die Microcystine abbauen können (Sivonen und Jones 1999).

Außer einigen Varianten mit hydrophoben Substituenten sind Microcystine wasserlöslich. Sie sind starke Inhibitoren der eukaryotischen Proteinphosphatase 1 und 2A (MacKintosh et al. 1990; Honkanen et al. 1990). Die Hemmung beruht auf den Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenkette von Adda sowie der Glutamylcarboxylgruppe in Microcystinen mit dem katalytischen Zentrum der Proteinphosphatasen. Ferner zeigten Untersuchungen, daß der Mdma kovalent an Cys273 der Proteinphosphatase 1 bindet (MacKintosh et al. 1995). Da Proteinphosphatasen in der Zellregulation involviert sind, liegt die biochemische Konsequenz der durch Microcystine verursachten Inhibition in der Zunahme der phosphorylierten Proteine und demzufolge in der Störung der durch Proteinphosphatasen und -kinasen kontrollierten Regulation.

Microcystine werden durch das Gallensäuretransportsystem aktiv in die Hepatocyten transportiert. Der akute Tod wurde sowohl bei Tieren als auch bei Menschen dokumentiert und tritt gewöhnlich innerhalb von 1–3 Stunden ein (Beasley et al. 1989; Jochimsen et al. 1998). Vermutlich werden dabei die Lebersinusoide durch Hyperphosphorylierung von Cytokeratin zersetzt, und dadurch stauen sich erhebliche Mengen an Blut in der Leber mit der Folge eines hämorrhagischen Schocks (Eriksson et al. 1990; Falconer und Yeung 1992; Runnegar et al. 1993). Abhängig von variablen Aminosäuren und anderen strukturellen Varianten in invariablen Aminosäuren variiert die Toxizität dieser Verbindungen.

dungen stark. Der LD_{50} -Wert der meisten Microcystine liegt zwischen $(30-50) \mu\text{g}$ pro kg Körpergewicht in Mäusen (Sivonen und Jones 1999). Durch direkten Kontakt mit oder das Schlucken von belasteten Gewässern lösen Microcystine bei Menschen in leichten Fällen Diarrhöe, Hautreizung und Erbrechen aus. Eine chronische Aufnahme von Microcystinen in subletalen Dosen induziert in Nagetieren die Bildung des hepatozellulären Karzinoms und bei Menschen Leberkrebs (Nishiwaki-Matsushima et al. 1992; Yu 1989; Yu 1995).

Das niedrige Molekulargewicht sowie das Auftreten von ungewöhnlichen und nichtproteinogenen Aminosäuren in Microcystinen sind die Anzeichen dafür, daß sie nicht nach dem üblichen Schema der ribosomalen Proteinsynthese gebildet sind. Die vielseitigen Modifikationen innerhalb einer Aminosäure in unterschiedlichen Varianten von Microcystinen sprechen auch für eine nichtribosomale Biosynthese. Eine nichtribosomale Polypeptidbiosynthese läuft an sogenannten nichtribosomalen Polypeptid-Synthetasen (NRPS) ab. Sie sind aus multifunktionellen Modulen zusammengesetzte Proteinkomplexe. Jedes Modul besteht wiederum aus enzymatischen Domänen, die jeweils für die Erkennung einer speziellen Aminosäure zuständig sind, sowie für deren Modifikationen und Verknüpfung mit der nächsten Aminosäure (Marahiel et al. 1997; Kleinkauf und von Döhren 1996). In Abb. 1.3

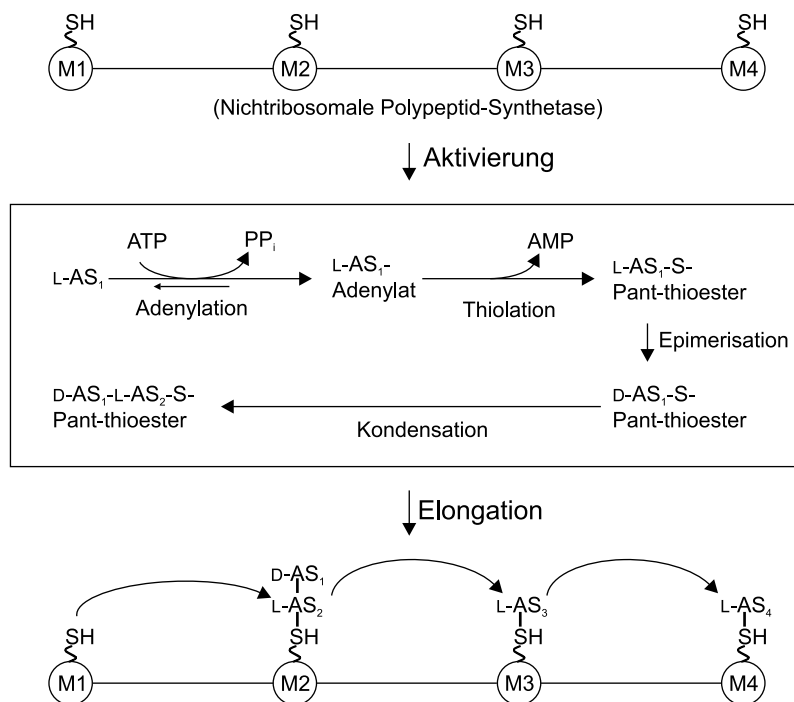


Abb. 1.3: Mechanismen der nichtribosomalen Peptidbiosynthese. Unter Verwendung von ATP werden zunächst die einzelnen Aminosäuren in Form von Aminoacyladenylaten aktiviert. Durch Bindung der Aminoacyladenylate an aminosäurespezifische Bindungsstellen eines Moduls und Knüpfung von Thioesterbindung werden die aktivierten Aminosäuren für die weitere Verknüpfung vorbereitet. Spezielle Domänen in einem Modul ermöglichen Modifikationen wie Epimerisierung oder Methylierung der gebundenen Aminosäuren. Durch einen 4'-Phosphopantothein-Rest mit der terminalen SH-Gruppe werden die gebundenen Aminosäuren sequentiell von einer Bindungsstelle auf die nächste unter Bildung einer Peptidbindung übertragen. AS: Aminosäure; M: Modul. In Anlehnung an Marahiel et al. (1997).

wird das Prinzip einer nichtribosomalen Peptidsynthese dargestellt. Die räumliche Organisation der Module in einer NRPS bestimmt folglich die Struktur der wachsenden Peptidkette. Nach Erreichen der in der NRPS vorprogrammierten Kettenlänge erfolgt der Kettenabbruch, wobei nachfolgende Reaktionen wie Zyklisierung und Isomerisierung möglich sind.

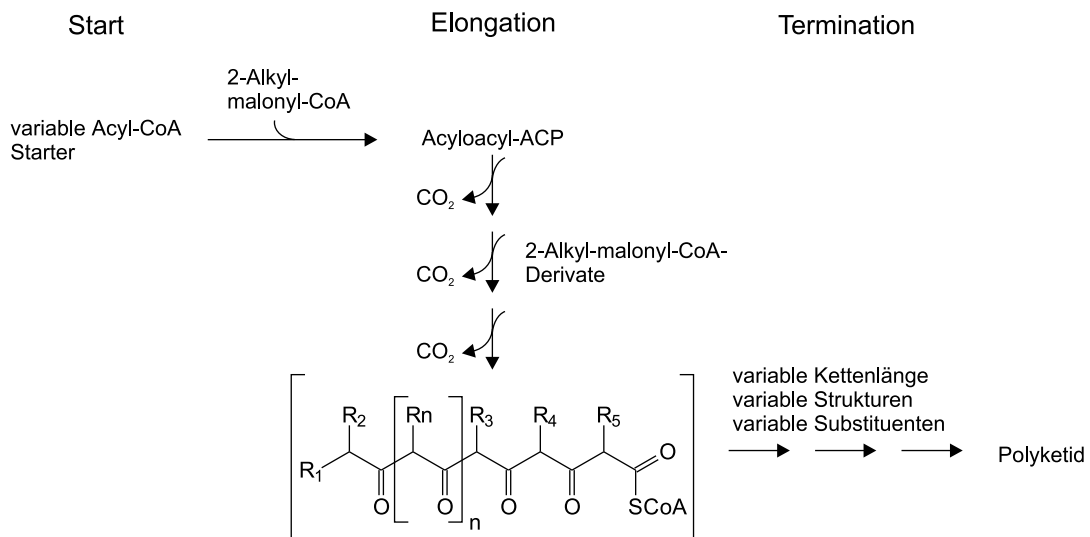


Abb. 1.4: Mechanismen der Polyketidbiosynthese.

Die Untersuchungsergebnisse von Moore et al. zeigten, daß Adda in Microcystin-LR aus der Aminosäure Phenylalanin und vier Acetatmolekülen stammt (Moore et al. 1991). Aus dieser Entdeckung ließ sich postulieren, daß an der Biosynthese von Microcystinen noch ein anderer Multienzymkomplex beteiligt ist, nämlich die Polyketid-Synthase (PKS). Die Polyketidbiosynthese läuft analog zur Fettsäuresynthese an der PKS ab. Dabei entstehen durch sequentielle Kondensationschritte der kurzkettigen Fettsäuren, wie Essigsäure, Propionsäure, Isobutylsäure und Malonsäure, zunächst hypothetisch „Polyketo“-Verbindungen (Abb. 1.4), die chemisch nicht stabil sind und nach denen die durch diesen Biosyntheseweg entstandenen Substanzen als „Polyketid“ genannt werden.

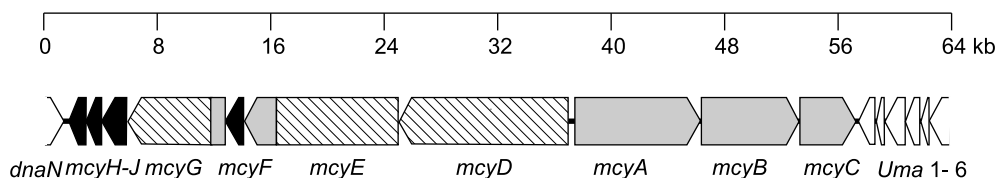


Abb. 1.5: Strukturelle Organisation des Operons von Microcystin-Synthetase. Die Transkriptionsrichtungen sowie die aus den Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Größen der ORFs sind angegeben. ORFs mit homologen Sequenzen zu NRPS bzw. PKS sind grau und schraffiert dargestellt. ORFs, die vermutlich als Kettenabbruch fungieren, sind schwarz. Andere nicht zur Microcystin-Synthetase gehörende ORFs sind weiß (Tillett et al. 2000).

NRPS und PKS verfügen jeweils über hoch konservierte Bereiche in ihren funktionellen Modulen und kommen in Biosynthesen sekundärer Metaboliten in Bakterien nicht selten vor (Marahiel et al. 1997; Reynolds 1998). Die jüngsten Daten von Sequenzanalyse und dem Homologievergleich zeigten, daß die Biosynthese der Microcystine in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 und K-139 tatsächlich ein integriertes System von PKS und NRPS ist (Abb. 1.5) (Tillett et al. 2000; Nishizawa et al. 2000). Zusammen mit den Ergebnissen der chemischen Analysen von Moore et al. (1991) haben Tillett et al. ein Modell für die Synthese von Adda postuliert (Tillett et al. 2000). Aus den Untersuchungsergebnissen mit Mutanten, deren Microcystin-Synthetase von Inserts inaktiviert ist, wurde in derselben Arbeit einen möglichen Biosyntheseweg von Microcystin-LR vorgestellt (Abb. 1.6).

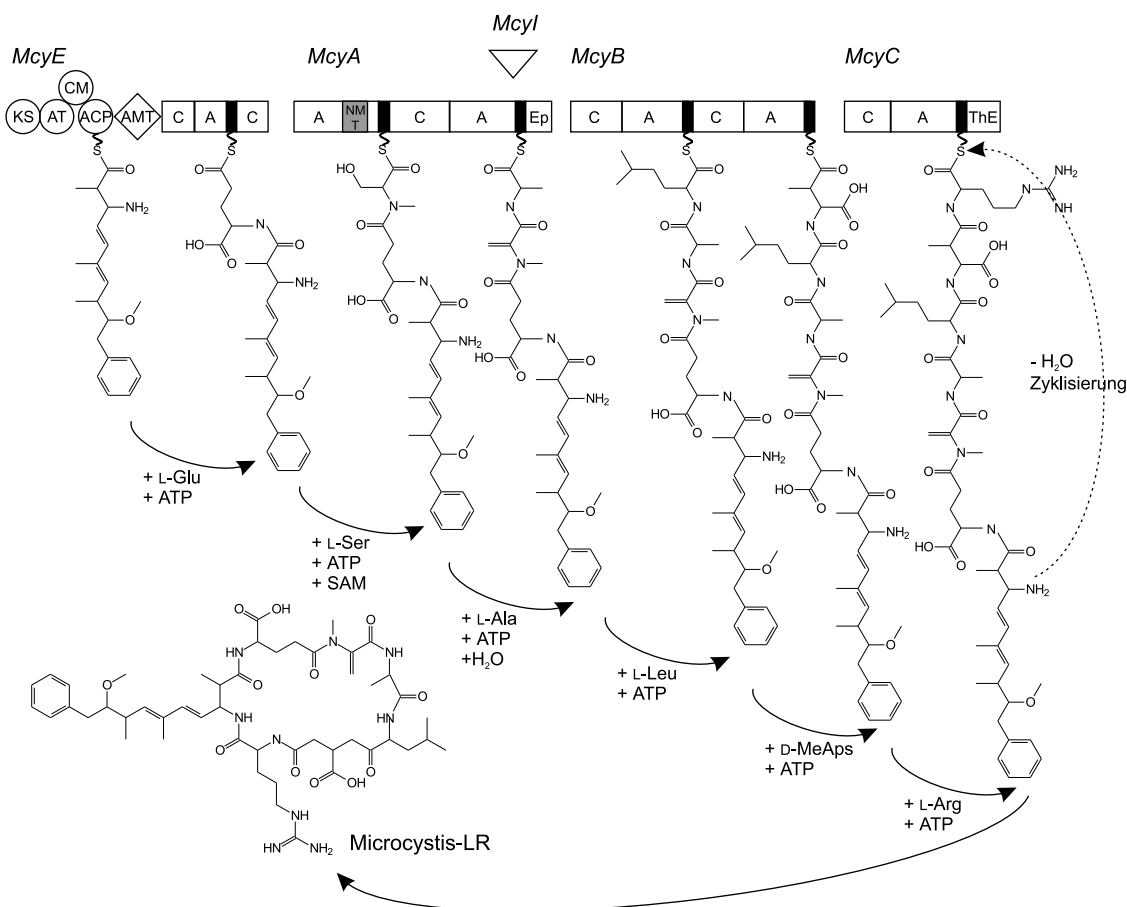


Abb. 1.6: Modell für die Biosynthese von Microcystin-LR und die postulierten funktionellen Domänen in McyE, McyA, McyB und McyC. Man nimmt an, daß Adda zunächst durch McyGDE aus einem Phenylacetat und vier Malonyl-CoAs synthetisiert wird. Die Reihenfolge der Aktivierung und Kondensation der Aminosäuren ist vermutlich: L-Z-Adda, L-Glutamat, L-Methylserin, D-Alanin, L-Leucin, D-Methylaspartat, L-Arginin und Zyklisierung. Jeder Kreis bzw. jedes Rechteck bedeutet eine enzymatische Domäne in PKS bzw. NRPS. Die mutmaßliche Domäne der Aminotransferase (AMT) wird als Raute gekennzeichnet. Die Stelle, wo McyI die Kettenabbruchsaktivität ausübt, wird mit einem umgekehrten Dreieck gekennzeichnet. Die Thiolationsdomäne in NRPS ist schwarz markiert. KS: β -Ketoacyl-Synthetase; AT: Acyltransferase; ACP: Acyl-Carrier-Protein; KR: Ketoacyl-Reduktase; DH: Dehydratase; CM: C-Methyltransferase; A: Aminoacyl-Adenylation; C: Kondensation; NMT: N-Methyltransferase; Ep: Epimerisation; ThE: Thioesterase. In Anlehnung an Tillett et al. (2000).

In Feld- und Laborversuchen wurde gezeigt, daß viele Faktoren wie Zellalter, Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit, Licht, pH-Wert und Salzgehalt Einfluß auf die Produktion der Microcystine ausüben (Watanabe und Oishi 1985; Wicks und Thiel 1990; Lukac und Aegerter 1993; Utkilen und Gjølme 1995). Dabei wurden regionale, jahreszeitbedingte, räumliche, zeitliche und stammabhängige Variationen berichtet. Bezüglich der Bildung der Microcystine gibt es bislang keine kausale Folge von jedem einzelnen Faktor. Die Entdeckung der Microcystin-Synthetase und die Entschlüsselung ihres Gens (*mcy*) ermöglichen die Charakterisierung der toxischen und nicht toxischen *Microcystis*-Stämme auf der genetischen Ebene und eine Einsicht in der Transkriptionsregulation von *mcy*. Die Forschungsergebnisse zeigten, daß alle microcystinproduzierenden *Microcystis*-Stämme die in *mcy* hoch konservierten Fragmente enthalten. Dagegen können die microcystinnichtproduzierenden *Microcystis*-Stämme entweder über kein *mcy*-Gen verfügen oder die konservierten Fragmente des *mcy*-Gens doch besitzen. Aus welchem Grund die zuletzt genannten *Microcystis*-Stämme keine Microcystine bilden und ob sie unter Umständen Microcystine doch synthetisieren, ist noch nicht bekannt (Nishizawa et al. 1999; Tillett et al. 2001). Auf der molekularen Ebene wurde gezeigt, daß die Transkription von *mcy* sowohl von der Quantität als auch von der Qualität der Beleuchtung reguliert wird. Eine Korrelation zwischen dem Transkript von *mcy* und dem zellulären Gehalt an Microcystinen wurde jedoch nicht nachgewiesen (Kaebnick et al. 2000).

1.2 Mikrobielle Reporterassays

Damit ein Mikroorganismus als ein analytisches Werkzeug funktionieren kann, muß eine detektierbare Reaktion des Mikroorganismus auf den Analyten zur Verfügung stehen. Für einen mikrobiellen Reporterassay müssen im Reporterstamm zwei genetische Elemente vorhanden sein: ein sensorisches und ein sogenanntes Reporterelement. Das erste nimmt die Änderung des Analyten in der Umwelt wahr und schaltet das letztere an, das ein meßbares Signal aussendet. Das Reporterelement besteht typischerweise aus einem Gen oder einer Gruppe von Genen, die Proteine kodieren, deren Anwesenheit oder Aktivität leicht zu bestimmen ist. Das sensorische Element ist oft die regulatorische Sequenz eines Gens, in den meisten Fällen der Promotor, der durch die Änderung der nachzuweisenden Analyten oder des Umwelteinflusses angesprochen und aktiviert werden kann. Ein nach diesem Prinzip (Abb. 1.7) konstruierter rekombinanter Mikroorganismus kann das Reporterprotein unter Kontrolle des Promotors exprimieren und als Sensor eingesetzt werden.

In der Umweltanalytik wurden viele mikrobielle Reporterassays unter Verwendung von entsprechenden Promotoren entwickelt. Ihre Anwendung liegt hauptsächlich in der Untersuchung der Umweltschadstoffe, wie Schwermetalle und organischer Lösungsmittel, sowie der Streßfaktoren und der Genotoxizität (Köhler et al. 2000). In Tab. 1.3 sind einige Beispiele aus den vielseitigen Anwendungsbereichen der mikrobiellen Reporterstämme dargestellt.

Neben β -Galactosidase, alkalischer Phosphatase und grünfluoreszierendem Protein (GFP) finden die Luziferase aus Leuchtbakterien oder Glühwürmchen wegen ihrer niedrigen Meßgrenze und Verträglichkeit in den Wirtszellen seit ihrer Entdeckung immer stärkere Anwendung als Reporterprotein in Reporterstämmen. Die bakterielle Luziferase katalysiert

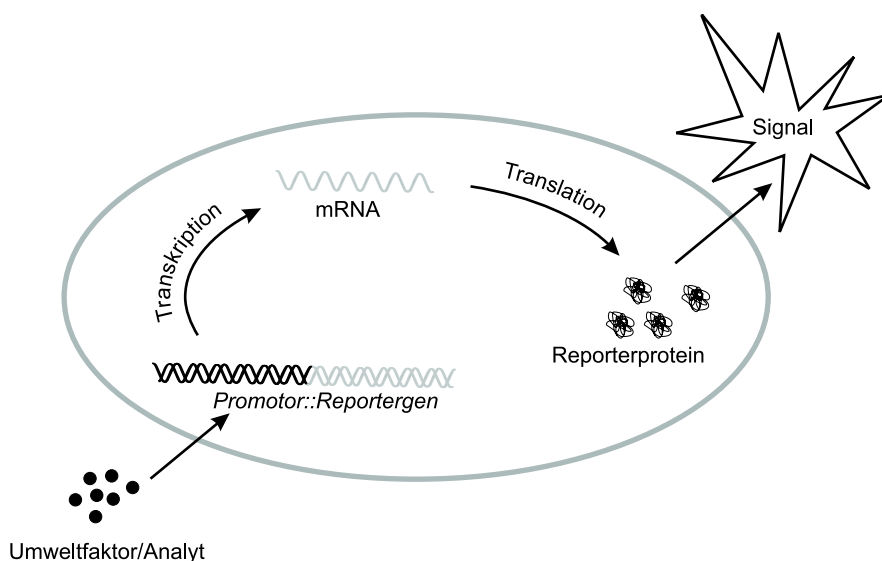
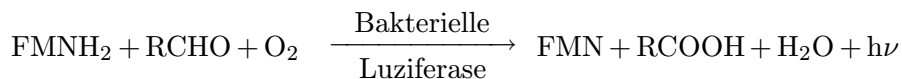


Abb. 1.7: Prinzip eines mikrobiellen Reporterassays.

die aerobe Oxidation des reduzierten Flavinmononukleotides (FMNH₂) und eines langkettigen Aldehyds (RCHO) zu Flavinmononukleotid (FMN) und der entsprechenden Carbonsäure (RCOOH), wobei die Energie als Licht bei 490 nm mit einer Quantenausbeute von etwa 0,1 freigesetzt wird.



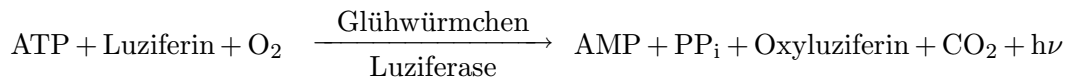
Die bakterielle Luziferase wird von den Genen *luxAB* des Luziferaseoperons kodiert und die Enzyme für die Synthese des Substrats, des Aldehyds, von den Genen *luxCDE* (Meighen und Dunlap 1993). Sollte ein Reporterstamm das ganze Operon *luxCDABE* enthalten, bedarf die Lumineszenzmessung keines Zusatzes vom Substrat.

Tab. 1.3: Beispiele der auf mikrobiellen Reportstämmen basierenden Assays.

Analyt	Promotor	Reporter	Wirtszellen	Ref.
Schwermetalle	<i>smt</i>	<i>lux</i>	<i>Synechococcus</i>	(Erbe et al. 1996)
Hg ²⁺	<i>mer</i>	<i>lux</i>	<i>E. coli</i>	(Selifonova et al. 1993)
PAK ^a	<i>nar</i>	<i>lux</i>	<i>Pseudomonas</i>	(Ford et al. 1999)
Stressfaktoren	<i>grpE, dnaK, lon</i>	<i>lux</i>	<i>E. coli</i>	(van Dyk et al. 1995)
	<i>oxyR, micF, katG'</i>	<i>lux</i>	<i>E. coli</i>	(Belkin et al. 1996)
	<i>rad54</i>	<i>gfp</i>	<i>Saccharomyces</i>	(Billinton et al. 1998)
Genotoxizität	<i>cda</i>	<i>lux</i>	<i>E. coli</i>	(Ptitsyn et al. 1997)
	<i>umu</i>	<i>lacZ</i>	<i>Salmonella</i>	(Oda et al. 1985)
	<i>sfi</i>	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	(Quillardet et al. 1982)

^aPAK: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

Die Luziferase aus Glühwürmchen wird durch das Gen *luc* kodiert. Ihre sauerstoffabhängige Biolumineszenz beruht auf dem Energietransfer von ATP auf das Substrat, Luziferin, unter Bildung von Oxyluziferin, AMP, und CO₂, wobei eine Lichtemission bei 560 nm mit einer Quantenausbeute von 0,88 auftritt, die die höchste der bekannten Biolumineszenzreaktionen ist (Gould und Subramani 1988). Ein Nachteil der Verwendung der Luziferase aus Glühwürmchen in einem mikrobiellen Reporterassay ist der unentbehrliche Zusatz vom Substrat Luziferin, das wegen seiner negativen Ladung beim physiologischen pH-Wert schwer die Zellmembran durchdringen kann und daher der intrazellulär expremierten Luziferase nur bedingt zur Verfügung steht.



1.2.1 Regulation des Phosphorhaushalts in Cyanobakterien

Cyanobakterien, wie auch alle anderen Mikroorganismen, können Phosphor in Form von Polyphosphat intrazellulär speichern, das beim limitierten externen Phosphorangebot durch Polyphosphatase wieder freigesetzt wird und somit dem zellulären Wachstum zur Verfügung steht. In Cyanobakterien unter einer Phosphorlimitierung wird zusätzlich ihre Fähigkeit zur Aufnahme von externem Phosphor erhöht mit der Folge, daß nach Wiederherstellung des ausreichend verfügbaren externen Phosphors der zelluläre Gehalt an Phosphor höher sein kann als der durchschnittliche Wert im normalen Zustand (Sicko-Goad und Jensen 1976; Allen 1984; Riegman und Mur 1984). Dies ist das bekannte „Overplus“-Phänomen in Cyanobakterien.

Auf der molekularen Ebene geschieht die zunehmende Aufnahme von externem Phosphat durch die *de novo* Biosynthese von periplasmatischen Phosphatasen, die durch PO₄³⁻-Limitierung induziert wird. Aufgrund ihrer Aktivität können Cyanobakterien Phosphor aus gebunden Quellen gewinnen, z. B. aus organischen Phosphateestern in totem Biomaterial und Sedimenten, die Cyanobakterien bei ausreichendem Angebot von anorganischem Phosphat nicht verwerten können. Der regulatorische Mechanismus der periplasmatischen alkalischen Phosphatase PhoA in *Synechococcus* PCC 7942 gehört zum sogenannten Zwei-Komponenten-System der Signaltransduktion, in dem eine in der Zellmembran gebundene Sensor-Kinase die Änderung eines Umweltfaktors wahrnimmt und unter Verwendung von ATP das regulatorische Protein phosphoryliert. Dieses phosphorylierte regulatorische Protein aktiviert seinerseits die Transkription des entsprechenden Gens zur Modifikation der Genexpression als Antwort auf die Veränderungen des Umweltfaktors (Aiba et al. 1993; Nagaya et al. 1994). In der Transkriptionsregulation von *phoA* bindet das phosphorylierte regulatorische Protein SphR unter Phosphatlimitierung an zwei Stellen des Promotors von *phoA* (*PphoA*) und agiert als positive Kontrolle der Transkription (Nagaya et al. 1994). So ermöglichte die Verwendung von *PphoA* aus *S. PCC 7942* eine durch die Phosphatverfügbarkeit regulierte Genexpression in Mutanten von *Synechococcus* (Collier und Grossman 1994) sowie die Konstruktion des Reporterstamms für den Assay, der in dieser Arbeit beschrieben wird.

1.3 Oligonukleotid-Mikroarrays

Das Funktionsprinzip eines Oligonukleotid-Mikroarrays ähnelt herkömmlichen Hybridisierungstechniken der Molekularbiologie, wie den Northern- oder Southern-Blot-Hybridisierungen. Unter Hybridisierung werden die nichtkovalente Bindung zweier zueinander komplementärer Nukleinsäurestränge, die auf der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den heterozyklischen Basen der Nukleinsäuren beruht, und die dadurch entstandene Doppelhelix verstanden. Aufgrund der hohen Spezifität der Watson-Crick-Basenpaarung ist diese Bindung sequenzspezifisch. Ihre Stabilität kann jedoch durch die Temperatur, die Ionenstärke der Lösung und die Länge der Strängen beeinflusst werden, so daß selbst eine Doppelhelix mit Fehlpaarung stabil sein kann und die exakt komplementären Sequenzen trotz perfekter Basenpaarung auseinandergehen.

In der Hybridisierungstechnik werden als Sonden Nukleinsäuren bezeichnet, deren Sequenzen bekannt sind und mit denen die Anwesenheit der Targets detektiert wird. In der Nukleinsäure-Mikroarraytechnologie werden unmarkierte DNA- oder PNA-Oligomere sowie DNA-Fragmente als Sonden auf einem Trägermaterial in einem bekannten Muster immobilisiert, und die zu analysierenden Targets sind markierte DNA-Fragmente. Vor der Hybridisierung liegen die Sonden und die Targets als einzelsträngige Nukleinsäuren vor. Durch die Hybridisierung binden die komplementären Target- und Sondensequenzen über Wasserstoffbrücken miteinander. Mit Hilfe geeigneter Versuchsbedingungen kann erreicht werden, daß nur die Doppelhelices zwischen exakt komplementären Target- und Sondensequenzen stabil bleiben und anschließend detektiert werden können. Anhand des Hybridisierungsmusters kann eine Aussage über die Anwesenheit der Targets getroffen werden, die komplementär zu den Sonden mit positiven Hybridisierungssignalen sind (Abb. 1.8).

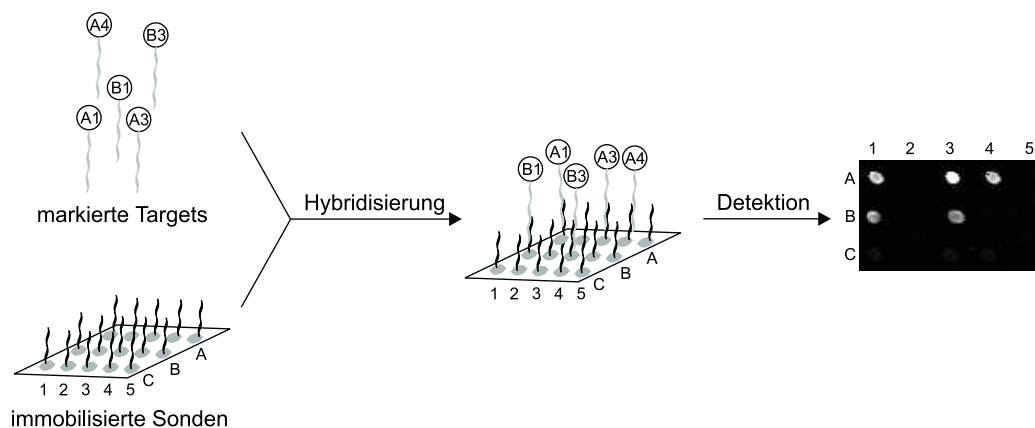


Abb. 1.8: Prinzip eines Nukleinsäure-Mikroarrays.

Zu dem erfolgreichen Weg vom herkömmlichen Southern-Blot auf Membran bis zu den neuartigen Mikroarrays mit bis zu mehreren Tausenden Sonden haben im wesentlichen die Verwendung nichtporöser Trägermaterialien, insbesondere Glasoberflächen, und die daraus resultierenden Möglichkeiten der Fluoreszenzdetektion und der Miniaturisierung beigetragen. Die Sonden, seien es Oligomere oder lange DNA-Fragmente, lassen sich mit automatisierten Dispenser- oder Plotter-Systemen auf modifizierten Glasoberflächen mit einer Dichte von bis zu 10 000 Sonden/cm² kovalent immobilisieren. Mittels photolithogra-

phischer oder naßchemischer *in situ* Oligonukleotid-Synthese auf Glasoberflächen stehen feiner strukturierte Mikroarrays mit noch höherer Erfassungskapazität zur Verfügung. In der Mikroarraytechnologie wurden die klassisch gebräuchlichen, hochempfindlichen, jedoch zeitaufwendig zu quantifizierenden und gesundheitsschädlichen radioaktiven Markierungen weitgehend durch die ebenfalls empfindlichen und einfach zu detektierenden Fluorophore abgelöst. Ein wesentlicher Vorteil der Fluoreszenzmarkierung ist die Verwendung von mit zwei oder mehr Fluorophoren markierten Targets in der Hybridisierung, die unabhängig voneinander detektiert und deren Intensität dadurch miteinander verglichen werden können, wenn ihre Spektren dies erlauben und der Fluoreszenz-Scanner mit entsprechenden Lichtfiltern ausgestaltet ist. Dies ist auch die Grundlage der Genexpressionsprofiling mittels Mikroarrays. Neben dem Mutationsscreening von Punktmutationen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) sowie Antibiotikumresistenzbildungen sind die Populationsgenetik und die Identifizierung von Organismen als weitere Anwendungsbereiche der Mikroarrays zu nennen (Niemeyer und Blohm 1999).

1.4 Methoden und Problematik der Klassifizierung von Bakterien

Konventionell wurden Bakterien nach der Isolierung und Züchtung im Labor anhand ihrer morphologischen, cytologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften klassifiziert. Da Cyanobakterien früher dem Pflanzenreich zugeordnet wurden, dominieren die morphologischen Eigenschaften in ihrer Taxonomie. Die entscheidenden Nuancen solcher diagnostischen Merkmale sind jedoch oft so gering, daß selbst geschulte Fachleute oft nicht zu eindeutigen Ergebnissen kommen. Probleme dieser Methode bestehen außerdem in der Abhängigkeit von der Kultivierung und Kultivierbarkeit der Mikroorganismen. Ferner verändert sich die zur Klassifizierung benutzte Beschaffenheit, sei es morphologisch, physiologisch oder biochemisch, oft während der Kultivierung im Labor (Amann et al. 1995; Otsuka et al. 2000). Infolgedessen kann die klassische Klassifizierungsmethode zu unkorrekter Definition der Taxa und fehlerhafter Beschreibung der Biodiversität in der Natur führen. In ihren neuen Untersuchungen kamen Komárek und Anagnostidis zu der Schlußfolgerung, daß die diagnostischen Eigenschaften von über 50 % der cyanobakteriellen Stämme mit denen der Taxa nicht übereinstimmen, denen die Stämme zugeordnet sind (Komárek und Anagnostidis 1989).

Die Entwicklungen molekularbiologischer Methoden wie der PCR und der Sequenzierung boten eine neue Einsicht in der bakteriellen Systematik. Die Gen-Sequenzen der ribosomalen RNA erwiesen sich als Schlüssel zu einer wissenschaftlich verwendbaren Phylogenie der Prokaryoten (Hugenholtz et al. 1998; Pace 1996; Pace 1997). Die heute weitgehend akzeptierte Phylogenie der Prokaryoten beruht auf den Gen-Sequenzen der 16S ribosomalen RNA, allgemein als 16S rDNA bezeichnet. Die 16S rDNA verfügt über hoch konservierte Bereiche, hoch variable Abschnitte sowie Sequenzen mittlerer Variabilität. Somit eignet sich die 16S rDNA sowohl zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums als auch als Biomarker in der Identifizierung von Mikroorganismen. Andere Sequenzen mit kleineren Datensätzen, wie die der 23S rDNA (Ludwig und Schleifer 1994) und die Sequenzen zwischen 16S und 23S rDNAs (Gürtler und Stanisich 1996; Lu et al. 1997; Otsuka et al. 1999; Iteman et al. 2000), finden auch Anwendungen.

Der Genotyp eines Mikroorganismus steht nicht immer in Einklang mit seiner taxonomischen Zugehörigkeit auf Basis der Phänotypen. Ein Phänotyp mit verschiedenen Genotypen oder umgekehrt wurden dokumentiert (Palinska et al. 1996; Otsuka et al. 1998; Otsuka et al. 2000). Der phylogenetische Stammbaum von Cyanobakterien, der mittels des Sequenzvergleichs von 16S rRNAs konstruiert wurde, zeigte die Uneinheitlichkeit zwischen der molekularbiologischen Klassifizierung und der klassischen Taxonomie (Giovannoni et al. 1988; Wilmotten 1994; Turner et al. 1999; Lyra et al. 2001). In der Praxis ermöglicht die Genotypisierung allerdings eine objektive und reproduzierbare Klassifizierung. Dabei werden die Sequenzen bestimmter Gene bzw. ihre An- oder Abwesenheit in einem Mikroorganismus zur Definition und Identifizierung einzelner Kolonien herangezogen, während sich die molekularbiologischen Methoden, wie die selektive PCR (Rudi et al. 1997; Tillett et al. 2001), RFLP (Scholin und Anderson 1996; Lyra et al. 1997), RAPD (Neilan et al. 1995), DGGE (Nübel et al. 1996) sowie *in situ* und *in vitro* Hybridisierung (Amann et al. 1995; Scholin et al. 1996; Ludwig et al. 1998; Behr et al. 2000; Rudi et al. 2000), vor allem zur Identifizierung bestimmter Mikroorganismen in ihrem natürlichen Zustand eignen. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur parallelen Verwendung einer Vielzahl von Sonden kann der Oligonukleotid-Mikroarray mehrere Mikroorganismen gleichzeitig identifizieren und bietet die beste Voraussetzung für die Charakterisierung einer mikrobiellen Gemeinschaft. Behr et al. und Rudi et al. haben mit ihren Ergebnissen den Beitrag der Hybridisierungstechnik zur Identifizierung von Enterokokken und Cyanobakterien in Umweltproben gezeigt (Behr et al. 2000; Rudi et al. 2000). Dies geschah zwar noch nicht im Mikroarray-Format, legte jedoch den Grundstein für die Anwendung von Oligonukleotid-Mikroarrays zur Charakterisierung der natürlichen Biodiversität.

1.4.1 *Microcystis*

Nach der klassischen Taxonomie gehört *Microcystis* zu den unizellulären Cyanobakterien. Sie verfügen über Gasvakuolen und betreiben keine N₂-Fixierung. Sie sind in allen Kontinenten, vor allem in eutrophen und hypereutrophen Gewässern, anzutreffen. In der Natur neigen sie zur Bildung großer Aggregate. Anhand ihrer Größe (zwischen 2 µm – 7 µm), der Dicke und Form der Schleimschicht sowie der Gestalt der Kolonien wurden *Microcystis*-Stämme in 32 Arten geteilt (Geitler 1932). Microcystine sind die von *Microcystis*-Stämmen am meisten produzierten toxischen Substanzen. Die toxischen *Microcystis*-Stämme gehören zu unterschiedlichen Arten. Innerhalb einer *Microcystis*-Art gibt es sowohl toxische als auch nicht toxische Stämme, deren Differenzierung mit dem Mikroskop nicht möglich ist (Sivonen und Jones 1999).

Mittels Sequenzvergleich der 16S rDNA und des ITS zwischen 16S und 23S rDNAs wurde gezeigt, daß einige Phänotypen von *Microcystis*-Arten zu denselben Genotypen gehören und im Sinne der Phylogenie nur als morphologische Varianten einer Art betrachtet werden sollten. (Otsuka et al. 1998; Otsuka et al. 1999; Kondo et al. 2000; Otsuka et al. 2001). Der Unterschied zwischen toxischen und nicht toxischen *Microcystis*-Stämmen konnte zwar auf eine genetische Ursache zurückgeführt werden, eine Korrelation zwischen Toxizität und auf rDNA basierten Genotypen konnte jedoch nicht bewiesen werden (Neilan et al. 1997; Otsuka et al. 1999; Nishizawa et al. 1999; Tillett et al. 2001).

1.5 Aufgabenstellung

Durch langjährige Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Phosphatkonzentration, wenn auch nicht in allen Fällen, eine Schlüsselrolle im Auftreten von cyanobakteriellen Blüten und in der Toxinbildung spielt. In der Überwachung der Wasserqualität wird daher Phosphor durch unterschiedliche Verfahren aufgeschlossen und seine Konzentration als gesamter oder gelöster Phosphat-Phosphor spektrometrisch erfaßt. Anhand der Meßdaten wird eine Korrelation zwischen der chemisch ermittelten Phosphat-Konzentration und dem Gehalt an Chlorophyll erstellt, der als Maßstab für die Biomasse der Cyanobakterien betrachtet wird. Dabei können solche chemischen Methoden die wirkliche Verfügbarkeit der verschiedenen Formen von Phosphor für Cyanobakterien sowie die Wechselwirkungen zwischen intra- und extrazellulärem Phosphor auf das cyanobakterielle Wachstum nicht berücksichtigen. Es ist daher nicht zu verwundern, daß es oft Diskrepanzen zwischen der Erwartung und den Ergebnissen einer auf der Senkung der Phosphorfracht basierenden Maßnahme zur Beseitigung der Wasserblüten gibt. Hinsichtlich der Toxizität werden Microcystine mittels HPLC, ELISA sowie der Hemmung der Proteinphosphatase bestimmt. Solche chemischen, immunchemischen und enzymatischen Methoden können nur die bereits vorhandenen Toxine detektieren, nicht aber einen möglichen Ausbruch der Toxinbildung vorhersagen. Da eine vorzeitige Erkennung in jeder Hinsicht besser ist als eine zwangsläufige Maßnahme zur Bekämpfung eines vorhandenen Problems, liegt die Ausgangsidee dieser Arbeit darin, eine oder mehrere Methoden zur Vorhersage des Auftretens von Wasserblüten sowie der Microcystinbildung zu entwickeln. Daß die Methoden einfach zu bedienen, schnell und zuverlässig sowie die benötigten Laboreinrichtungen möglich klein und günstig sein sollen, sollte während der Assayentwicklung ebenfalls in Erwägung gezogen werden.

Damit aus den Ergebnissen dieser Methoden tatsächlich eine Aussage über die Bioverfügbarkeit des Phosphors für Cyanobakterien gemacht werden kann, sollte ein *in vivo* cyanobakterieller Reporterassay entwickelt werden. Dazu wurde der Promotor *PphoA* aus *Synechococcus* PCC 7942 mit dem Reportergen *luxAB* aus *Vibrio harveyi* fusioniert und die Konstruktion *PphoA::luxAB* über ein für *S. PCC 7942* konstruiertes Transformationsplasmid ins Genom von *S. PCC 7942* integriert. Gillor et al. (2001) konnten zeigen, daß der so erzeugte Reporterstamm in Flüssigkultur unter einer Phosphatlimitierung und nach Zugabe des Substrats für die Luziferase eine Biolumineszenz in Abhängigkeit von der PO_4^{3-} -Konzentration aussendet. Ausgehend von dieser Kenntnis sollte mit diesem Reporterstamm ein einfach zu bedienender Sensor zur Detektion von verfügbarem Phosphor entwickelt werden. Im Gegensatz zu der Flüssigkultur sollte dieser Sensor lagerfähig und in Felduntersuchungen einsetzbar sein.

Eine häufig mit cyanobakteriellen Blüten einhergehende Umweltbelastung und Gesundheitsbedrohung ist die Bildung von Cyanotoxinen. Als besonders problematische Klasse von Giftstoffen sind Microcystine zu nennen, die unter anderem von der Gattung *Microcystis* produziert werden. Da eine Differenzierung zwischen microcystinproduzierenden und -nichtproduzierenden *Microcystis*-Stämmen anhand mikroskopischer Untersuchungen nicht möglich ist, wurden molekulare Methoden zur Bewertung der potentiellen Gefahr hinsichtlich der Microcystinbildung herangezogen. Dabei handelt sich um die Erkennung der toxischen Stämme und des Gens *mcy*, das Microcystin-Synthetase kodiert.

Damit beide Aufgaben in ein und demselben Versuch gelöst werden konnten, wurde der Oligonukleotid-Mikroarray als die Plattform für das Analysensystem ausgewählt. Anhand der Datensätze der entsprechenden Sequenzen aus der Genbank und dieser Arbeit wurden zunächst die spezifischen Sonden zur Genotypisierung und zur Detektion von *mcy* entworfen. Für die Anwendung wurden sie auf einem Trägermaterial immobilisiert. Im Mittelpunkt stand die Ermittlung der Hybridisierungsbedingungen mit dem konstruierten Arrays, um die Spezifität der *in silico* entworfenen Sonden zu erreichen und sie nach dem Etablieren der Versuchsbedingungen gewährleisten zu können. Die Technik zur Arrayherstellung sowie zur Targetvorbereitung und -markierung sollte nach Untersuchungen ebenfalls etabliert werden, damit ein komplettes System mit den Verfahren für die Aufarbeitung, Verarbeitung, Messung und Analyse von Proben auf den entwickelten Array zur Verfügung steht.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Bioreagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Bioreagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie ihre Bezugsquellen werden in den nachstehenden Tabellen angegeben. Allgemein wurden für Analysen und Medien Chemikalien vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad eingesetzt. Das doppelt deionisierte Wasser (ddH₂O) stammte aus dem im Labor zur Verfügung gestellten deionisierten Wasser, das zusätzlich mit dem Wasserreinigungssystem (s. Geräte, S. 21) deionisiert wurde.

Chemikalien und Bioreagenzien

Firma (Sitz)	Produkte
ABI (Frankfurt, D)	AmpliTa [®] Terminator
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)	Cy3-dUTP, Ultrapure dNTP-set, MicroSpin [™] H-200, ProbeQuant [™] G-50, Nick Translation Kit, Ready-to-go PCR Beads
Eppendorf (Hamburg, D)	Taq-DNA-Polymerase
Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein, D)	Agarose, dNTPs, 1 kb- und 100 bp-Ladder
MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)	Mbo I, Taq-Polymerase
Merck (Darmstadt, D)	Spectroquant [®] Phosphat-Test
Promega (Mannheim, D)	DNase
Qiagen (Hilden, D)	HotStarTaq [™] DNA Polymerase, QIAquick [®] PCR purification, Nucleotide removal and Gel Extraction Kit, QIAamp [®] DNA Mini Kit
Riedel-de-Haën (Seelze, D)	Ethanol (95 % und absolut), Glycerin (wasserfrei), Tris, Tris-HCl, HCl (37 %), Na ₃ Citrat (wasserfrei), Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O, Zitronensäure (wasserfrei)
Roche (Mannheim, D)	Hexanukleotide Mix (10× konz.), Klenow-Enzym (2 U/μl)

Firma (Sitz)	Produkte
Roth (Karlsruhe, D)	Rotiphorese [®] Gel (38 % Acrylamidstammlösung mit 2 % Bisacrylamid, 19:1), RotiPhenol (pH = 7,5–8,0)
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)	gewaschenes Agar, Bicin, TAPS, Eisenammoniumcitrat, Igepal, 1-Methyl-2-pyrrolidinon, Glaskügelchen (75 μm), Mineralöl
Stratagene (Amsterdam, NL)	TaqPlus [®] Long DNA Polymerase
Fluka Chemie (Buchs, Ch)	Agar, APS, Biotin, Bromphenolblau, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, DMSO, Ethidiumbromid (1 %), $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, D-Fructose-6-phosphat Dinatriumsalz Dihydrat, D-Glucose-6-phosphat Dinatriumsalz Dihydrat, DL- α -Glycerophosphat Dinatriumsalz Hexahydrat, β -Glycerophosphat Dinatriumsalz Pentahydrat, H_3BO_3 , HEPES, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , Lysozym (aus Hühnerei), $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, NaCl, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaOH, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , $\text{Na}_2\text{MgEDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , β - Na_2 Glycerophosphat $\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Nonanal, D-3-Phosphoglycerinsäure Dinatriumsalz, Streptomycinsulfat, TEMED, Triton [®] X-100, Thiamin HCl, Vitamin B ₁₂ , ZnCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Geräte

Verwendungszweck	Gerätebezeichnung	Firma (Sitz)
PCR	MasterCycler [®] Gradient RoboCycler [™]	Eppendorf (Hamburg, D) Stratagene (Amsterdam, NL)
Lumineszenzmessung	LUMIStar	BMG (Offenburg, D)
Vermischung	Vortex Genie2	Scientific Industries (New York, USA)
Abwiegen	Waagen Basic und MC Research RC 210D	Satorius (Göttingen, D)
Schütteln	HS 501 Digital IKA [®] Horizontalschüttler	IKA (Staufen, i. Br., D)
Zentrifugation	Centrifuge 5417R und 5810R	Eppendorf (Hamburg, D)
Abdampfung	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, D)
pH-Messung	Digital pH-Meter pH500	WTW (Weilheim, D)
Absorptionsmessung	Biophotometer Ultrospec 3000 UV/Vis	Eppendorf (Hamburg, D) Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Photonenmessung	Quantum Sensor Microvolt Integrator	Delta-T-Devices (Cambridge, GB)
DNA-Sequenzierung	ABI Prisma [™] 377 DNA Sequencer	ABI (Frankfurt, D)

Verwendungszweck	Gerätebezeichnung	Firma (Sitz)
DNA-Elektrophorese und Dokumentation	Mini-Sub Cell GT System	BioRad (München, D)
	Wide Mini-Sub Cell GT System	
	Powerpac 300 Power Supply	
	Video Copy Processor P66E	
DNA-Immobilisierung	BMW 9X Monitor	Mitsubishi (Cambridge, USA)
	UV-Transilluminator	Javelin Electronic (Schaumburg, USA)
	Stratalinker UV Crosslinker 1800	MWG-Biotech (Ebersberg, D)
Hybridisierung	CMT Hybridization Chamber	Stratagene (Amsterdam, NL)
	Hybridisierungsöfen OV1	Corning (Wiesbaden, D)
Herstellung und Detektion von Mikroarrays	GMS 417 Arrayer	Biometra (Göttingen, D)
	GMS 418 Array Scanner	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Temperierung	Wasserbad C1 + B33	Thermo Haake (Karlsruhe, D)
	Wasserbad DC10 + K20	
Wasseraufbereitung	Module Bioscience Research Grade UF/Polishing System	Christ (Stuttgart, D)
Inkubator	CETROMAT [®] + CETROMAT [®] HK	B. Braun Biotech International (Melsungen, D)
	Heres	

Verbrauchsmaterialien

Firma (Sitz)	Produkt
Eppendorf (Hamburg, D)	Combitips, Pipettenspitzen, Mikrogefäße
Greiner (Nürtingen, D)	PP-Röhrchen (50 ml und 15 ml), PS-Mikroplatten (96-Kavität, V-Form)
Packard (Groningen, NL)	OptiPlate (weiß, 24-Kavität)
GeneScan (Freiburg, D)	ArrayLink hyphil Objektträger, modifizierte Oligonukleotid-Sonden mit Spacer zur kovalenten Kopplung auf ArrayLink hyphil Objektträger
Sigma (Deisenhofen, D)	Objektträger, Poly-Prep Objektträger
Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein, D)	Primer und Oligonukleotid-Sonden (mit HPLC-Reinigung)
Interactiva (Ulm, D)	Primer und Oligonukleotid-Sonden (mit HPLC-Reinigung)

2.2 Medien und Lösungen

Zum Ansetzen der Medien und Lösungen wurde ausschließlich ddH₂O verwendet. Sämtliche autoklavierbaren Medienbestandteile sowie die in molekularbiologischen und genetischen Methoden eingesetzten Lösungen wurden bei 121 °C 20 min autoklaviert. Na₂CO₃, NaHCO₃, Vitamine und Antibiotika wurden in 1000fach Konzentrationen angesetzt, steril filtriert und den Medien nach dem Autoklavieren bis zu den entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Die Zusammensetzungen der Medien und Lösungen stehen in Anhang A.1.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Stämme und Anzuchtbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten cyanobakteriellen Wildtypstämme sowie ihre Anzuchtbedingungen stehen in Tab. 2.4. *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 wurden von O. Gillor¹ und C. Richaud² zur Verfügung gestellt. Alle anderen PCC-Stämme und NIES-Stämme wurden direkt von PCC³ und NIES⁴ bezogen. Allgemein wurden 5 ml Flüssigkultur von *Microcystis* mit einer OD₇₂₀ = 0,1 in einem Reagenzglas unter ständigem orbitalen Schütteln (100 min⁻¹) und den in Tab. 2.4 angegebenen Bedingungen 3 Wochen kultiviert. Danach wurde die Kultur mit dem frischen Medium wieder auf OD₇₂₀ = 0,1 verdünnt und erneut kultiviert. APL, ein Phosphat-Reporterstamm von *Synechococcus* PCC 7942 mit Strp^r und der Konstruktion *PphoA::luxAB* in seinem Genom, wurde von O. Gillor¹ konstruiert (Gillor et al. 2001) und zur Verfügung gestellt. APL wurde in BG-11^{Hepes, Strp} oder 1/5-BG-11^{Hepes, Strp} unter denselben Bedingungen wie denen für *S. PCC 7942* kultiviert. Der Anzucht von *S. PCC 7942*, *S. PCC 6803* und APL erfolgte durch 50 ml Kultur (OD₇₂₀ = 0,2) in einem Erlenmeyerkolben unter ständigem orbitalen Schütteln (100 min⁻¹) und den in Tab. 2.4 angegebenen Bedingungen bis OD₇₂₀ = 1,0. Anschließend wurde die Kultur mit dem frischem Medium auf OD₇₂₀ = 0,2 verdünnt und erneut kultiviert.

2.3.2 Stammhaltung

Für die kurzzeitige Kulturhaltung wurde die Einzelkolonie auf dem Festmedium, das mit 30 g gewaschenem Agar pro Liter Medium versetzt wurde, ausgestrichen und unter denselben Bedingungen wie denen für die Flüssigkultur (Tab. 2.4) bis zu 6 Wochen zum Wachsen belassen. Für die Herstellung einer cyanobakteriellen Dauerkultur wurde 25 ml Flüssigkultur in der stationären Phase abzentrifugiert und in 950 µl frischem Medium ohne Antibiotikum resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach Vermischung mit 50 µl steril filtriertem DMSO sofort im flüssigen Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C

¹The Hebrew University of Jerusalem, Israel.

²Laboratoire de Photorégulation et Dynamique des Membranes Végétales, CNRS, Paris, Frankreich.

³Pasteur Culture Collection, Paris, Frankreich.

⁴National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan.

Tab. 2.4: Cyanobakterielle Wildtypstämme und ihre Kultivierungsbedingungen.

Gattung Art	Stamm- bezeichnung	Herkunft ^a	Medium	Kultivierungs- bedingung ^b	Toxizität ^c	Ref. ^d
<i>Synechococcus</i>	PCC 7942	USA	BG-11	30, 50, 24/0	–	†
<i>Synechocystis</i>	PCC 6803	USA	BG-11	30, 50, 24/0	–	†
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7806	Niederlande	BG-11*	25, 5, 12/12	+	†
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7005	USA	BG-11*	25, 5, 12/12	–	†
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7941	Kanada	BG-11*	25, 5, 12/12	+	†
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7820	Schottland	BG-11*	25, 5, 12/12	+	†
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES 89	Japan	MA	25, 27, 12/12	+	‡
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES 98	Japan	MA	25, 27, 12/12	–	‡
<i>Microcystis viridis</i>	NIES 102	Japan	MA	25, 27, 12/12	+	‡
<i>Microcystis wesenbergii</i>	NIES 107	Japan	CB	25, 27, 12/12	+	‡
<i>Microcystis wesenbergii</i>	NIES 112	Japan	MA	25, 27, 12/12	–	‡
<i>Microcystis elabens</i>	NIES 42	Japan	CT	25, 27, 12/12	–	‡
<i>Microcystis holsatica</i>	NIES 43	Japan	CT	25, 27, 12/12	–	‡
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES 298	Japan	CB	25, 27, 12/12	+	‡

^aOrt des ursprünglich isolierten Stamms.

^bTemperatur (°C), Lichtintensität ($\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), Licht-Dunkel-Zyklus (h/h). Die Beleuchtung stammte aus hell-weißen Leuchtstoffröhren.

^cDie Toxizität bezieht sich auf mit (+) und ohne (–) Bildung von Microcystinen.

^d†: Rippka und Herdman 2000; ‡: Watanabe et al. 2000.

gelagert. Für die Wiederherstellung einer Flüssigkultur wurde 1 ml der DMSO-Kultur auf Eis langsam aufgetaut, in 100 ml frischem Medium, gegebenenfalls mit Zusatz von dem entsprechenden Antibiotikum, in einem 250 ml Erlenmeyerkolben aufgenommen und zunächst unter Beleuchtung von $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ohne Schütteln drei Tage inkubiert. Danach konnte die Kultur unter den in Tab. 2.4 angegebenen Bedingungen weiter wachsen.

2.3.3 Analytische Methoden

2.3.3.1 Charakterisierung von APL-Flüssigkultur

Für die Charakterisierung der Flüssigkultur wurde APL in BG-11^{Hepes, Strp} und 1/5-BG-11^{Hepes, Strp} von $\text{OD}_{720} = 0,05$ bis $\text{OD}_{720} = 1,10$ in einer Batch-Kultur gezüchtet. Während des Wachstums wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 5 ml Kultur aus der Batch-Kultur für die Charakterisierung folgender Parameter entnommen: 1. des Wachstums, angegeben als OD_{720} ; 2. der Lumineszenz der Zellen und 3. der im Medium übrig gebliebenen PO_4^{-3} -Konzentration.

Wachstumsversuch Die optische Dichte wurde gegen einen Blindwert mit unbeimpftem Medium photometrisch bei 720 nm gemessen.

Luziferase-Aktivität der Zellen Damit die Linearität in hoher Zelldichte gewährleistet werden konnte, wurde vor der Lumineszenzmessung die Zellkultur mit dem Überstand im Bereich $\text{OD}_{720} = 0,1 - \text{OD}_{720} = 0,5$ verdünnt. In Anlehnung an die

von Gillor et al. verwendete Methode (Gillor et al. 2001) wurde die Lumineszenz der freien Zellen wie folgt bestimmt: 250 μl der Zellkultur nach geeigneter Verdünnung wurden in eine Kavität einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert, und der Hintergrund wurde im LumiStar bei 26 °C 5 sec gemessen. Danach erfolgte sofort die Injektion von 50 μl einer täglich frisch angesetzten Substratlösung. Die Lumineszenz wurde alle 3 min 5 sec lang gemessen. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte im LumiStar 5 sec orbital geschüttelt. Die gemessene Lumineszenz wurde in der arbiträren Einheit RLU (Relative Lichteinheit) angegeben. Die auf die Zelldichte normierte Lumineszenzdifferenz zwischen dem Hintergrundwert und Lumineszenzwert, der 9 min nach Zugabe des Substrats gemessen wurde, wurde als die Lumineszenz der Zellen betrachtet und in $\text{RLU}/\text{OD}_{720}$ angegeben.

PO_4^{3-} -Konzentration im Überstand Nach dem Entfernen der Zellen durch Abzentrifugation ($3\,220 \times g$, 15 min, 15 °C) wurde die Konzentration des im Überstand zurückgebliebenen Phosphats mittels Spectroquant[®] Phosphat-Test von Merck nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt.

2.3.3.2 Induktion und Messung der Luziferase-Aktivität des immobilisierten Reporterstamms

Die Induktion der immobilisierten APL-Zellen erfolgte durch die Zugabe von je 1,50 ml der Standardreihe oder der Probenlösung in eine Kavität des Sensors. Die Sensoren wurden bei RT unter Beleuchtung mit unterschiedlicher Dauer inkubiert. Für die Untersuchung der Induktionsbedingungen wurden die Sensoren 15 h unter unterschiedlicher Beleuchtungsstärke ($0 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1} - 50 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) inkubiert. Um die benötigte Induktionszeit zu ermitteln, wurden die Sensoren unter Beleuchtung von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ mit unterschiedlicher Zeitdauer inkubiert. Außer im Versuch für die Ermittlung der benötigten Substratmenge wurden für die Lumineszenzmessung je 100 μl Substratlösung in jede Kavität injiziert. Die Lumineszenzmessung wurde wie die Luziferase-Aktivität einer Flüssigkultur (2.3.3.1) durchgeführt. Die Lumineszenzdifferenz vor und nach der Zugabe der Substratlösung wurde in RLU angegeben und als die durch eine PO_4^{3-} -Limitierung induzierte Luziferase-Aktivität betrachtet. Sollte die Luziferase-Aktivität einer bereits induzierten freier APL-Zellen nach der Immobilisierung gemessen werden, wurde in jede Kavität 1,0 μl des Kulturüberstands zugesetzt und die Mikrotiterplatte bis zur Messung im Dunkeln gehalten, um weitere Bildung von Luziferase und mögliche physiologische Änderungen zu vermeiden.

2.3.3.3 Analytenspektrum

Standardlösungen von fünf organischen Phosphateestern (D-Glucose-6-phosphat, D-Fruktose-6-phosphat, D-3-Phosphoglycerat, α -Glycerophosphat und β -Glycerophosphat) wurden in BG-11_(-P) im Konzentrationsbereich von 1 μM bis 10 mM angesetzt. Die Induktion der CyanoSensoren durch diese Standardlösungen sowie die Lumineszenzmessung wurde wie in 2.3.3.2 durchgeführt.

2.3.3.4 Validierung

Künstliche Proben wurden durch Zusatz von K_2HPO_4 in Leitungswasser und entgastes Mineralwasser hergestellt. Die Proben wurden dann mit doppelt konzentriertem BG-11 gemischt und bei Bedarf mit $BG-11_{(-P)}$ in geeigneter Stärke weiter verdünnt. Die PO_4^{3-} -Konzentrationen der vorbehandelten Probenlösungen wurden mittels sowohl des Spectroquant[®] Phosphat-Tests als auch des CyanoSensors ermittelt. Parallel zur Probenmessung wurde anhand der Standardreihe in jedem System eine Kalibrierungslinie aufgenommen.

2.4 Präparative Methoden

2.4.1 Konstruktion der Beleuchtungseinrichtung

Da homogene und konstante Beleuchtung für die Durchführung der Induktion der immobilisierten Sensorzellen unentbehrlich ist, wurde zum diesem Zweck im Rahmen dieser Arbeit eine Beleuchtungseinrichtung mit verstellbarer Lichtstärke konstruiert und von R. Schneider und G. Dieterler (Dez. VI-FSB, Universität Stuttgart) angefertigt. Diese Beleuchtungseinrichtung wurde mit einer aktiven Regelung versehen, um eine variable, aber zeitlich annähernd konstante Beleuchtung zu erhalten, unabhängig vom natürlichen Alterungsprozeß der verwendeten Leuchtstoffröhren. Die Konstruktion der Beleuchtungseinrichtung wird in Anhang A.3 detailliert dargestellt. Zugleich diente diese Beleuchtungseinrichtung über einem Inkubator mit einer durchsichtigen Haube als die Lichtquelle für die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten cyanobakteriellen Stämme von PCC. Eine nahezu lückenlose Verspiegelung der Inkubatorinnenwände gewährleistete eine sehr homogene Lichtverteilung sowie die Abschirmung von Raumlicht. Die Lichthomogenität wurde mittels des Quantum-Sensors und des Microvolt-Integrators von Delta-T Devices geprüft. Der Unterschied der Lichtstärke zwischen Mitte und Rand beträgt weniger als 1%. Die Anzeige des Reglers wurde ebenfalls mit Hilfe des Quantum-Sensors und des Microvolt-Integrators auf $\mu E m^{-2} sec^{-1}$ eingestellt und kalibriert.

2.4.2 Herstellung des Sensors im immobilisierten Format

2.4.2.1 Immobilisierung in Polyacrylamid

Eine bereits leicht induzierte APL-Kultur in $1/5-BG-11^{Hepes, Strp}$ mit $OD_{720} = 0,9$ wurde mit $BG-11_{(-P)}$ gewaschen und in $BG-11_{(-P)}^{Hepes, Strp}$ weitere fünf Tage induziert. Nach Abzentrifugation ($3220 \times g$, 15 min, $15^\circ C$) wurden das Pellet in $BG-11_{(-P)}^{Hepes, Strp}$ resuspendiert, wobei die OD_{720} auf 7,8 eingestellt wurde. 1,919 ml der Suspension wurden mit 0,551 ml Rotiphorese[®] 40 versetzt. Nach kurzer Vermischung mit $24,6 \mu l$ APS und $4,92 \mu l$ TEMED wurden je $250 \mu l$ des Gemisches in jede Kavität einer weißen Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten pipettiert. Die Polymerisation vollzog sich nach 16 min in einer sauerstofffreien

Kammer. Danach wurden die immobilisierten Zellen zweimal mit je 1 ml BG-11^{Hepes, Strp}_(-P) pro Kavität gewaschen. Die Luziferase-Aktivität der in Polyacrylamid immobilisierten APL-Zellen, die bereits vor der Immobilisierung induziert waren, wurde anschließend wie in 2.3.3.2 (S. 24) bestimmt.

2.4.2.2 Immobilisierung in Agar

Das Pellet der geernteten APL-Zellen aus 1/5-BG-11^{Hepes, Strp} und BG-11^{Hepes, Strp} wurde zweimal mit 1/500-BG-11^{Hepes, Strp} von 1/5 des Originalvolumens gewaschen und resuspendiert, wobei die OD₇₂₀ auf 1,5 eingestellt wurde. Je 100 μ l der Suspension und je 125 μ l Agar (1 % (w/v) in ddH₂O bei 39 °C) wurden zusammen in jeder Kavität einer weißen Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten pipettiert und durch orbitales Schütteln gemischt. Nach dem Gelieren wurden die im Agar immobilisierten APL-Zellen, die in dieser Arbeit als CyanoSensor bezeichnet werden, entweder sofort für andere Untersuchungen eingesetzt oder bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Damit die Sensoren während der Lagerung nicht austrockneten, wurden sie mit 1 ml 1/500-BG-11^{Hepes, Strp} pro Kavität bedeckt. Vor der Benutzung eines gelagerten CyanoSensors wurde er auf RT vorgewärmt und zweimal mit 1 ml BG-11^{Hepes, Strp}_(-P) pro Kavität gewaschen.

2.4.3 Herstellung des Oligonukleotid-Mikroarrays

Der Oligonukleotid-Mikroarray wurde nach dem Protokoll von Eisen und Braun (1999) mit Änderungen hergestellt.

2.4.3.1 Herstellung der Poly-L-Lysin-Objektträger

Die in einen Objektträgergestell gelegten Objektträger wurden in einem Gefäß mit der Reinigungslösung 2 h unter Schütteln inkubiert und anschließend fünfmal mit ddH₂O gründlich gewaschen, um NaOH, den Hauptbestandteil der Reinigungslösung, vollständig zu entfernen. Nach dieser Behandlung sollten die Objektträger möglichst wenig Kontakt zur Luft haben, um eine eventuelle Verunreinigung durch Staubpartikel zu vermeiden. Danach wurden die Objektträger in einem Gefäß aus Edelstahl mit Poly-L-Lysin-Lösung unter Schütteln 1 h inkubiert, durch 5maliges Eintauchen in ddH₂O ausgespült, mit Hilfe der Zentrifugation (35 \times g, 5 min, 20 °C) getrocknet, locker in Alufolie eingepackt und in einem Ofen 10 Minuten lang bei 45 °C gebacken. Während des Transports zwischen den verschiedenen Arbeitsorten wurden die beschichteten Objektträger in einem bedeckten Gefäß vor Verunreinigung geschützt. Die Poly-L-Lysin-Objektträger wurden zunächst zwei Wochen in einer staubfreien, dicht verschlossenen Objektträgerkassette bei RT gelagert⁵ und waren dann zum Drucken von Oligonukleotid-Sonden einsetzbar.

⁵Die Bindungseigenschaft der Poly-L-Lysin-Objektträger verbessert sich aus noch unbekanntem Grund nach der als „Reifungsprozeß“ bezeichneten Lagerung (Eisen und Brown 1999).

2.4.3.2 Immobilisierung der Oligonukleotid-Sonden auf Poly-L-Lysin-Objektträger

Die zum Drucken bereitgestellte Sondenlösung bestand aus $6 \mu\text{l}$ Sonden ($100 \mu\text{M}$ in $0,5\times$ Tris-Puffer), $15 \mu\text{l}$ DMSO und $9 \mu\text{l}$ ddH₂O. Entsprechend dem Layout für den Mikroarray wurden die Sondenlösungen in die klaren Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und V-förmigem Boden pipettiert. Das Drucken von Sonden erfolgte in einem GMS 417 Arrayer nach der Gebrauchsanleitung des Herstellers. Um Effekte durch Unterschiede der einzelnen Drucknadeln zu vermeiden, wurde nur eine von den vier vorhandenen Drucknadeln benutzt. Die Sondenspots sind $400 \mu\text{m}$ voneinander entfernt. Jede Sondenlösung wurde hintereinander dreimal an einem Spot gedruckt. Derselbe Sondenspot wurde mit einer Entfernung von 2 mm dreimal übereinander gedruckt, so daß ein Triplet des Arrays entstand und die Durchführung einer Dreifachhybridisierung möglich war. Um den Durchsatz eines Poly-L-Lysin-Objektträgers zu erhöhen, wurde das Triplet in einer Entfernung von 23 mm dupliziert. In Abb. 2.1 ist das Layout des konzipierten Mikroarrays schematisch dargestellt. Das Triplet, das aus den Sonden zur Detektion von *Microcystis*-Stämmen und *mcy* bestand, wird in dieser Arbeit als CyanoArray bezeichnet. Durch UV-Bestrahlung mit Energie von 120 mJ im Stratalinker wurden die Oligonukleotid-Sonden kovalent an der Poly-L-Lysin-Oberfläche gebunden. Die restlichen freien Bindungsstellen der Poly-L-Lysin-Oberfläche wurden durch 15minütiges leichtes Schütteln in der frisch angesetzten Blockierungslösung gesättigt. Danach wurden die Mikroarrays zwei Minuten mit gerade nicht mehr kochend heißem Wasser gewaschen, fünfmal in 95%iges Ethanol eingetaucht und anschließend mittels Zentrifugation ($35 \times g$, 5 min, $20 \text{ }^\circ\text{C}$) getrocknet. Die Mikroarrays waren dann für die Hybridisierungsversuche einsetzbar und konnten bis zu mehreren Monaten gelagert werden.

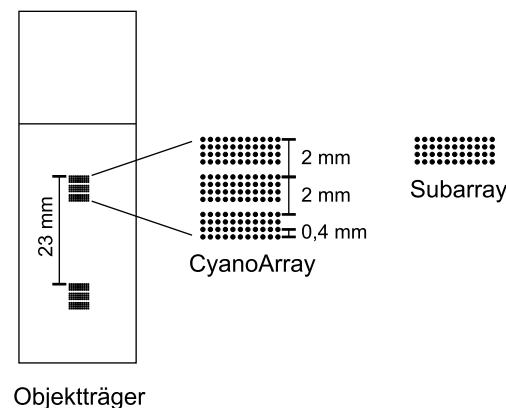


Abb. 2.1: Layout des CyanoArrays. Ein Objektträger enthält zwei CyanoArrays für jeweils zwei unabhängige Hybridisierungen. Jedes CyanoArray besteht aus drei identischen Subarrays für die Durchführung einer Dreifachhybridisierung mit derselben Targetlösung.

2.5 Molekulare Methoden

2.5.1 Entwurf von Oligonukleotid-Sonden

Die Oligonukleotid-Sonden für die verschiedenen Zwecke wurden anhand der entsprechenden Datensätze mittels der Funktionen „Probe Design“ und „Probe Match“ im Programm ARB (Ludwig und Strunk 1996) entworfen, wobei die Parameter für das Probe-Design wie folgt eingestellt waren:

Länge der Suchergebnisse = 50	Sondenlänge = 18 bp
Maximal erlaubte Anzahl der nicht-ausgewählten Spezies = 0	$T_d^6 = 50\text{ °C} - 60\text{ °C}$
Minimaler Anteil der ausgewählten Spezies (%) = 100	GC-Gehalt = 40 % – 60 %
Maximale Anzahl der Haarnadel-schlingen = 0	<i>E. coli</i> Position = 1 – 10 000

Anschließend wurde der Sequenzvergleich zwischen den so berechneten Sonden und anderen Sequenzen mittels BLAST (Basic local alignment search tool, Altschul et al. 1990) in EMBL und GenBank durchgeführt, um die mögliche, unerwünschte Kreuzhybridisierung auszuschließen. Anhand der Ergebnisse von BLAST wurden die in Frage kommenden Sequenzen sowie ihre komplementären Oligonukleotiden als Sonden von den Firmen Gibco BRL Life Technologies und Interactiva in der mittels HPLC erreichbaren Reinheit synthetisiert und lyophilisiert. Die Pellets der Sonden wurden dann mit $0,5\times$ Tris-Puffer in der Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ aufgenommen und bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert.

2.5.1.1 Oligonukleotid-Sonden zur Genotypisierung

Für den Entwurf der Oligonukleotid-Sonden zur Genotypisierung wurde der von ARB im Dezember 1998 veröffentlichte Datensatz von 16S rRNA verwendet, der 104 *Microcystis*-Stämme, ca. 400 Cyanobakterien und 10 500 Bakterien enthielt. In erster Linie wurden *Microcystis*-spezifische Sonden entworfen. Ferner wurden einige bereits veröffentlichte Universalsonden für Bakterien und Cyanobakterien, zum Teil mit Modifikationen, in diese Arbeit übernommen. Diese Universalsonden dienten einerseits als positive Kontrolle, andererseits entstand dadurch ein Mikroarray mit Sonden auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten 16S rDNA Sonden zur Genotypisierung werden in Tab. 3.1 (S. 54) genannt.

2.5.1.2 Oligonukleotid-Sonden zur Detektion von *mcy*

Die Sequenzen der *N*-Methyltransferase-Domäne in *mcyA* (*mcyA(NMT)*) unter den Akzessionsnummern (accession number) AF183408, AB019578 und AF139330 – AF139348

⁶ T_d (Dissoziationstemperatur) wurde nach folgender empirischer Gleichung berechnet:

T_d (°C) = $4 \cdot N_{G+C} + 2 \cdot N_{A+T}$, wobei N_{G+C} und N_{A+T} die Anzahl der Nukleotiden G und C sowie die der Nukleotiden A und T sind.

sowie des Fragments von 3'-Ende des Gens *mcyB* bis 5'-Anfang des Gens *mcyC* (*mcyB-mcyC*) unter den Akzessionsnummern AB019578 und AB019708–AB019712 samt der in dieser Arbeit sequenzierten *mcyB-mcyC* aus 5 weiteren microcystinproduzierenden *Microcystis*-Stämmen dienten als Grundlagen der Datensätze für den Sondenentwurf zur Detektion von *mcy*. Mittels ARB und BLAST wurden innerhalb *mcyA(NMT)* und *mcyB-mcyC* jeweils 4 bzw. 5 Stellen gefunden (Abb. 3.18, S. 55), die spezifisch für das jeweilige Fragment sind. Die daraus entstandenen Sonden sind in Tab. 3.1 (S. 54) aufgeführt.

2.5.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Kulturen und Umweltproben

O. Lentz, J. Secker und S. Stumpp (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) haben die Extrakte der genomischen DNA aus *Bacillus subtilis* DSM 402, *Pichia pastoris* sowie *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069 und *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 für die Untersuchung der SONDENSPEZIFITÄT zur Verfügung gestellt. Die genomische DNA aus cyanobakteriellen Stämmen und Umweltproben wurde mittels nachfolgend genannter Methoden extrahiert.

2.5.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Methode lehnt sich an das DNA-Extraktionsprotokoll für *Anabaena* PCC 7120 (Cai und Wolk 1990). Die Zellen von 2 ml einer Umweltprobe oder einer Reinkultur in der exponentiellen Phase wurden durch Zentrifugation ($10\,600 \times g$, 10 min, $4\,^{\circ}\text{C}$) geerntet und in $200\,\mu\text{l}$ $1 \times \text{TE}$ ($\text{pH} = 7,4$) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 mg gewaschenen sterilen Glaskügelchen, $400\,\mu\text{l}$ Phenol und $40\,\mu\text{l}$ 10%iges SDS (w/v) erfolgte dreimal je 10 sec kräftige Mischung mittels eines Vortexers. Zwischen zwei Mischvorgängen wurde die Suspension jeweils 10 sec auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation ($20\,800 \times g$, 10 min, $4\,^{\circ}\text{C}$) wurde der obere wäßrige Überstand in ein neues Mikrogefäß überführt und hintereinander zweimal mit Phenol, zweimal mit Phenol:Chloroform (v:v = 1:1) und zweimal mit Chloroform extrahiert, wobei die Menge der verwendeten organischen Lösungsmittel dem Volumen der zu extrahierenden wäßrigen Phase gleich war. Danach wurde die wäßrige Phase mit 1/10 Volumenteil von NaOAc (3 M, $\text{pH} = 5,5$) und 2,5fachen Volumenteil von 100%igem Ethanol ($-20\,^{\circ}\text{C}$) vermischt. Nach anschließender 30minütiger Inkubation bei $-80\,^{\circ}\text{C}$ wurde die DNA ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert ($20\,800 \times g$, 20 min, $4\,^{\circ}\text{C}$), zweimal mit 75%igem Ethanol ($-20\,^{\circ}\text{C}$) gewaschen, im Vakuum-Konzentrator bei $30\,^{\circ}\text{C}$ getrocknet und in $30\,\mu\text{l}$ $0,5 \times$ Tris-Puffer aufgenommen.

2.5.2.2 DNA-Isolierung mittels QIAamp[®] Kit

Mittels QIAamp[®] Kits von Qiagen wurde die DNA aus Umweltproben nach einem modifizierten Protokoll (Petri 2001) extrahiert. Das durch Zentrifugation geerntete Zellenpellet von 2 ml einer Umweltprobe wurde sorgfältig in $180\,\mu\text{l}$ Lysierungspuffer (20 mg/ml Lysozym, $2 \times \text{TE}$ mit einem pH-Wert von 8,0, 1,2% Triton[®] X-100) resuspendiert, mit $20\,\mu\text{l}$ RNase-Lösung (20 mg/ml) gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von $25\,\mu\text{l}$ Proteinase K-Lösung⁷ und der anschließenden 30minütigen Inkubation bei $37\,^{\circ}\text{C}$

⁷im Lieferumfang enthalten

wurde das Gemisch mit 200 μl Puffer AL⁷ versetzt und mittels eines Vortexers gemischt. Nach einer weiteren 30minütigen Inkubation bei 70 °C wurden 210 μl absoluten Ethanols zupipettiert und gründlich vermischt. Das Lysierungsgemisch wurde samt den eventuell aufgetretenen Niederschlägen in eine QIAamp[®]-Minisäule aufgetragen, die bereits in ein 2 ml-Auffangröhrchen eingesetzt worden war, und 1 min bei RT mit 10 600 \times g zentrifugiert. Die QIAamp[®]-Minisäule wurde in ein neues Auffangröhrchen überführt und nach Zusatz von 500 μl Puffer AW⁷ 1 min lang bei RT mit 6 000 \times g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, allerdings wurde die Säule diesmal 3 min bei RT mit 20 800 \times g zentrifugiert. Zur Eluierung der DNA von der Säule wurde die QIAamp[®]-Minisäule in ein 1,5 ml Mikrogefäß überführt, mit 200 μl auf 70 °C vorgewärmtem Puffer AE⁷ 1 min inkubiert und danach 1 min bei RT mit 6 000 \times g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 200 μl des auf 70 °C vorgewärmten DNA-freien ddH₂O wiederholt. Die Eluaten wurden vereinigt und im Vakuum-Konzentrator bei 30 °C bis auf ca. 40 μl konzentriert.

2.5.3 Bestimmung von DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration eines DNA-Extraktes wurde nach geeigneter Verdünnung mit ddH₂O photometrisch im BioPhotometer von Eppendorf gegen einem Blindwert mit ddH₂O bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dsDNA entspricht.

2.5.4 Targetvorbereitung

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Amplifikationsprimer werden in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Amplifikationsprimer.

Name	Zweck	Sequenz (5' \rightarrow 3')	Position	T_d (°C)	Ref. ^d
16_f	Vorwärtsprimer für 16S rDNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8–27 ^a	58–60	†
16_r	Rückwärtsprimer für 16S rDNA	CCT TGT TAC GAC TTC ACC CC	1505–1486 ^a	62	‡
methyl_f	Vorwärtsprimer für <i>mcyA(NMT)</i>	ATG TTG TGG GTC AGT CTC	38889–38906 ^b	54	‡
methyl_r	Rückwärtsprimer für <i>mcyA(NMT)</i>	AAT CCT CAG CTA AAG CCG	39985–39968 ^b	54	‡
mcyBC_f	Vorwärtsprimer für <i>mcyB-mcyC</i>	CAG TCT GAA GGC GAT GCG	16297–16314 ^c	58	‡
mcyBC_r	Rückwärtsprimer für <i>mcyB-mcyC</i>	CTG TAG GGT AAG AGG GGG T	16989–16971 ^c	60	‡

^a16S rRNA von *E. coli* (Brosius et al. 1978).

^b*N*-Methyltransferase Domäne des Gens *mcyA* von *M. aeruginosa* PCC 7806, Akzessionsnummer: AF183408 (Tillett et al. 2001).

^c*mcyABC* von *M. aeruginosa* K-139, Akzessionsnummer: AB019578 (Nishizawa et al. 1999).

^d†: Petri 2000; ‡: diese Arbeit; ‡: Nishizawa et al. 1999.

2.5.4.1 Amplifikation einzelner Targets mittels Single-PCR

Die nahezu vollständige 16S rDNA, das *mcyA(NMT)*-Fragment in der Länge von 1,1 kb sowie das *mcyB-mcyC*-Fragment in der Länge von 700 bp wurden jeweils mit dem entsprechenden Primerpaar aus DNA-Extrakten mittels einer PCR im RoboCyclerTM von Stratagene amplifiziert. Ein Ansatz von 50 μ l enthielt die folgenden Komponenten:

Template	1 μ g
dNTPs (je 2,5 mM)	4 μ l
10 \times PCR-Puffer (Eppendorf) ⁸	5 μ l
Vorwärtsprimer (100 μ M)	0,5 μ l
Rückwärtsprimer (100 μ M)	0,5 μ l
Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf) ⁸	1 U
ddH ₂ O	ad 50 μ l
	bedeckt mit Mineralöl

und die PCR erfolgte nach dem folgenden Programm:

Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95 °C, 3 min		
30	95 °C, 1 min 30 sec	55 °C, 1 min 30 sec	72 °C, 2 min
1			72 °C, 7 min

Nach Beendigung der PCR wurde das Mineralöl vor weiteren Untersuchungen entfernt.

2.5.4.2 Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung einzelner Targets mittels Single-PCR

Während der Elongation einer PCR können anstelle von dTTPs die fluoreszierenden Cy3-dUTPs in die amplifizierten Stränge eingebaut werden, wodurch fluoreszierende PCR-Produkte entstehen. Die Durchführung dieser PCR zur Fluoreszenzmarkierung des Targets erfolgte nach demselben PCR-Programm im RoboCyclerTM wie in 2.5.4.1, allerdings enthielt der Reaktionsansatz eine abweichende Zusammensetzung von dNTPs:

dNTPs für die Fluoreszenzmarkierung des Targets mittels PCR:

dATP, dGTP, dCTP (je 2,5 mM)	4 μ l
dTTP (1 mM)	2 μ l
Cy3-dUTP(1 mM)	1 μ l

⁸16S rDNA und *mcyB-mcyC* für Sequenzierung wurden mit TaqPlus[®] Long-DNA-Polymerase und dem entsprechenden PCR-Puffer von Stratagene amplifiziert.

2.5.4.3 Amplifikation mehrerer Targets mittels Multiplex-PCR

Die beiden Fragmente, 16S rDNA und *mcyA(NMT)*, wurden mittels einer sogenannten Multiplex-PCR gleichzeitig in einem PCR-Ansatz aus dem DNA-Extrakt amplifiziert. Ein Ansatz von 50 μl enthielt die folgenden Komponenten:

Template	0,5 μg
dNTPs (je 2,5 mM)	4 μl
10 \times PCR-Puffer (Qiagen)	5 μl
Primer 16_f(100 μM)	0,5 μl
Primer 16_r(100 μM)	0,5 μl
Primer methyl_f(100 μM)	0,5 μl
Primer methyl_r(100 μM)	0,5 μl
HotStarTaq TM -DNA-Polymerase (Qiagen)	2,5 U
ddH ₂ O	ad 50 μl

und die PCR wurde im MasterCycler[®] von Eppendorf nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95 °C, 15 min		
30	94 °C, 30 sec	52 °C, 40 sec	72 °C, 2 min
1			72 °C, 10 min

2.5.4.4 Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung mehrerer Targets mittels Multiplex-PCR

Durch Verwendung des in 2.5.4.2 angegebenen Nukleotidengemisches im Ansatz einer Multiplex-PCR (2.5.4.3) wurden die amplifizierten Fragmente 16S rDNA und *mcyA(NMT)* fluoreszenzmarkiert.

2.5.4.5 Fluoreszenzmarkierung mittels Random-Priming

Sowohl gereinigte PCR-Produkte als auch fragmentierte genomische DNAs⁹ wurden mittels Random-Priming fluoreszenzmarkiert. Dazu wurden 15 μl Probenlösung, die 0,2 μg – 0,5 μg DNA enthielten, bei 95 °C 10 min denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Probe

⁹Drei Methoden zur Fragmentierung der DNA-Extrakte wurden verwendet: 1. 1minütige Mechanische Fragmentierung mittels Scherkraft durch eine Injektionsspritze für Gaschromatographie; 2. Mechanische Fragmentierung im Ultraschallbad: 10mal je 15 sec Sonifikation mit jeweils 15 sec Abkühlung im Eisbad; 3. Enzymatische Fragmentierung: 2 μl (0,5 μg – 1 μg) DNA-Extrakt wurden mit 10 U MboI von MBI Fermentas, 0,5 μl Puffer R⁺ (im Lieferumfang enthalten) und 1,5 μl ddH₂O bei 30 °C 30 min inkubiert. Das Enzym wurde anschließend nach Zugabe von 25 μl ddH₂O durch 10minütiges Erhitzen bei 65 °C inaktiviert. 15 μl des Reaktionsgemisches wurden in die Fluoreszenzmarkierung mittels Random-Priming eingesetzt.

wurde mit 2 μ l dNTP-Mix (dATP, dCTP und dGTP jeweils 1 mM, dTTP: 0,65 mM und Cy3-dUTP: 0,35 mM), 2 μ l 10 \times Hexanukleotidenmix und 1 U Klenow-Enzym (beide zuletzt genannten Komponenten von Roche) vermischt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 2 μ l EDTA (0,2 M, pH = 8,0) gestoppt.

2.5.4.6 Fluoreszenzmarkierung mittels Nick-Translation

Mit Hilfe eines Nick-Translation-Kits von Amersham Pharmacia wurden gereinigte PCR-Produkte und genomische DNA durch Einbau von Cy3-dUTP fluoreszenzmarkiert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, wobei immer nur die Hälfte der im Protokoll angegebenen Mengen in einem Ansatz von 25 μ l eingesetzt wurde und die Reaktion über Nacht dauerte. Im Fall von Fluoreszenzmarkierung der genomischen DNA wurde ebenfalls nach der Vorschrift des Herstellers 0,001 167 U DNase I in den 25 μ l-Ansatz zugegeben.

2.5.5 Aufreinigung von DNA nach PCR, Random-Priming und Nick-Translation

Nicht fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte wurden mittels QIAquick[®] Säulen von Qiagen, fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte mittels MicroSpin[™] S-200 HR von Amersham Pharmacia und fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente nach Random-Priming sowie Nick-Translation mittels ProbeQuant[™] G-50 Minisäulen von Amersham Pharmacia vor der weiteren Verwendung gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Protokollen der Hersteller.

2.5.6 Elektrophoretische Methoden

Zur Kontrolle von DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation wurden ausschließlich Agarosegele verwendet, während für die Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Fragmente nach der Sequenzierungs-PCR ein Polyacrylamidgel eingesetzt wurde.

2.5.6.1 Agarosegel

Die Kontrolle von DNA-Extraktion und PCR-Produkten erfolgte in 0,7 %igen (w/v) bzw. 2 %igen (w/v) Agarosegelen in 1 \times TAE, die zusätzlich noch Ethidiumbromid (1 mg/l) zur Detektion enthielten. Vor dem Auftragen wurde die 2 μ l DNA-Probe mit 1 μ l Auftragspuffer vermischt und im Laufpuffer (1 \times TAE) mit einer Spannung von 100 V 40 min–60 min aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard dienen 10 μ l verdünnter 1 kb- bzw. 100 bp-Ladder (50 μ l Ladder von Gibco BRL Life Technologies, 1 \times TE (pH = 8,0), 300 μ l Auftragspuffer). Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel mittels eines UV-Transilluminators betrachtet und dokumentiert. Sollten mittels eines Agarosegels keine oder unspezifische PCR-Produkte detektiert werden, wurde die PCR unter denselben Bedingungen mindestens dreimal wiederholt, um das Ergebnis zu bestätigen.

2.5.6.2 Polyacrylamidgel für die Sequenzierung

Die Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Fragmente für die Sequenzierung erfolgte in einem 5,25 %igen Polyacrylamidgel. Es enthielt:

Harnstoff	18,0 g
PAGE-PLUS Lösung (40 %)	6,6 ml
10× TBE	5,0 ml
ddH ₂ O	ad 50,0 ml
APS (10 %, w/v)	250 µl
TEMET	25 µl

Die Vorbereitung des Gels und die Durchführung der Elektrophorese im PrismaTM 377 DNA-Sequencer von ABI erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.5.7 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von *mcyB-mcyC* und 16S rDNA wurden 1 µl–5 µl des mit Taq-Plus[®] Long-DNA-Polymerase amplifizierten, gereinigten PCR-Produkts mit 7,2 µl Sequenzierungspuffer (200 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH = 9,0), 0,8 µl Terminationsmix von ABI, das die AmpliTaq[®]-Gold-DNA-Polymerase, dNTPs, sowie die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs enthält, und 1 µl Sequenzierungsprimer (3,2 µM) in einem 0,5 µl Mikrogefäß vermischt und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Als Sequenzierungsprimer diente der Vorwärts- oder Rückwärtsamplifikationsprimer der jeweiligen Fragmente (Tab. 2.5, S. 30). Die Sequenzierungs-PCR erfolgte in MasterCycler[®] von Eppendorf nach dem folgenden Programm:

Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95 °C, 2 min		
99	95 °C, 15 sec	50 °C, 15 sec	60 °C, 4 min

Nach Beendigung der PCR wurden die erzeugten Fragmente mit Ethanol gefällt. Dazu wurde das PCR-Produkt mit 2 µl NaOAc (3 M, pH = 5,5) und 50 µl Ethanol (100 %, –20 °C) vermischt, auf Eis 15 min inkubiert und anschließend abzentrifugiert (20 800 × g, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 4 µl eines Gemisches aus EDTA (25 mM) und Formamid (v:v = 1:5) resuspendiert. Nach 5minütiger Denaturierung bei 95 °C wurde die Probe sofort auf Eis gekühlt und dann in die Tasche des Polyacrylamidgels für die Sequenzierung aufgetragen.

2.5.8 Hybridisierung

Nachfolgend werden die bereits optimierten Hybridisierungsbedingungen angegeben:

10 μl gereinigte fluoreszenzmarkierte Targets wurden im Vakuum-Konzentrator bei 30 °C getrocknet. Das Pellet wurde in 4,5 μl Reaktionsgemisch aus 1 U DNase und 1 \times Reaktionspuffer von Promega aufgenommen und 5 Minuten lang bei RT inkubiert. Der Verdau wurde mit 0,5 μl Stop-Puffer (im Lieferumfang enthalten) beendet und die DNase durch 10minütiges Erhitzen bei 65 °C inaktiviert. Nach der Vermischung mit 5 μl 8 \times SSC wurde die Probe durch 3minütiges Erhitzen in kochendem Wasser denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und vor dem Auftragen auf den Array bei 4 °C kurz abzentrifugiert. Die auf den Array verteilte Probe wurde mit einem Deckglas (18 \times 18 mm) luftblasenfrei bedeckt und in eine feuchtigkeitsdichte Hybridisierungskammer von Corning verschlossen, die 10 μl ddH₂O in jedem ihrer Vorratsgefäßchen enthielt. Sofort erfolgte eine 5stündige Hybridisierung in einem Hybridisierungssofen bei 45 °C. Nach der Hybridisierung wurde das Array 3 min in Waschpuffer I (20 ml 20 \times SSC, 0,6 ml 10 % (w/v) SDS, 190 ml ddH₂O) und 2 min in Waschpuffer II (2 ml 20 \times SSC, 198 ml ddH₂O) durch Schütteln gewaschen. Nach Ausspülen durch 5maliges Eintauchen in Waschpuffer III (1 ml 20 \times SSC, 199 ml ddH₂O) wurde das Array durch Zentrifugation (35 \times g, 5 min, 20 °C) getrocknet und anschließend zur Detektion in den GMS 418 Array Scanner gestellt.

Um die erwünschte Sondenspezifität zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Hybridisierungsbedingungen optimiert. Dies geschah durch Änderung jeweils eines der folgenden Parameter in der Versuchsdurchführung:

- Enzymatische Vorbehandlung der Targets
- Hybridisierungsdauer
- Hybridisierungstemperatur
- Ionenstärke im Hybridisierungspuffer
- Einfluß des Formamids im Hybridisierungspuffer auf die Sondenspezifität

2.5.8.1 Detektion und Auswertung der Hybridisierung

Zur Detektion der Hybridisierung mit dem Mikroarray wurde der Fluorophor von Cy3-dUTP mittels grünen Laserlichtes (532 nm) im GMS 418 Array Scanner nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers angeregt, detektiert und dokumentiert, wobei die Parameter Laserstärke auf 100 % und PMT (Photomultiplier)-Vergrößerung auf 90 % eingestellt waren. Die Daten wurden mittels der Software ImaGeneTM, Version 3.0 (BioDiscovery, Inc., Los Angeles, USA) analysiert. Der „Median_sig“-Wert, subtrahiert von dem „Median_bkg“-Wert, wurde als die Hybridisierungsstärke einer Sonde definiert. In einer Dreifachhybridisierung wurde der arithmetische Mittelwert der einzelnen Hybridisierungsstärke gebildet. In der Darstellung der gescannten Bilder ohne weitere Bearbeitung wurde jedoch nur ein Hybridisierungsergebnis von der Dreifachhybridisierung gezeigt. Für die Normierung wurde die Hybridisierungsintensität von 1387_f als 100 % definiert und die Signalstärke aller anderen Sonden auf die von 1387_f prozentual umgerechnet.

Kapitel 3

Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind in diesem Kapitel in die Bereiche „Entwicklung des Reporterassays“ sowie „Entwicklung des Oligonukleotid-Mikroarrays“ eingeteilt.

3.1 Entwicklung eines Reporterassays im immobilisierten Format zur Detektion des bioverfügbaren Phosphors

Um den für Cyanobakterien verfügbaren Phosphor detektieren zu können, wurde ein Phosphat-Reporterstamm von *Synechococcus* verwendet, dessen Bildung von Luziferase durch eine Phosphatlimitierung induziert wurde und dessen Menge an exprimierter Luziferase durch seine enzymatische Aktivität erfaßt werden konnte. In Abb. 3.1 wird die Konstruktion des verwendeten Reporterstamms schematisch dargestellt. Dazu wurde der Promotor vom Gen *phoA* (*PphoA*), das eine periplasmatische Phosphatase kodiert, aus *Synechococcus* PCC 7942 isoliert und ins Transformationsplasmid pAM1414 für *S. PCC 7942* (Golden 1997) stromaufwärts zum Luziferaseoperon *luxAB* aus *Vibrio harveyi* kloniert. Das Plasmid pAM1414 enthält neben dem Reportergen noch ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Streptomycin (*Strp^r*) und zwei „Neutrale Stellen“ (NS)¹. Nach der Transformation wurden die Fusion *PphoA::luxAB* und *Strp^r* durch Doppelkreuzintegration an beiden NSs ins Genom von *S. PCC 7942* integriert. Dadurch entstand der Reporterstamm APL. Da APL das Operon *luxCDE*, das das Enzym zur Synthese des Substrats für die bakterielle Luziferase kodiert, nicht enthielt und der endogene langkettige Aldehyd nicht in ausreichendem Maße vorhanden war, wurde zur Messung der Luziferase-Aktivität Nonanal als exogenes Substrat zugesetzt. Die Biolumineszenz von APL, die bei der enzymatischen Umsetzung von Nonanal entsteht, konnte als Maß für die Bioverfügbarkeit von Phosphor betrachtet werden (Gillor et al. 2001). Da eine Flüssigkultur für den Einsatz in Vor-Ort-Messungen wenig geeignet ist, wurden die Möglichkeiten der Immobilisierung dieses Reporterstamms überprüft und daraus ein handhabbarer Assay entwickelt.

¹Durch Insertion von Genen zwischen den beiden NSs wurde kein scheinbarer Phänotyp erzeugt (Golden 1997).

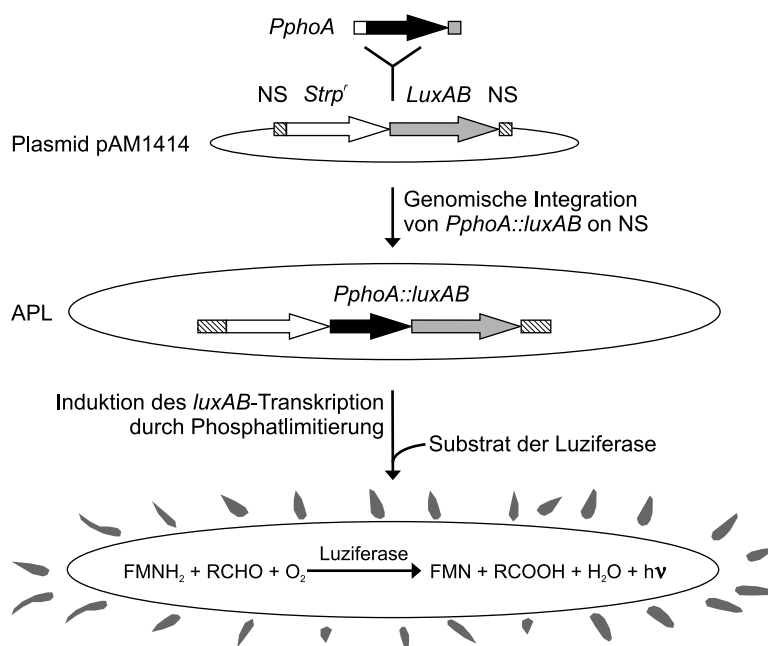


Abb. 3.1: Genetische Konstruktion des Phosphat-Reporterstamms APL.

3.1.1 Charakterisierung des Reporterstamms in Flüssigkultur

Im Vorfeld wurden drei Parameter von APL-Flüssigkulturen untersucht:

1. das Wachstum einer APL-Batch-Kultur in Medien mit unterschiedlichem Anfangsgehalt an Phosphat ($48 \mu\text{M}$ in $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ und $240 \mu\text{M}$ in $\text{BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$),
2. die Luziferase-Aktivität der Zellen während des Wachstums in einer Batch-Kultur,
3. der während einer Batch-Kultur im Medium übrig gebliebene PO_4^{3-} -Gehalt.

Die Ergebnisse aus einem repräsentativen Versuch sind in Abb. 3.2 dargestellt. Während die Wachstumsraten der beiden Kulturen in der logarithmischen Phase etwa gleich waren, trat die $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur früher in die stationäre Phase ein als die $\text{BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur. Im Gegensatz zu der $\text{BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur, die mindestens 2 Wochen lang optisch unverändert blieb, wurde die $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur eine Woche nach der Überimpfung gelb-grün. In beiden Kulturen nahm die PO_4^{3-} -Konzentration während des Wachstums ab. Am Ende der logarithmischen Phase sank die externe PO_4^{3-} -Konzentration in der $\text{BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur auf ein Minimum und stieg dann ganz leicht an. Während des gesamten Experiments konnte keine Luziferase-Aktivität in den Zellen der $\text{BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur gemessen werden. Hingegen sank die externe PO_4^{3-} -Konzentration in der $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur bereits Mitte der logarithmischen Phase unter die Meßgrenze der verwendeten spektrometrischen Methode, und zur gleichen Zeit stieg die Luziferase-Aktivität der Zellen schlagartig an, was auf die Induktion von $PphoA::luxAB$ deutete.

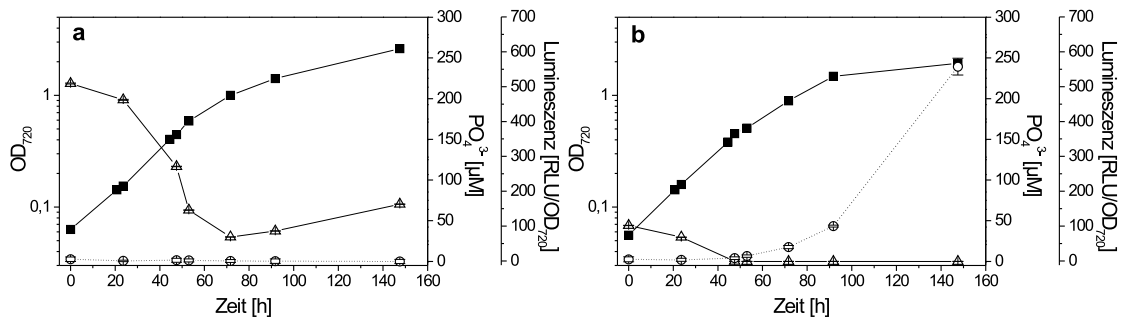


Abb. 3.2: Charakterisierung der Batch-Kultur von APL in Medien mit unterschiedlichen PO_4^{3-} -Konzentrationen. a: BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur; b: 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur. ■: Zellwachstum in OD_{720} ; △: PO_4^{3-} -Konzentration in μM ; ○: Luziferase-Aktivität der Zellen in $\text{RLU}/\text{OD}_{720}$. $n = 3$.

3.1.2 Immobilisierung des Reporterstamms

Die Hauptkriterien einer geeigneten Immobilisierungsmatrix sind die Überlebensrate und die Induzierbarkeit des immobilisierten Reporterstamms. Zur Untersuchung der Überlebensrate wurden die bereits induzierten Zellen immobilisiert. Ihre Luziferase-Aktivität wurde unmittelbar nach der Immobilisierung gemessen und mit der aus den freien Zellen verglichen, die aus derselben Quelle stammten und in gleicher Weise, jedoch ohne Zusatz von Immobilisierungsmatrix, behandelt wurden. Um die Induzierbarkeit zu überprüfen, wurden die resultierenden Lumineszenzwerte der freien und immobilisierten Zellen nach der Induktion miteinander verglichen.

3.1.2.1 Immobilisierung im Polyacrylamid

Die Ergebnisse in Abb. 3.1.2.1 zeigen, daß die Luziferase-Aktivität der im Polyacrylamid immobilisierten Zellen nur 25 % von der Luziferase-Aktivität der freien APL-Zellen betrug. Daraus ließ sich folgern, daß nur etwa 25 % der Zellen den radikalen Immobilisierungsvorgang überleben konnten. Dies erklärt auch die zur Immobilisierung benötigte große Menge an Zellen und die extrem lange Induktionszeit für eine detektierbare Biolumineszenz. Ferner ließ sich aus der Beobachtung der verzögerten Lichtausstrahlung nach der Zugabe von Substrat schließen, daß das Polyacrylamid eine Diffusionsbarriere für die Substratlösung war. Obwohl das Polyacrylamid einige vorteilhafte physikalische Eigenschaften hat, wurde der Versuch mit Polyacrylamid aufgrund seiner toxischen Wirkung auf die Zellen nicht fortgesetzt.

3.1.2.2 Immobilisierung im Agar

Die im Agar immobilisierten, bereits vor der Immobilisierung induzierten Zellen zeigten vergleichbare Biolumineszenzwerte wie die Zellen aus derselben Quelle im freien Zustand (Abb. 3.4 a). Der Einfluß der Immobilisierung wurde ferner durch den Induktionsversuch

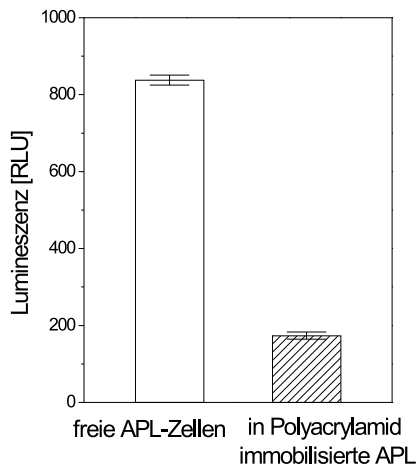


Abb. 3.3: Luziferase-Aktivität des induzierten APL im freien Zustand und nach der Immobilisierung im Polyacrylamid. Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurden $100 \mu\text{l}$ Substratlösung pro Kavität zugesetzt. $n = 12$.

untersucht. Um gleiche Bedingungen für freie und immobilisierte Zellen zu erhalten, wurde für die Bereitstellung der freien Zellen die Zellsuspension verwendet, die für die Immobilisierung vorbereitet wurden, und mit ddH_2O vermischt, dessen Volumen dem des flüssigen Agars zur Immobilisierung gleich war. Freie und immobilisierte Zellen wurden dann gleichzeitig in derselben Weise induziert. Abb. 3.4 b zeigt die resultierenden Biolumineszenzwerte der Zellen beider Zustände. Da kein erkennbarer negativer Einfluß der Immobilisierung auf die Induktion festgestellt werden konnte, wurde das Agar als die geeignete Matrix für die Immobilisierung der APL-Zellen zur Herstellung eines leicht zu bedienenden cyanobakteriellen Sensors ausgewählt. Der daraus resultierende Sensor wird in dieser Arbeit als CyanoSensor bezeichnet.

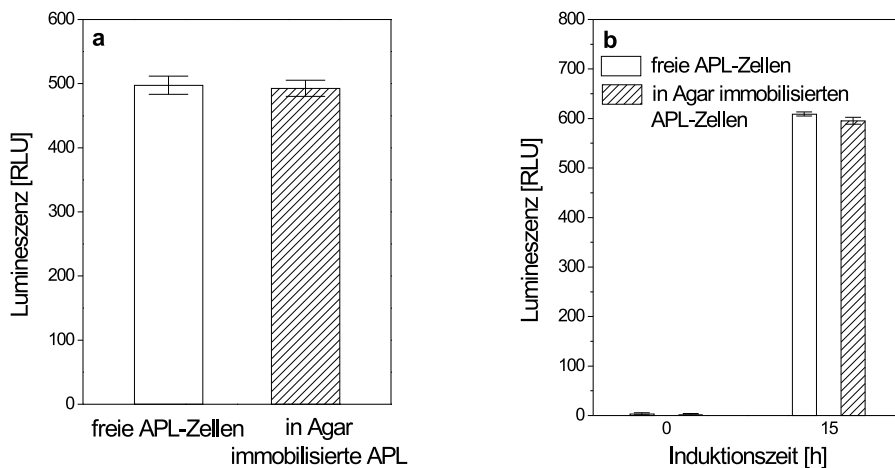


Abb. 3.4: Einfluß der Immobilisierung des Reporterstamms im Agar. a: Luziferase-Aktivität des bereits induzierten APL im freien Zustand und nach der Immobilisierung im Agar; b: die durch Phosphatlimitierung induzierte Luziferase-Aktivität des freien und des im Agar immobilisierten APL. Die Induktion in b wurde mit $1,5 \text{ ml BG-11}_{(-P)}$ pro Kavität unter Beleuchtung von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 15 h durchgeführt. Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurden $100 \mu\text{l}$ Substratlösung pro Kavität zugesetzt. $n = 6$.

3.1.2.3 Einfluß der Zelldichte auf die Lumineszenzmessung

Der Einfluß der zur Immobilisierung eingesetzten Zelldichte der Zellsuspension wurde in Hinblick auf die resultierende Lumineszenz nach Induktion untersucht. Um die exakte Zelldichte zu erhalten, wurde das Pellet einer bei $OD_{720} = 0,5$ geernteten 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur mit 1/500-BG-11^{Hepes, Strp} resuspendiert, auf die entsprechenden OD_{720} -Werte eingestellt und im Agar immobilisiert. Abb. 3.5 zeigt die gemessenen Lumineszenzwerte der immobilisierten APL-Zellen verschiedener Zelldichten nach der 15stündigen Inkubation mit 1/1 000-BG-11 ($[PO_4^{3-}] = 0,24 \mu M$) unter Beleuchtung von $50 \mu E m^{-2} sec^{-1}$. Während die Lumineszenzwerte bei $OD_{720} \leq 1,5$ mit der zunehmenden Zelldichte stiegen, sanken die gemessenen Lumineszenzwerte oberhalb von $OD_{720} = 1,5$ und konvergierten gegen eine Asymptote. Da der höchste Lumineszenzwert bei $OD_{720} = 1,5$ gemessen werden konnte, wurde eine Zellsuspension von $OD_{720} = 1,5$ für die Immobilisierung bei den weiteren Untersuchungen verwendet.

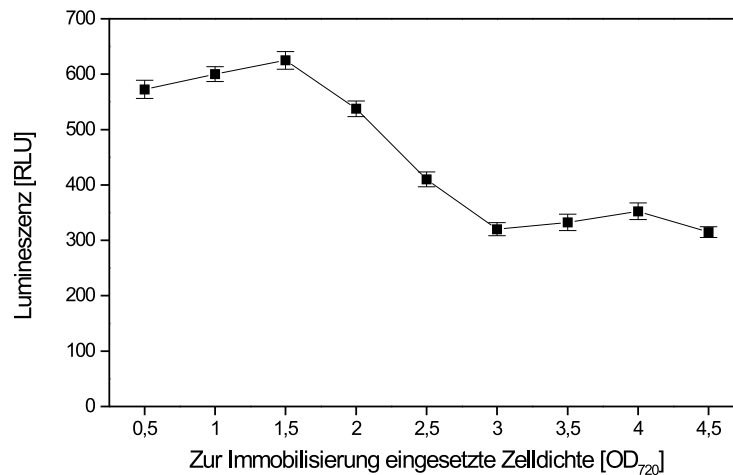


Abb. 3.5: Einfluß der Zelldichte der zur Immobilisierung eingesetzten Zellsuspension auf die Lumineszenzmessung. Die Zellsuspension mit unterschiedlichen Zelldichten wurde im Agar immobilisiert und für die Induktion 15 h mit 1/1 000-BG-11 ($[PO_4^{3-}] = 0,24 \mu M$) unter Beleuchtung von $50 \mu E m^{-2} sec^{-1}$ inkubiert. Zur Messung der resultierenden Luziferase-Aktivität wurden $100 \mu l$ Substratlösung pro Kavität zugesetzt. $n = 3$.

3.1.3 Optimierung und Charakterisierung des CyanoSensors

Um einen leicht zu bedienenden bakteriellen Reporterassay mittels CyanoSensors zu entwickeln, der aus den in Agar immobilisierten APL-Zellen bestand, wurden die Durchführungsparameter dieses Sensors optimiert. Anschließend wurden die Eigenschaften des CyanoSensors charakterisiert.

3.1.3.1 Einfluß der Beleuchtungsintensität auf die Induktion

Um den Einfluß der Beleuchtungsintensität auf die Induktion zu ermitteln, wurden immobilisierten APL-Zellen mit Standardlösungen, die unterschiedliche PO_4^{3-} -Konzentrationen enthielten, unter verschiedenen Beleuchtungsstärken ($(0-50) \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 15 h inkubiert. Es wurde keine Luziferase-Aktivität in dem im Dunkeln inkubierten Sensor gemessen (Abb. 3.6). Unter Beleuchtung zeigten die Sensorzellen Lumineszenzwerte in Abhängigkeit von der PO_4^{3-} -Konzentration. Damit erfüllte dieser Sensor die Anwendungsvoraussetzung. Gleichzeitig zeigten die Induktionsergebnisse, daß die resultierenden Lumineszenzwerte mit den getesteten Lichtintensitäten korrelierten. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Beleuchtungseinrichtung mit einstellbarer Lichtstärke und homogener Lichtverteilung konstruiert (2.4.1 und Anhang A.3), die bei der Verwendung dieses Sensors unentbehrlich ist. Für die weiteren Versuche wurde eine Beleuchtungsintensität von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ eingestellt, die für die Kultivierung von APL sowie seinen Wildtypstamm *Synechococcus* PCC 7942 im Labor standardmäßig eingesetzt wurde und mit der die höchste Empfindlichkeit des Sensors in diesem Versuch gemessen wurde.

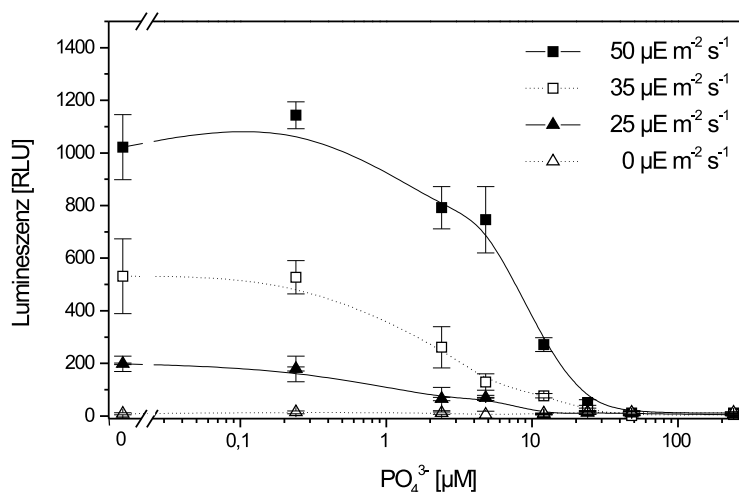


Abb. 3.6: Induktion des Sensors in Abhängigkeit von der PO_4^{3-} -Konzentration und der Beleuchtungsintensität. Die Sensorzellen stammten aus einer $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur mit $\text{OD}_{720} = 0,55$. Induktionszeit: 15 h. Zur Messung der resultierenden Luziferase-Aktivität wurden $100 \mu\text{l}$ Substratlösung pro Kavität zugesetzt. $n = 3$.

3.1.3.2 Einfluß der Substratmenge auf die Lumineszenzmessung

Um die für die Lumineszenzmessung benötigte Substratmenge zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen der Substratlösung zu den immobilisierten APL-Zellen zugesetzt, die aus $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur bei $\text{OD}_{720} = 1,0$ stammten. Die Zellen waren bereits vor der Immobilisierung induziert, allerdings nicht so stark wie ein fertiger CyanoSensor nach 15 h Inkubation mit $\text{BG-11}_{(-\text{P})}$ unter Beleuchtung von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Die Messung erfolgte sofort nach der Immobilisierung. Die gemessenen Lumineszenzwerte in Abb. 3.7 zeigen, daß die Substratlösung unterhalb von $80 \mu\text{l}$ pro Kavität für die vorhande-

ne Luziferase nicht ausreichte und in größerer Menge ab 125 μl pro Kavität einen leichten Hemmungseffekt ausübte. Mit 100 μl der Substratlösung pro Kavität wurde die höchste Luziferase-Aktivität gemessen. Bei der Verwendung von derselben Substratmenge in der Lumineszenzmessung eines Fe-Reporterstamms stellte sich heraus, daß diese Substratmenge durchaus ausreichend war, die Luziferase-Aktivität unter gleichen Meßbedingungen bis auf 150 000 RLU zu messen (Schreiter 2000). Für die weiteren Experimente wurden daher 100 μl der Substratlösung pro Kavität für die Lumineszenzmessung zugesetzt.

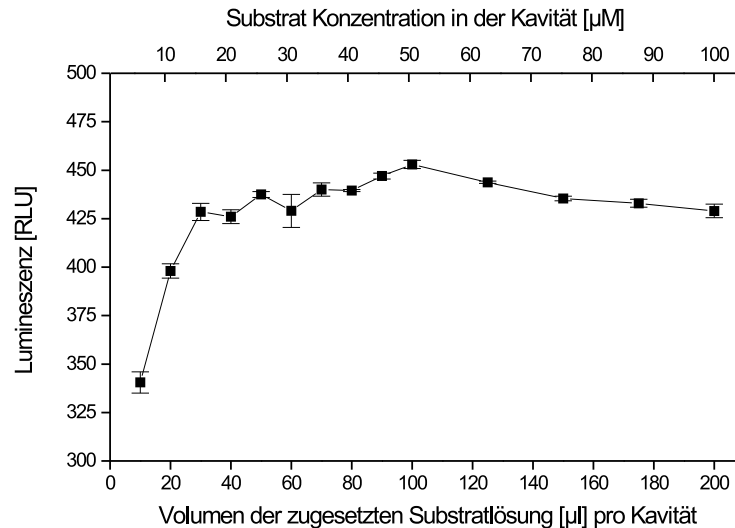


Abb. 3.7: Einfluß der Substratmenge auf die Messung der Luziferase-Aktivität der immobilisierten APL-Zellen, die bereits vor der Immobilisierung Luziferase-Aktivität aufwiesen. Die Messung erfolgte sofort nach der Immobilisierung ohne weitere Induktion. $n = 3$.

3.1.3.3 Einfluß der Kultivierungsgeschichte auf den CyanoSensor

Die Ergebnisse in Abb. 3.2 (S. 39) sind die Anzeichen dafür, daß sowohl die PO_4^{3-} -Konzentration in den Medien als auch die Wachstumsphase die Induktion der Bildung von Luziferase in Sensorzellen beeinflussen können. Um den Einfluß der Kultivierungsgeschichte auf die Eigenschaften des Reporterassays zu untersuchen, wurden die Zellen, die ebenfalls für die Charakterisierung der Flüssigkulturen in 3.1.1 (S. 38) verwendet wurde, immobilisiert und anschließend induziert. In Abb. 3.8 werden die Induktionsergebnisse dieser Sensoren dargestellt. Allgemein reagierten die Sensorzellen aus der 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur auf die Phosphatlimitierung früher und wurden stärker induziert als die Sensorzellen aus der BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur. Für beide Kulturen konnte festgestellt werden, daß die aufbereiteten Sensoren desto stärker induziert werden konnten, je älter die zur Immobilisierung eingesetzte Kultur war, wenn sich die Kultur noch in der logarithmischen Phase befand. Nach Eintreten in die stationäre Phase ($\text{OD}_{720} = 1,0$ in Abb. 3.8 a und $\text{OD}_{720} = 0,89$ in Abb. 3.8 b) sank die Induzierbarkeit der daraus aufbereiteten Sensoren. Um einen schnellen Assay mit hoher Empfindlichkeit zu entwickeln, wurden daher zur Herstellung des CyanoSensors die APL-Zellen aus der 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur bei $\text{OD}_{720} = 0,5 - 0,8$ verwendet.

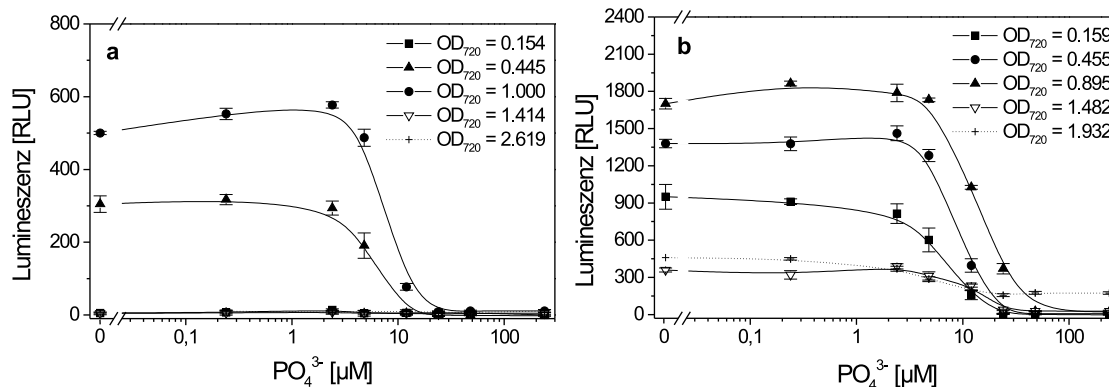


Abb. 3.8: Einfluß der Kultivierungsgeschichte auf CyanoSensor. Die Sensoren wurden mit den Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen (OD_{720}) hergestellt. Die Zellen stammten aus denselben Kulturen, die zur Charakterisierung der APL-Flüssigkultur in Abb. 3.2 verwendet wurden. a: Sensorzellen aus BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur; b: Sensorzellen aus 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur. Induktionszeit: 17 h. $n = 3$.

3.1.3.4 Induktionsdauer

Da sich der Gehalt an anorganischem Phosphat in einem Ökosystem durch biologische Tätigkeiten und chemische Prozesse ständig ändert, ist in Hinblick auf die Überwachung der Eutrophierung die Durchführungszeit einer Analyse ein kritischer Faktor. Im CyanoSensor-System ist die Induktionsdauer die maßgebliche Größe, die die gesamte Durchführungszeit des Assays bestimmt. Die kürzeste Probeninkubationszeit, die der CyanoSensor zur Erstellung einer quantifizierbaren Korrelation zwischen den PO_4^{3-} -Konzentrationen und den resultierenden Lumineszenzwerten brauchte, betrug bei den Messungen zur vorliegenden Arbeit 8 h (Abb. 3.9). Bei dieser Probeninkubationszeit liegt der Meßbereich bei

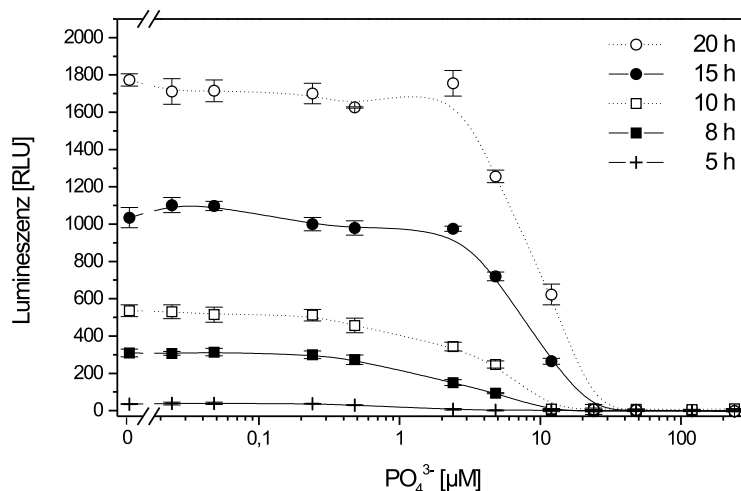


Abb. 3.9: Induktion der Biolumineszenz im CyanoSensor in Abhängigkeit von der Probeninkubationszeit. Die Sensorzellen stammten aus einer 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur mit $OD_{720} = 0,55$. $n = 3$.

$0,3\ \mu\text{M} - 8\ \mu\text{M}\ \text{PO}_4^{3-}$. Bei Verlängerung der Probeninkubationszeit nahm die Luziferaseproduktion zu, wodurch die Empfindlichkeit des Sensors verbessert werden konnte. Die Lumineszenzwerte der Sensoren nach einer 15stündigen Inkubation waren dreimal so groß wie die nach einer Inkubation von 8 h, jedoch mit höheren Abweichungen verbunden. Ferner verschob sich der Meßbereich mit der Verlängerung der Inkubationsdauer. Zum Beispiel liegt der Meßbereich nach einer Inkubation von 15 h mit Standardlösungen bei $3\ \mu\text{M} - 15\ \mu\text{M}\ \text{PO}_4^{3-}$. Aus pragmatischen Gründen wurden die weiteren Induktionsversuche über Nacht durchgeführt.

3.1.3.5 Lagerungsstabilität

Die biologische Aktivität eines gelagerten CyanoSensors wurde anhand des Ausmaßes der induzierten Biolumineszenz in Sensorzellen untersucht. Abb. 3.10 zeigt, daß die durch eine Phosphatlimitierung induzierte Luziferase-Aktivität eines 3 Wochen alten CyanoSensors nicht so groß war wie die eines frisch aufbereiteten CyanoSensors. Durch eine verlängerte Induktion näherten sich jedoch die Lumineszenzwerte des gelagerten Sensors denen des frisch aufbereiteten CyanoSensors. Der 99 Tage lang gelagerte CyanoSensor zeigte ähnliche Verhältnisse, bedurfte jedoch einer viel längeren Induktionszeit (43 h), um überhaupt eine konzentrationsabhängige Induktion aufzuweisen. Im Vergleich zu dem frisch aufbereiteten Sensor hatten die gelagerten Sensoren breitere Meßbereiche in niedrigeren Konzentrationsbereichen.

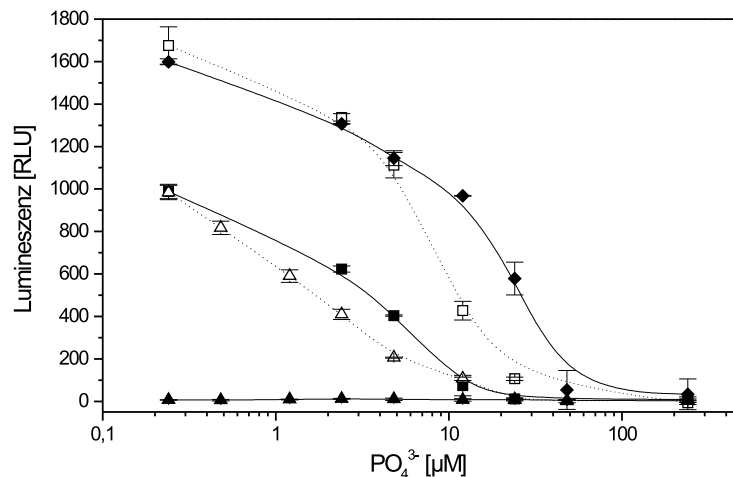


Abb. 3.10: Induktion eines frisch hergestellten CyanoSensors und der Sensoren aus derselben Charge nach dreiwöchiger bzw. 99tätiger Lagerung bei $4\ ^\circ\text{C}$ im Dunkeln. Der frisch aufbereitete Sensor wurde mit Standardlösungen 18 h (\blacklozenge), der 3 Wochen alte Sensor 18 h (\blacksquare) sowie 24 h (\square), und der 99 Tage alte Sensor 18 h (\blacktriangle) sowie 43 h (\triangle) inkubiert. Die Sensorzellen stammten aus einer $1/5\text{-BG-11}^{\text{Hepes, Strp}}$ -Kultur mit $\text{OD}_{720} = 0,55$. $n = 3$.

3.1.3.6 Analytenspektrum des CyanoSensors

Mit dem folgenden Versuch sollte gezeigt werden, ob und inwieweit der CyanoSensor außer anorganischem Phosphat organische Phosphatester ebenfalls als Phosphorquelle erfassen konnte. Alle fünf getesteten organischen Phosphatester haben eine Inhibitionswirkung auf die Lichtausstrahlung des CyanoSensors (Abb. 3.11), was ein Indiz dafür war, daß sie in der Tat als die Phosphorquelle für die Sensorzellen fungierten. Abhängig von Estern änderte sich das Ausmaß der Inhibition stark: β -Glycerophosphat schien für die Zellen am wenigsten verfügbar, während D-Glucose-6-phosphat, D-Fructose-6-phosphat und D-3-Phosphoglycerinsäure scheinbar besser von den Zellen verwertet werden konnten. Dennoch waren die letzten drei organischen Phosphatester für die Sensorzellen 10fach weniger effektiv verfügbar als das anorganische Phosphat. Wahrscheinlich ist der Unterschied in der Bioverfügbarkeit auf das Substratspektrum der Phosphatase zurückzuführen.

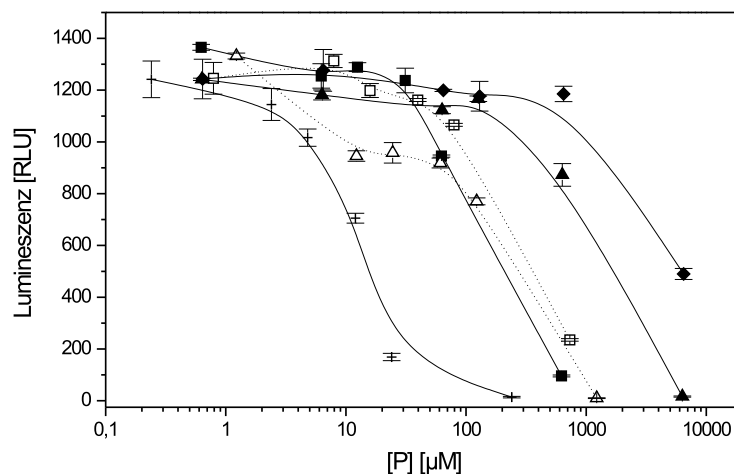


Abb. 3.11: Analytenspektrum des CyanoSensors. +: K₂HPO₄; ■: D-Glucose-6-phosphat; □: D-Fructose-6-phosphat; ▲: α-Glycerophosphat; ◆: β-Glycerophosphat; △: D-3-Phosphoglycerinsäure. Die Sensorzellen stammten aus einer 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur mit OD₇₂₀ = 0,66. Induktionszeit: 17 h. n = 3.

3.1.3.7 Messung der PO₄³⁻-Konzentration in künstlichen Proben mittels CyanoSensor

Die Validierung des CyanoSensors begann mit der Messung der PO₄³⁻-Konzentration in den künstlichen phosphathaltigen Proben mit diesem Sensor. Als Referenzmethode diente ein Kit von Merck, das auf der photometrischen Messung von Phosphormolybdänblau basiert und dessen Genauigkeit mit der Standardmethode DIN 38 405 vergleichbar ist (Zimmermann und Platen 2000). Die Originalprobenlösungen wurden zunächst mit einem doppelt konzentrierten BG-11_(-P)-Medium vermischt, um zu vermeiden, daß die anderen Nährstoffe im Unterschuß standen, was den physiologischen Zustand der Sensorzellen beeinflussen und zu Artefakten führen könnte. Die Probenlösungen wurden bei Bedarf

weiter mit BG-11_(-P) in unterschiedlichen Stufen verdünnt, so daß für jede Originalprobe mindestens eine Verdünnungsstufe vorhanden war, deren PO_4^{3-} -Konzentration mittels des CyanoSensors bestimmt werden konnte, es sei denn, daß die PO_4^{3-} -Konzentration der Originalprobe bereits unterhalb der Meßgrenze lag. Wie Abb. 3.12 zeigt, bestand eine gute Korrelation zwischen den beiden Meßsystemen. Für die Proben mit Leitungswasser und entgastem Mineralwasser als Matrices wurden die Korrelationskoeffizienten 99,2 % und 98,7 % berechnet.

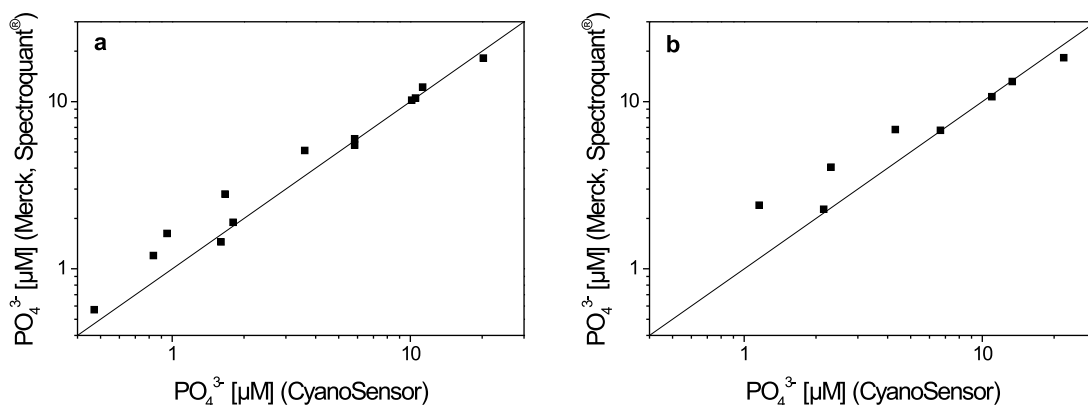


Abb. 3.12: Vergleich der mittels CyanoSensors und einer photometrischen Methode ermittelten PO_4^{3-} -Konzentrationen in künstlichen Proben. a: Leitungswasser als Probenmatrix; b: entgastem Mineralwasser als Probenmatrix.

3.2 Entwicklung eines Oligonukleotid-Mikroarrays zur Detektion von *Microcystis*-Stämmen und des Gens der Microcystin-Synthetase

Die Grundlage der Mikroarraytechnologie basiert auf der DNA-Hybridisierung. Hierfür werden die markierten Targets mit den unmarkierten, auf einem Trägermaterial gebundenen Sonden hybridisiert. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll ein Oligonukleotid-Mikroarray zur Detektion von *Microcystis*-Stämmen und des Gens der Microcystin-Synthetase (*mcy*), die für die nichtribosomale Biosynthese des hepatotoxischen Cyanotoxins Microcystins zuständig ist, entwickelt werden. Das resultierende Array, das die Sonden zum Lösen der beiden Aufgaben einhielt, wird als CyanoArray bezeichnet. Zum Inhalt dieser Arbeit zählten die Etablierung und Optimierung der bestehenden Techniken der Arrayherstellung, die Verbesserung der Methoden zur Targetmarkierung, der Sondenentwurf und das Erreichen der theoretisch erwarteten Sondenpezifität durch geeignete Hybridisierungsbedingungen. Das entstandene CyanoArray wurde anschließend in Umweltproben getestet.

3.2.1 Herstellung des Oligonukleotid-Mikroarrays

3.2.1.1 Methodische Optimierung

In erster Linie handelt es sich hier um die Immobilisierung der Oligonukleotid-Sonden auf dem Trägermaterial. Es gibt zahlreiche käufliche Objektträger mit unterschiedlich chemisch aktivierten Oberflächen, die allerdings meistens kostspielig sind und entsprechend der Oberflächeneigenschaft oft modifizierte Sonden für die kovalente Bindung benötigen, was wiederum in der Entwicklungsphase eines Mikroarrays hohe Kosten verursachen würde. Ferner wird in manchen Fällen die dazu angewandte Chemie zur Kopplung der Sonden in den Firmen geheim gehalten, wodurch die Optimierung der Arrayherstellung an Grenzen stößt. Bei der Verwendung eines mit einer Aminogruppe aktivierten Objektträgers von der Firma GeneScan sowie den entsprechend modifizierten Sonden stellte sich in einem Vorversuch heraus, daß diese Objektträger starke Chargenunterschiede aufwiesen und ihre Ergebnisse nicht wesentlich besser waren als die bei der Verwendung von preiswerten Poly-L-Lysin-Objektträgern und unmodifizierten Oligonukleotiden. Aus diesem Grund wurden Poly-L-Lysin-Objektträger für die Entwicklung des CyanoArrays eingesetzt.

Abb. 3.13 zeigt die Hybridisierungsergebnisse der Sonden, die in gleicher Weise auf einem käuflichen sowie auf einem selbst hergestellten Poly-L-Lysin-Objektträger immobilisiert wurden. Die Hybridisierung wurden ebenfalls in gleicher Weise durchgeführt. Durch die höhere Signalintensität wies der selbst beschichtete Poly-L-Lysin-Objektträger eine höhere Bindungseffizienz auf. Im Gegensatz zu den Spots auf dem käuflichen Objektträger zeigten die Spots auf dem selbst beschichteten Poly-L-Lysin-Objektträger eine einheitliche Größe. Für die weitere Arrayentwicklung wurden daher nur selbst beschichtete Poly-L-Lysin-Objektträger eingesetzt.

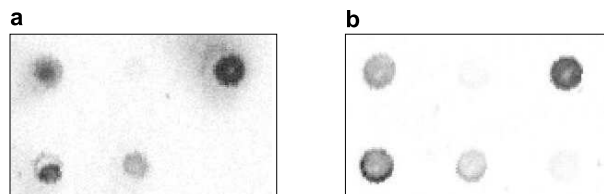


Abb. 3.13: Einfluß des verwendeten Poly-L-Lysin-Objektträgers auf die Qualität des Arrays. Die Bilder sind gescannte Hybridisierungsergebnisse der auf Poly-L-Lysin-Objektträger unterschiedlicher Herkunft immobilisierten Sonden. a: Poly-L-Lysin-Objektträger von Sigma; b: selbst beschichteter Poly-L-Lysin-Objektträger. Als Target wurde die markierte 16S rDNA von *M. wesenbergii* NIES 112 ohne enzymatischen Verdau eingesetzt. Alle in diesem Versuch verwendeten Sonden, die aus einem Vorversuch stammten, sind spezifisch für das Target und entsprechen nicht den in Tab. 3.1 aufgelisteten Sonden. Zum Drucken der Sonden wurde der Puffer von der Firma GeneScan verwendet. Hybridisierung: 16 h bei 50 °C.

Die Ergebnisse des folgenden Versuchs sollten den Einfluß der Pufferlösung, in der die Sonden zum Drucken gelöst sind, auf die Qualität des Arrays verdeutlichen. Dazu wurde die Sondenstammllösung (100 μ M in 0,5 \times TE) mit unterschiedlichen Pufferlösungen auf 20 μ M verdünnt, auf demselben Poly-L-Lysin-Objektträger immobilisiert und gleichzeitig mit derselben Targetlösung hybridisiert. Wie Abb. 3.14 zeigt, sind die Größen des

Spots bei der Verwendung von $3\times$ SSC + 50 % DMSO (Abb. 3.14 a) sehr unterschiedlich. Mit $3\times$ SSC (Abb. 3.14 b) konnten zwar Spots einheitlicher Größe erzeugt werden, die Bindungseffizienz war jedoch im Vergleich zu 50 % DMSO (Abb. 3.14 c) niedrig. Außerdem war die Homogenität dieser Spots oft schlecht. Der kommerzielle Puffer (Abb. 3.14 d) wies die höchste Bindungseffizienz auf. Mit 50 % DMSO konnte man Sondenspots mit sehr guter Homogenität erhalten. Mit den beiden zuletzt genannten Puffern konnten Spots einheitlicher Größe erzeugt werden. Bezüglich der Homogenität der Sondenspots und ausreichender Bindungseffizienz, die durch mehreren Untersuchungen bestätigt werden konnte, wurde für die weitere Herstellung der Arrays das leichter zugängliche und kostengünstige 50 %ige DMSO benutzt.

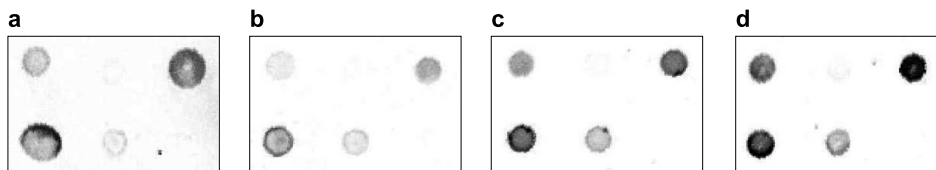


Abb. 3.14: Einfluß des zum Drucken der Sonden verwendeten Puffers auf die Qualität des Arrays. a: $3\times$ SSC + 50 % DMSO; b: $3\times$ SSC; c: 50 % DMSO; d: Puffer von der Firma GeneScan. Als Target wurde die markierte 16S rDNA von *M. wesenbergii* NIES 112 ohne enzymatischen Verdau eingesetzt. Alle in diesem Versuch verwendeten Sonden, die aus einem Vorversuch stammten, sind spezifisch für das Target und unterscheiden sich von den in Tab. 3.1 aufgelisteten Sonden. Hybridisierung: 16 h bei 50 °C.

3.2.2 Vorbereitung der Targets

3.2.2.1 Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung einzelner Targets mittels Single-PCR

Ausgehend davon, daß die Targetsequenzen in einer Umweltprobe nur in wenigen Kopien vorhanden sein könnten, wurden zur Sensibilitätserhöhung des Testsystems die einzelnen Targets mit ihrem spezifischen Primerpaar mittels Single-PCR amplifiziert. Während der PCR können die PCR-Produkte durch Einbau von Cy3-dUTP anstelle von dTTP fluoreszenzmarkiert werden. Theoretisch sollen die Ergebnisse der Single-PCR mit und ohne Fluoreszenzmarkierung qualitativ identisch sein, was auch Voraussetzung für die Anwendung dieser Markierungstechnik ist. Aus diesem Grund werden die Spezifität der Primer und die PCR-Bedingungen, deren Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zunächst ohne Markierung begonnen wurden, hier nur anhand der PCR-Ergebnisse mit Fluoreszenzmarkierung gezeigt (Abb. 3.15).

Wie erwartet, konnte die nahezu vollständige 16S rDNA mit dem Primerpaar 16_f und 16_r, das bereits als Sequenzierungsprimer der bakteriellen 16S rDNA in vielen Arbeiten verwendet wurde (Lane 1991; Petri 2000), aus Bakterien amplifiziert werden (Abb. 3.15 a). Mit diesem Primerpaar wurde kein PCR-Produkt aus der Hefe *Pichia pastoris*, einem Eukaryoten, erzeugt. Mit demselben PCR-Programm, kombiniert jeweils mit einem anderen selektiven Primerpaar (methyl_f und methyl_r oder mcyBC_f und mcyBC_r) konnten *mcyA*(NMT) (1,1 kb) bzw. *mcyB-mcyC* (700 bp) aus den microcystinbildenden *Micro-*

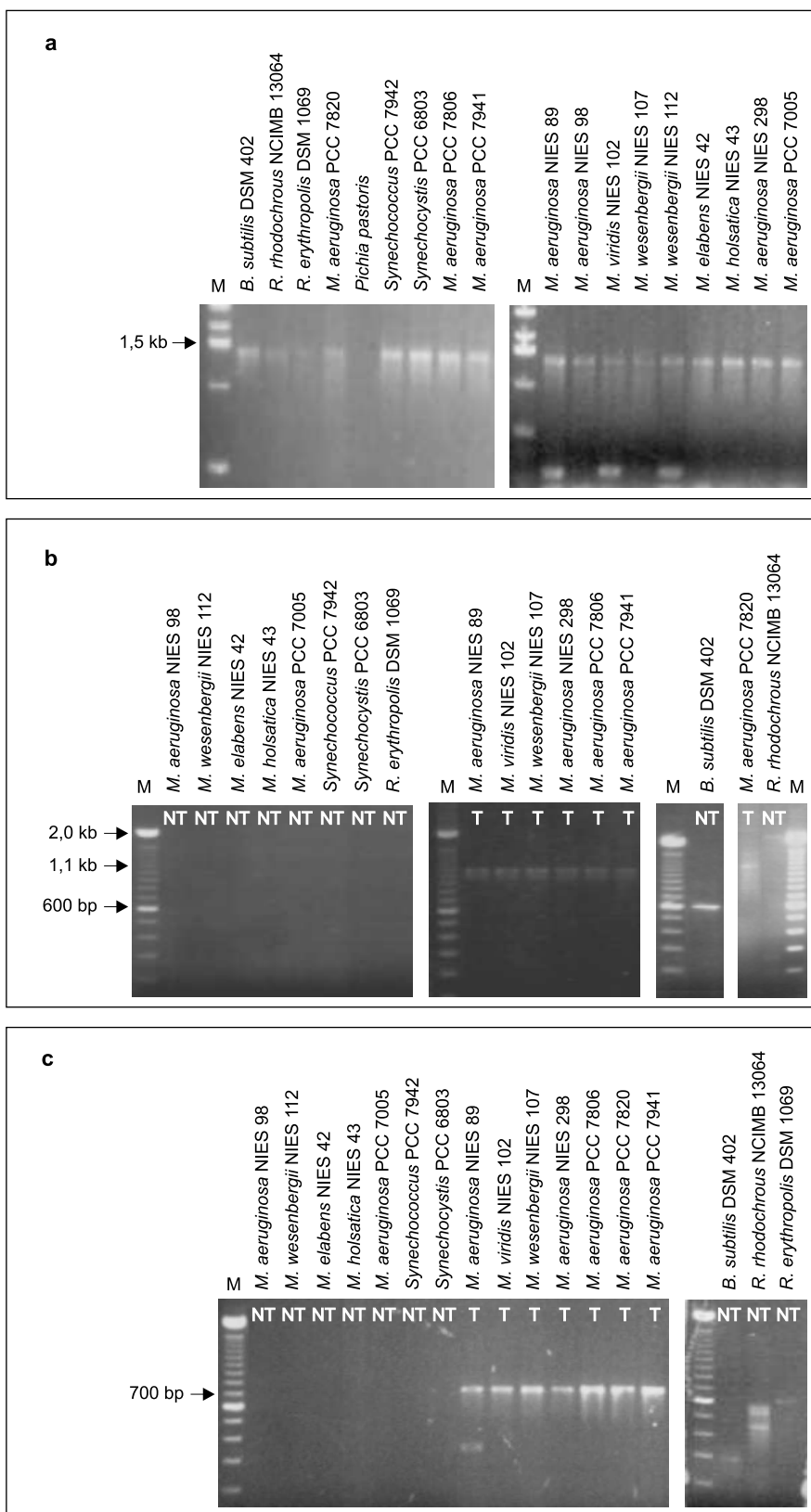


Abb. 3.15: Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung einzelner Targets mittels Single-PCR. a: 16S rDNA (1,5kb); b: *mcyA(NMT)* (1,1 kb); c: *mcyB-mcyC* (700 bp). T (toxisch) und NT (nicht toxisch) beziehen sich auf „Microcystinbildung“ sowie „keine Microcystinbildung“.

cystis-Stämmen amplifiziert werden, aber nicht aus den microcystinnichtproduzierenden *Microcystis*-Stämmen und anderen (Cyano-)Bakterien (Abb. 3.15 b und Abb. 3.15 c). Bemerkenswert sind einige unspezifische Amplikons mittels mcyBC_f und mcyBC_r oder methyl_f und methyl_r aus *Bacillus subtilis* DSM 402, *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069² und *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064.

Mangels eines geeigneten Filters zur Detektion konnten die mit Cy3-dUTP markierten PCR-Produkte nicht exakt quantifiziert werden. Während der methodischen Entwicklung wurden die Ergebnisse einer PCR mit Fluoreszenzmarkierung nur nach der Färbung mit Ethidiumbromid und anschließender Anregung mit UV-Licht dokumentiert. Dabei konnten die Amplikons mit und ohne Fluoreszenzmarkierung nicht voneinander unterschieden werden. Durch den Vergleich wiederholter Versuche stellte sich jedoch heraus, daß die Single-PCR mit Fluoreszenzmarkierung quantitativ reproduzierbar war und die markierten Amplikons zuverlässig im gesamten PCR-Produkt vorhanden waren, wenn die Detektion mit Ethidiumbromid positiv war. Laut Literatur (Molecular Dynamics 1999) soll die Ausbeute einer PCR unter der Verwendung von Cy3-dUTP in der eingesetzten Konzentration (2.5.4.2, S. 31) im PCR-Reaktionsgemisch etwa 62 % der Ausbeute einer gleichen PCR ohne Markierung betragen. Demzufolge konnte die Konzentration der mittels Single-PCR fluoreszenzmarkierten Targets im hier verwendeten System von (4,2 – 12) ng/ μ l geschätzt werden.

3.2.2.2 Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung mehrerer Targets mittels Multiplex-PCR

In der Bemühung, die Vorbereitung der Targets zu vereinfachen, wurde versucht, die unterschiedlichen, als Targets eingesetzten Fragmente gleichzeitig in einer sogenannten Multiplex-PCR zu amplifizieren und zu markieren. Aus dem in 3.2.5.1 unter Punkt „Hybridisierung des Targets *mcyB-mcyC* mit dem Array“ (S. 60) genannten Grund wurde hier nur 16S rDNA und *mcyA(NMT)* ins Auge gefaßt. Bevor mit der Markierung begonnen wurde, wurde die Einsetzbarkeit einer Multiplex-PCR zunächst ohne Markierung überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die verwendete Taq-DNA-Polymerase eine entscheidende Rolle in den Ergebnissen einer Multiplex-PCR spielte. Während die Multiplex-PCR mit Taq-Polymerase von MBI und Eppendorf oft mißlang bzw. nicht immer zufriedenstellend war, konnten mit HotStarTaqTM-DNA-Polymerase von Qiagen und Ready-to-go PCR-Beads von Amersham Pharmacia stets gute Ergebnisse einer Multiplex-PCR erzielt werden. Da die Verhältnisse der vier dNTPs in Ready-to-go PCR-Beads unveränderbar 1:1:1:1 sind und ihre absoluten Konzentrationen auf anderen Komponenten mit ebenfalls unbekanntem Konzentrationen für eine Single-PCR optimiert sind, bleibt in diesem System weniger Spielraum für den Einsatz von Cy3-dUTP zur Markierung. Außerdem wurde festgestellt, daß bei der Verwendung von Ready-to-go PCR-Beads ein Einsatz von 25 μ l mehr als 0,5 μ l Cy3-dUTP (1 mM) benötigte, um die gleiche Konzentration der markierten PCR-Produkte zu erzeugen, die mittels der HotStarTaqTM-Polymerase in einem 50 μ l Einsatz mit 1,0 μ l Cy3-dUTP (1 mM) erhalten wurde. Die schlechte Einbaurrate von Cy3-

²Mit Hilfe der Sequenzierung wurde nachgewiesen, daß das mittels mcyBC_f und mcyBC_r aus *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069 amplifizierte 600 bp-lange Fragment in Wirklichkeit nur mittels mcyBC_f erzeugt wurde, das zufällig auch als der Rückwärtsprimer des unspezifischen Fragments fungierte. Laut Sequenzvergleich ist dieses Fragment ein Teil einer Hydrolase.

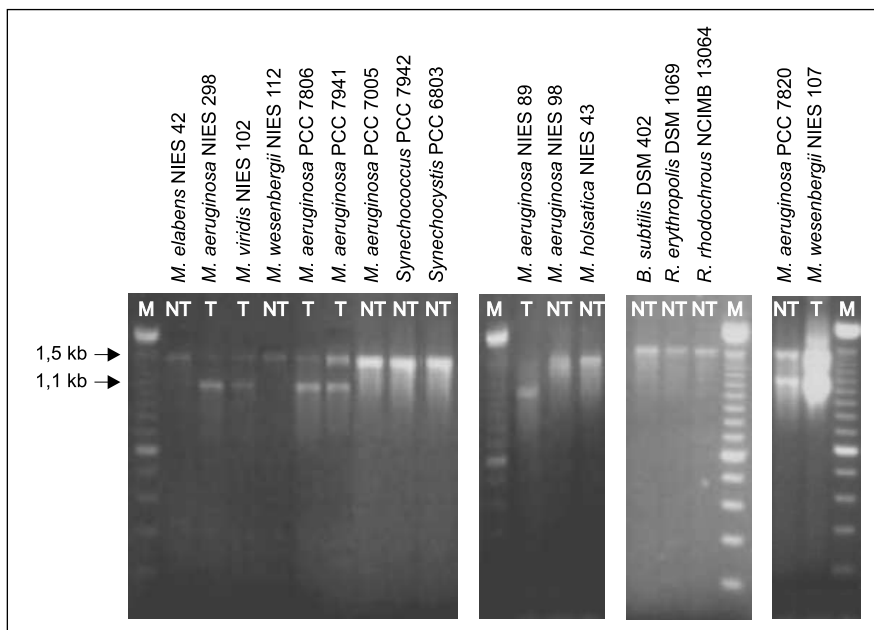


Abb. 3.16: Gleichzeitige Fluoreszenzmarkierung von Targets 16S rDNA (1,5 kb) und *mcyA(NMT)* (1,1 kb) mittels Multiplex-PCR. T (toxisch) und NT (nicht toxisch) beziehen sich auf „Microcystinbildung“ sowie „keine Microcystinbildung“.

dUTP im Ready-to-go System liegt offensichtlich an dem ungünstigen Verhältnis zwischen dTTP und Cy3-dUTP, das durch die in Ready-to-go PCR-Beads festgelegte, jedoch unbekannt Konzentration von dTTP hervorgerufen wurde. Die Fluoreszenzmarkierung mittels Multiplex-PCR wurde daher mit der HotStarTaqTM-DNA-Polymerase durchgeführt. Wie Abb. 3.16 zeigt, konnten 16S rDNA und *mcyA(NMT)* mittels Multiplex-PCR unter Verwendung von HotStarTaqTM-DNA-Polymerase und Cy3-dUTP gleichzeitig aus den microcystinbildenden *Microcystis*-Stämmen amplifiziert und markiert werden, hingegen nur 16S rDNA aus den microcystinnichtproduzierenden *Microcystis*-Stämmen sowie anderen (Cyano-) Bakterien. Bemerkenswert ist das Verschwinden der unspezifischen PCR-Produkte aus *Bacillus subtilis* DSM 402 und *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064, die in der Single-PCR vorkamen (Abb. 3.15 b), obwohl die Annealingtemperatur in der Multiplex-PCR (52 °C) niedriger war als die in der Single-PCR (55 °C). Je nach den Templates war die Amplifikationseffizienz beider Targets zum Teil sehr unterschiedlich, was nicht untypisch für eine Multiplex-PCR mit äquivalenten Primern ist (Henegariu et al. 1997). Dies spielt jedoch keine Rolle in einer qualitativen Methode wie dem hier entwickelten Mikroarray.

3.2.3 Oligonukleotid-Sonden

Damit zu jedem Zweck ausreichend repräsentative Datensätze vorhanden sind, auf die die Qualität der daraus entworfenen Sonden angewiesen ist, wurde beim Sondenentwurf für *mcyB-mcyC* zunächst das *mcyB-mcyC*-Fragment aus fünf microcystinproduzierenden *Microcystis*-Stämmen sequenziert. Zusammen mit *mcyB-mcyC*-Sequenzen aus

sechs anderen toxischen *Microcystis*-Stämmen in der GenBank wurden die Datensätze für *mcyB-mcyC* erstellt. Die Datensätze von *mcyA(NMT)* bestanden aus in der GenBank verfügbaren *mcyA(NMT)*-Sequenzen aus 21 toxischen *Microcystis*-Stämmen. Die von der Arbeitsgruppe ARB (Technische Universität München) veröffentlichten, sequenzabhängig angeordneten (aligned) prokaryotischen 16S rRNAs dienten als Datensätze für die Genotypisierung. Die relativen Positionen der in dieser Arbeit verwendeten Sonden und ihrer Sequenzen stehen in Abb. 3.18 und Tab. 3.1. Die Endungen „f“ und „r“ in der Sondenbezeichnung, die für die Kodierungs- und Antikodierungsrichtung stehen, kennzeichnen die Richtung der Sonden.

Für die Genotypisierung wurden Sonden auf drei phylogenetischen Ebenen verwendet: Universalsonden für alle Eubakterien, Sonden für Cyanobakterien und Sonden für *Microcystis*-Stämme. Die Universalsonden, die ebenfalls als positive Kontrolle des Hybridisierungssystems dienten, die Sonden für Cyanobakterien sowie die vier *Microcystis*-spezifischen Sonden Micr_610_f, Micr_610_r, Micr_998_f und Micr_998_r wurden aus der Literatur teilweise mit Modifikationen unter Berücksichtigung diverser Parameter übernommen. Eine gemeinsame Oligonukleotid-Sonde für alle bisher bekannten *Microcystis*-Stämme ist ohne Einschluß anderer Mikroorganismen nicht möglich. Daher wurden die Sonden für *Microcystis*-Stämme in zwei Gruppen geteilt: die Sonden zur Detektion von *M. elabens* und *M. holsatica*, gekennzeichnet mit „ela/hol“, sowie die für alle anderen *Microcystis*-Stämme spezifischen Sonden mit der Kennzeichnung „Micr“. Die Sonden zur Detektion von *mcyA(NMT)* und *mcyB-mcyC* sind Sondenpaare in Kodierungs- und Antikodierungsrichtung, die sich an vier bzw. fünf verschiedenen Stellen innerhalb der entsprechenden Targetsequenz befanden (Abb. 3.18). Alle Sonden zur Detektion von *mcy* sowie der beide Stämme *M. elabens* und *M. holsatica* wurden mittels der Programme ARB und BLAST in dieser Arbeit entworfen. Die beiden als negative Kontrolle eingesetzten Sonden, Plank und bla, sind laut *in silico* Analyse für *Planktothrix*-Stämme und β -Lactamase spezifisch. Diese stammten jeweils aus dieser Arbeit und von S. Ezaki (2001).

3.2.3.1 Arraylayout

Ein Gesamtüberblick des CyanoArrays kann aus Abb. 2.1 (S. 27) entnommen werden. In Abb. 3.17 wird das Layout eines Subarrays während der Entwicklung des CyanoArrays schematisch dargestellt. Aus dem in 3.2.5.1 (S. 60) genannten Grund enthielt ein Subarray eines fertigen CyanoArrays keine Sonden zur Detektion von *mcyB-mcyC*.

343_f	907_f	1387_f	Cya_361_f	Cya_762_f	Cya_1411_f		methyl_326_f	methyl_500_f	methyl_623_f	methyl_809_f
343_r	907_r	1387_r					methyl_326_r	methyl_500_r	methyl_623_r	methyl_809_r
Micr_610_f	Micr_998_f	ela/hol_623_f				McyBC_152_f	McyBC_221_f	McyBC_262_f	McyBC_304_f	McyBC_451_f
Micr_610_r	Micr_998_r	ela/hol_623_r	Plankt	bla	50 % DMSO	McyBC_152_r	McyBC_221_r	McyBC_262_r	McyBC_304_r	McyBC_451_r

Abb. 3.17: Layout des Subarrays eines CyanoArrays während der Entwicklung. Die theoretische Spezifität der Sonden kann in Tab. 3.1 entnommen werden.

Tab. 3.1: Sonden zur Genotypisierung und Detektion von *mcy*.

Name	Spezifität	Sequenz (5' → 3')	Position	T _d (°C)	Ref. ^e
343_f	Bakterien	TAC GGG AGG CAG CAG	343–357 ^a	50	†
343_r	Bakterien	CTG CTG CCT CCC GTA	357–343 ^a	50	†
907_f	Bakterien	AAA CTC AAA GGA ATT GAC	907–924 ^a	48	†
907_r	Bakterien	GTC AAT TCC TTT GAG TTT	924–907 ^a	48	†
1387_f	Bakterien	CCT TGT ACA CAC CGC CCG G	1388–1406 ^a	64	† ^r
1387_r	Bakterien	CCG GGC GGT GTG TAC AAG G	1406–1388 ^a	64	†
Cya_361_f	Cyanobakterien	GGA ATT TTC CGC AAT GGG	361–378 ^a	54	‡ ^r
Cya_762_f	Cyanobakterien	GAC GAA AGC TAG GGG AGC G	762–780 ^a	62	‡ ^r
Cya_1411_f	Cyanobakterien	CCA TGG AAG YTG GTC AYG	1411–1428 ^a	54–58	¶
Micr_610_f	<i>Microcystis</i> spp. außer <i>M. elabens</i> und <i>M. holsatica</i>	CAG GTT GCT TAA CGA CCT	610–627 ^a	54	§*
Micr_610_r	<i>Microcystis</i> spp. außer <i>M. elabens</i> und <i>M. holsatica</i>	AGG TCG TTA AGC AAC CTG	627–610 ^a	54	§*
Micr_998_f	<i>Microcystis</i> spp. außer <i>M. elabens</i> und <i>M. holsatica</i>	GTC GCG AAC CCT GGT GAA AG	998–1017 ^a	64	§ ^r
Micr_998_r	<i>Microcystis</i> spp. außer <i>M. elabens</i> und <i>M. holsatica</i>	CTT TCA CCA GGG TTC GCG AC	1017–998 ^a	64	§
ela/hol_623_f	<i>M. elabens</i> und <i>M. holsatica</i>	CTC CAT TTG AGC GAT GGA	623–640 ^a	54	‡
ela/hol_623_r	<i>M. elabens</i> und <i>M. holsatica</i>	TCC ATC GCT CAA ATG GAG	640–623 ^a	54	‡
methyl_326_f	<i>mcyA</i> (NMT)	ATT CCA AGT TGC TCC CCA	39174–39191 ^b	54	‡
methyl_326_r	<i>mcyA</i> (NMT)	TGG GGA GCA ACT TGG AAT	39191–39174 ^b	54	‡
methyl_500_f	<i>mcyA</i> (NMT)	CCT TAA CTC GGT TGT GCA	39348–39365 ^b	54	‡
methyl_500_r	<i>mcyA</i> (NMT)	TGC ACA ACC GAG TTA AGG	39365–39348 ^b	54	‡
methyl_623_f	<i>mcyA</i> (NMT)	CAT GGA AGC TTT TCA CGC	39471–39488 ^b	54	‡
methyl_623_r	<i>mcyA</i> (NMT)	GCG TGA AAA GCT TCC ATG	39488–39471 ^b	54	‡
methyl_809_f	<i>mcyA</i> (NMT)	AGG TCA ACA CCA CAA CGA	39657–39674 ^b	54	‡
methyl_809_r	<i>mcyA</i> (NMT)	TCG TTG TGG TGT TGA CCT	39674–39657 ^b	54	‡
mcyBC_152_f	<i>mcyB-mcyC</i>	GAC TCA ATT AAC CCA CTG G	16446–16464 ^c	56	‡
mcyBC_152_r	<i>mcyB-mcyC</i>	CCA GTG GGT TAA TTG AGT C	16464–16446 ^c	56	‡
mcyBC_221_f	<i>mcyB-mcyC</i>	GCA GCA TAT CAG CGA ATG	16515–16532 ^c	54	‡
mcyBC_221_r	<i>mcyB-mcyC</i>	GAT TCG CTG ATA TGC TGC	16532–16515 ^c	54	‡
mcyBC_262_f	<i>mcyB-mcyC</i>	GGC TTG CCA TGA GAA TTA	16556–16573 ^c	52	‡
mcyBC_262_r	<i>mcyB-mcyC</i>	TAA TTC TCA TGG CAA GCC	16573–16556 ^a	52	‡
mcyBC_304_f	<i>mcyB-mcyC</i>	CAG CAG CCT TTC AAG AAC	16598–16615 ^c	54	‡
mcyBC_304_r	<i>mcyB-mcyC</i>	GTT CTT GAA AGG CTG CTG	16615–16598 ^c	54	‡
mcyBC_451_f	<i>mcyB-mcyC</i>	CTG AAC TCT TGG CAG ATG	16745–16752 ^c	54	‡
mcyBC_451_r	<i>mcyB-mcyC</i>	CAT CTG CCA AGA GTT CAG	16752–16745 ^c	54	‡
Plankt	<i>Planktothrix</i> , als negative Kontrolle	AGT CCG TAG GTA GTC ATC	576–583 ^a	54	‡
bla	β -Lactamase als negative Kontrolle	TAT GGC AGC ACT GCA	2172–2186 ^d	46	‡

^a16S rRNA von *E. coli* (Brosius et al. 1978).^bN-Methyltransferase Domäne des Gens *mcyA* von *M. aeruginosa* PCC 7806, Akzessionsnummer: AF183408 (Tillett et al. 2001).^c*mcyABC* von *M. aeruginosa* K-139, Akzessionsnummer: AB019578 (Nishizawa et al. 1999).^dGen der β -Lactamase von *E. coli*, Akzessionsnummer: U04893 (Maneewannakul et al. 1994).^e†: Petri 2000; ‡: Schönhuber et al. 1999; ¶: Neilan et al. 1997b; §: Otsuka et al. 1999; ‡: Ezaki 2001; ‡: diese Arbeit; *: mit leichten Modifikationen; ^r: Sequenz komplementär zu der in der Referenz. Die Namen der Sonden sind teilweise abweichend von denen in der Referenz.

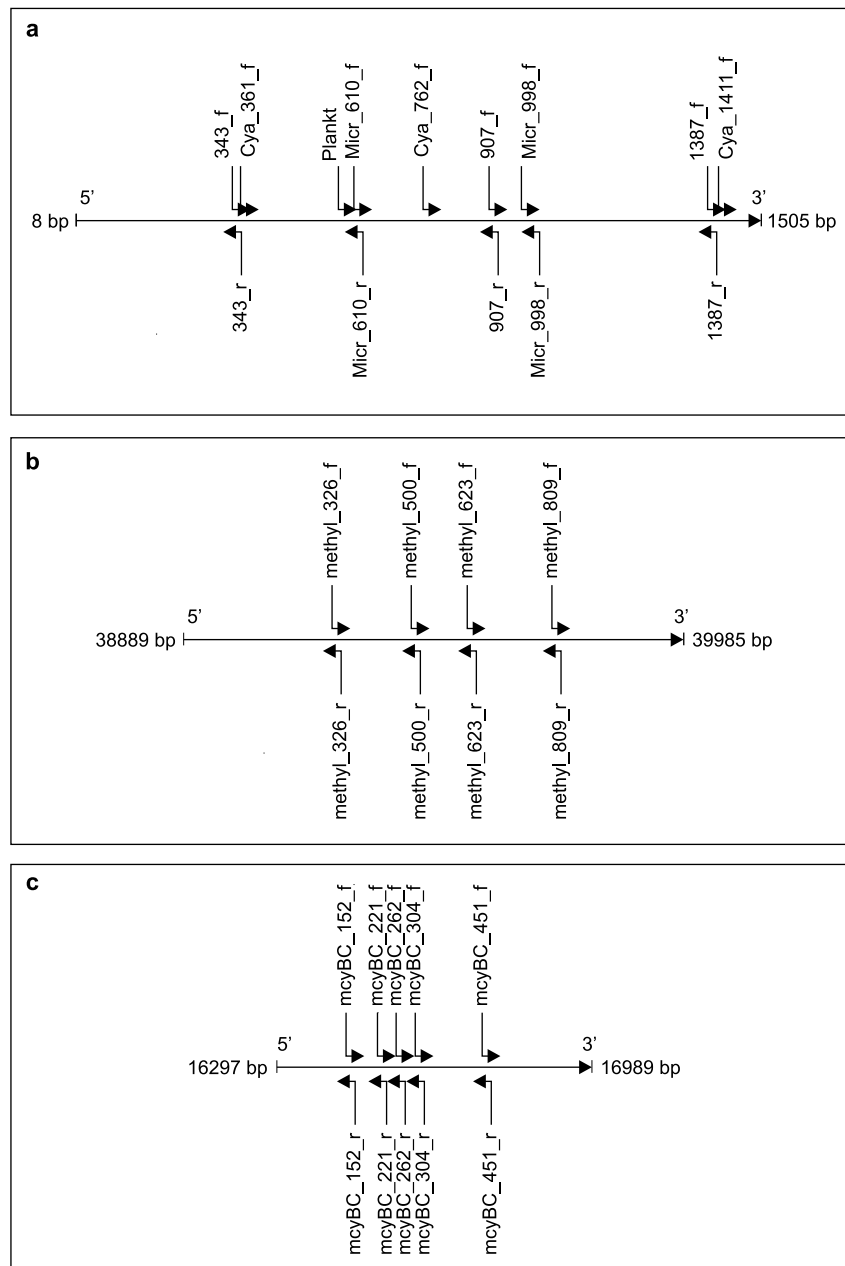


Abb. 3.18: Relative Positionen der verwendeten Sonden in den Targetsequenzen. a: Sonden zur Genotypisierung auf Basis der 16S rDNA; b: Sonden zur Detektion von *mycA(NMT)*; c: Sonden zur Detektion von *mycB-mycC*.

3.2.4 Methodische Entwicklungen in der Hybridisierung zum Erreichen der Sondenspezifität

Anhand der Hybridisierungsergebnisse der 16S rDNA als Target mit den Sonden zur Genotypisierung wurden die Hybridisierungsparameter zum Erreichen der Sondenspezifität untersucht. Basierend auf den Untersuchungsergebnissen der folgenden Parameter wur-

de ein Standardprotokoll zur Durchführung der Hybridisierung mit CyanoArray in 2.5.8 (S. 35) detailliert erfaßt.

3.2.4.1 Enzymatische Behandlung der Targets vor Hybridisierung

Abb. 3.19 zeigt die Hybridisierungsergebnisse der gleichen Menge von fluoreszenzmarkierter 16S rDNA aus *M. aeruginosa* NIES 89, die jeweils vor der Hybridisierung nicht enzymatisch behandelt oder mit DNase 5 min bei RT sowie bei 37 °C partiell verdaut wurde. Selbst bei den Universalsonden für Bakterien war ohne enzymatische Vorbehandlung des Targets keine positive Hybridisierung zustande gekommen. Ein fünfminütiger partieller Verdau des Targets mit DNase bei RT führte zur erwarteten positiven Hybridisierung mit einigen Universalsonden für Bakterien und Cyanobakterien sowie mit den artenspezifischen Sonden Micr_610_r, Micr_998_f und Micr_998_r. Die Hybridisierungssignale verblaßten, wenn der Verdau bei 37 °C mit gleicher Dauer durchgeführt wurde. Dies ist durch den zu weit fortgeschrittenen Verdau zu erklären. Für die weitere Durchführung wurden die Targets vor der Hybridisierung immer mit DNase 5 min bei RT inkubiert.

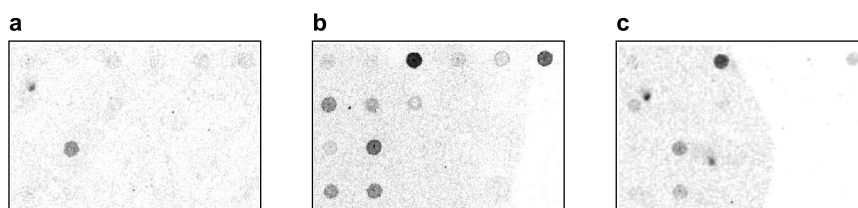


Abb. 3.19: Hybridisierungsergebnisse der 16S rDNA aus *M. aeruginosa* NIES 89 mit unterschiedlicher Behandlung vor der Hybridisierung. a: Target ohne Verdau; b: Target mit 5minütigem DNase-Verdau bei RT; c: Target mit 5minütigem DNase-Verdau bei 37 °C. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 40 °C durchgeführt. Das Layout des Subarrays entspricht den ersten sechs Spalten von links in Abb. 3.17, S. 53.

3.2.4.2 Hybridisierungsdauer

Da kein wesentlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen der Hybridisierung von 5 h bzw. 16 h festzustellen war (Abb. 3.20), wurde bei den weiteren Versuchen eine Hybridisierungszeit von 5 h gewählt, um die Durchführungsdauer der Experimente zu verkürzen.

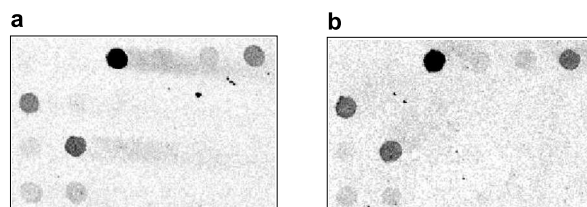


Abb. 3.20: Hybridisierungsergebnisse der 16S rDNA von *M. wesenbergii* NIES 107 nach 5 h (a) und 16 h (b). Die Hybridisierung wurde bei 45 °C durchgeführt. Das Layout des Subarrays entspricht den ersten sechs Spalten von links in Abb. 3.17, S. 53.

3.2.4.3 Hybridisierungstemperatur

Die Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden wird häufig bei einer Temperatur durchgeführt, die 5°C – 10°C unterhalb des Schmelzpunktes der verwendeten Oligonukleotide liegt (Stahl und Amann 1991; Sambrook et al. 2000). Ausgehend von dieser Regel wurden die Targets bei 40°C , 45°C und 50°C mit den Sonden hybridisiert, um die optimale Hybridisierungstemperatur zu ermitteln. Während in der Hybridisierung bei 40°C (Abb. 3.21a) einige unspezifische Signale und bei 50°C (Abb. 3.21c) nur einige der erwarteten spezifischen Signale detektiert wurden, erzielte die Hybridisierung bei 45°C (Abb. 3.21b) zufriedenstellende Ergebnisse. Daher wurden die weiteren Hybridisierungsversuche bei 45°C durchgeführt.

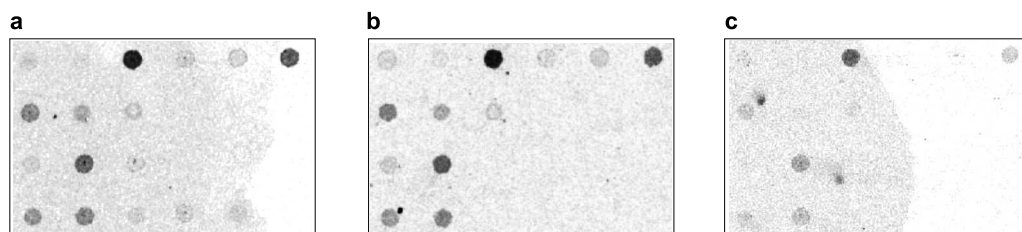


Abb. 3.21: Hybridisierungsergebnisse der 16S rDNA *M. aeruginosa* NIES 89 in $4\times$ SSC. a: 40°C ; b: 45°C ; c: 50°C . Das Layout des Subarrays entspricht den ersten sechs Spalten von links in Abb. 3.17, S. 53.

3.2.4.4 Ionenstärke des Hybridisierungspuffers

Die Stabilität einer Nukleinsäure-Doppelhelix hängt von der Ionenstärke im Hybridisierungspuffer ab. Allgemein steigt die Stabilität einer Doppelhelix mit zunehmender Ionenstärke, gleichzeitig sinkt damit die Stringenz des Hybridisierungssystems. Mit dem folgenden Experiment wurde versucht, durch die niedrigere Stringenz von $6\times$ SSC die theoretisch erwartete aber mit $4\times$ SSC nicht detektierte Hybridisierung zu erzielen. Wie in Abb. 3.22 b dargestellt, trat mit $6\times$ SSC die Hybridisierung mit einigen Sonden auf, die im Hybridisierungssystem mit $4\times$ SSC nicht zu sehen war (Abb. 3.22 a). Gleichzeitig tauchte jedoch im System mit $6\times$ SSC die unspezifische Hybridisierung mit der Sonde für β -Lactamase auf. Dies deutete darauf hin, daß unter gleichen Bedingungen $4\times$ SSC dem Mikroarray die bessere Stringenz bot.

3.2.4.5 Einfluß vom Formamid im Hybridisierungspuffer auf die Sondenspezifität

Jedes zugesetzte Prozent von Formamid im Hybridisierungspuffer führt zu einer Senkung der Schmelztemperatur einer Doppelhelix um etwa $0,6^{\circ}\text{C}$ – $0,8^{\circ}\text{C}$ (Sambrook et al. 2000; Stahl und Amann 1991). Daher kann durch Zugabe von Formamid die Stringenz eines Hybridisierungsexperiments bei einer bestimmten Temperatur erhöht werden. Gleichzeitig wirkt Formamid in der Entfaltung der Sekundärstruktur der Targetsequenz, wodurch

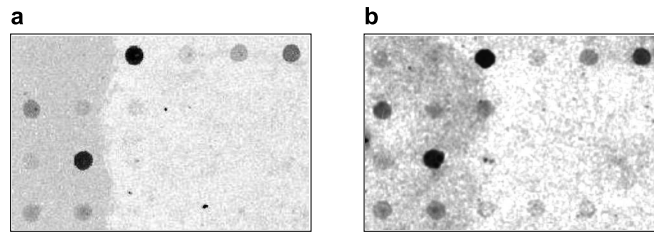


Abb. 3.22: Hybridisierungsergebnisse der 16S rDNA aus *M. aeruginosa* PCC 7806 in 4× SSC (a) und 6× SSC (b). Die Hybridisierung wurde 5 h bei 45 °C durchgeführt. Das Layout des Subarrays entspricht den ersten sechs Spalten von links in Abb. 3.17, S. 53.

die Hybridisierung an kritischen Stellen erleichtert werden kann. Im Bestreben, die theoretisch zu erwartende Hybridisierung mit einigen Sonden zu erzielen, die bisher jedoch noch nicht erhalten werden konnte, wurde dem Hybridisierungspuffer Formamid zugesetzt. Die Hybridisierung dieses Versuchs wurde bei 39 °C durchgeführt, so daß die Schmelztemperaturen der Doppelhelix in der Hybridisierung bei 39 °C mit 10 % Formamid theoretisch gleich sind wie in der Hybridisierung bei 45 °C ohne Zusatz von Formamid. Nur mit der Hybridisierung bei 39 °C ohne Formamid (Abb. 3.23 a) wurden alle theoretisch erwarteten Hybridisierungen detektiert. Dies war jedoch verbunden mit einer unspezifischen Hybridisierung. Durch Zusatz von Formamid (Abb. 3.23 b) wurden in der Tat die meisten falschen positiven Hybridisierungen eliminiert. Gleichzeitig verschlechterten sich auch die spezifischen Hybridisierungssignale. Beim Zusatz von 20 % Formamid waren selbst die erwünschten Hybridisierungen zum Teil verschwunden. Die Hybridisierung bei 39 °C mit 10 % Formamid, die das beste Ergebnis in diesem Experiment brachte, zeigte hinsichtlich des Erreichens der Sondenspezifität keine wesentliche Verbesserung verglichen mit der Hybridisierung bei 45 °C ohne Zusatz von Formamid (vgl. Abb. 3.23 b mit Abb. 3.23 d). In den weiteren Experimenten wurde daher auf Zusatz von toxischem Formamid verzichtet.

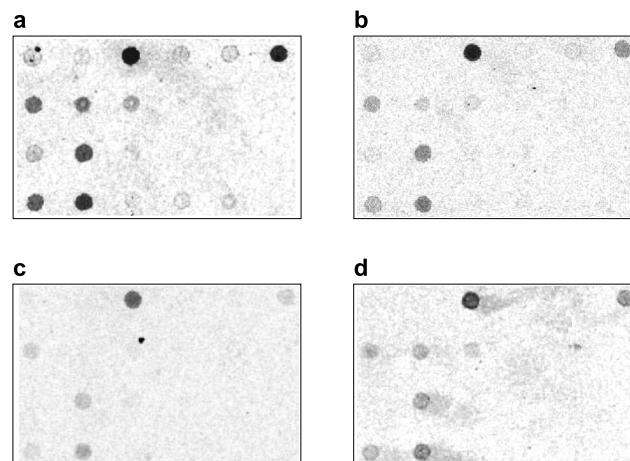


Abb. 3.23: Hybridisierungsergebnisse der 16S rDNA *M. aeruginosa* NIES 98 in 4× SSC. a: 39 °C, ohne Formamid; b: 39 °C, mit 10 % Formamid; c: 39 °C, mit 20 % Formamid; d: 45 °C, ohne Formamid. Das Layout des Subarrays entspricht den ersten sechs Spalten von links in Abb. 3.17, S. 53.

3.2.5 Einsatzfähigkeit der CyanoArrays zur gleichzeitigen Genotypisierung und Detektion von *mcy*

Bevor die mittels Multiplex-PCR erzeugten komplexen Targets zur Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde zunächst das einzelne Target aus der Single-PCR mit dem Array hybridisiert, um die Spezifität der *in silico* entworfenen Sonden zu analysieren. Insbesondere wurde die durch ungünstige Versuchsbedingungen entstandene Kreuzhybridisierung eines Targets mit den Sonden zur Detektion eines anderen Targets untersucht. Anschließend wurden die komplexen Targets aus der Multiplex-PCR mit dem Array hybridisiert, um das Hybridisierungsmuster einer Reinkultur zu erzeugen und die Einsatzmöglichkeiten des entstandenen CyanoArrays zu untersuchen.

3.2.5.1 Hybridisierung der mittels Single-PCR erzeugten einzelnen Targets mit dem CyanoArray

Hybridisierung der 16S rDNA mit dem Array Abb. 3.24 zeigt ein repräsentatives Hybridisierungsergebnis des markierten 16S rDNA-Fragments aus *Microcystis* mit dem Array. Da es unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen nur positive Signale mit den Sonden zur Genotypisierung, aber keine unspezifische Hybridisierung mit den Sonden zur Detektion von *mcy* gab, wurde die Einsatzbarkeit der 16S rDNA als Target zur Genotypisierung mittels dieses CyanoArrays bestätigt, der Sonden für beide Aufgaben enthielt. Das Hybridisierungsergebnis einzelner Sonden zur Genotypisierung wird in 3.2.5.2 näher erläutert.

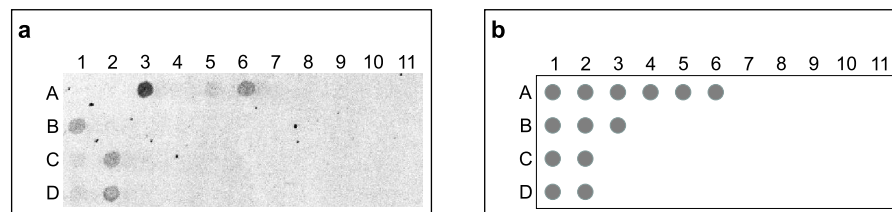


Abb. 3.24: Hybridisierungsergebnis der mittels Single-PCR markierten 16S rDNA aus *M. aeruginosa* PCC 7806 mit dem Array (a) und ihr theoretisch erwartetes Hybridisierungsmuster (b). Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

Hybridisierung des Targets *mcyA(NMT)* mit dem Array Abb. 3.25 zeigt ein repräsentatives Hybridisierungsergebnis des markierten *mcyA(NMT)*-Fragments sowie die der mit dem Primerpaar *methyl_f* und *methyl_r* aus *B. subtilis* DSM 402 und *R. rhodochrous* NCIMB 13064 amplifizierten unspezifischen PCR-Produkte. Mit den entworfenen Sonden, die sich jeweils paarweise in Kodierungs- und Antikodierungsrichtung an vier Stellen innerhalb des *mcyA(NMT)*-Fragments befinden (s. Abb. 3.18 b, S. 55), ließen sich *mcyA(NMT)*-Fragmente nachweisen und die unspezifischen PCR-Produkte aussondern. Da unter der verwendeten Hybridisierungsbedingung außer mit den entsprechenden Sonden keine unspezifische Hybridisierung mit den Sonden zur Genotypisierung und zur Detektion von *mcyB-mcyC* gemessen wurde, wurde die Voraussetzung der Verwendung von *mcyA(NMT)* als Target und

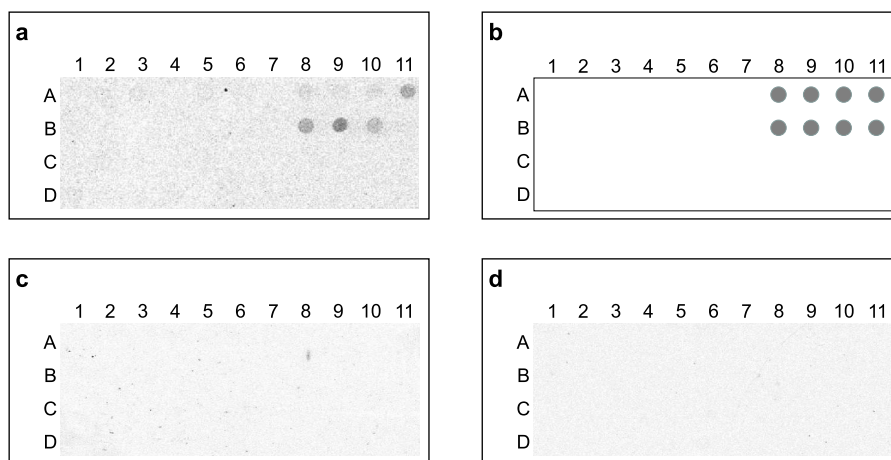


Abb. 3.25: Hybridisierungsergebnis des mittels Single-PCR markierten *mcyA(NMT)* aus *M. aeruginosa* PCC 7806 (a), sein theoretisch erwartetes Hybridisierungsmuster (b), sowie Hybridisierungsergebnisse der mit *methyl_f* und *methyl_r* amplifizierten unspezifischen PCR-Produkte aus *B. subtilis* DSM 402 (c) und *R. rhodochrous* NCIMB 13064 (d). Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

den entsprechenden Sonden zur Detektion von *mcy* mittels des Arrays erfüllt, der zusätzlich noch Sonden zu beiden letztgenannten Zwecken enthielt. Das Hybridisierungsergebnis einzelner Sonden wird in 3.2.5.2 näher betrachtet.

Hybridisierung des Targets *mcyB-mcyC* mit dem Array In Abb. 3.26 werden repräsentative Hybridisierungsergebnisse eines markierten *mcyB-mcyC*-Fragments und des mittels des Primerpaars *mcyBC_f* und *mcyBC_r* aus *B. subtilis* DSM 402 erzeugten unspezifischen PCR-Produktes dargestellt. Die ausgewählten Sonden befinden sich jeweils paarweise in Kodierungs- und Antikodierungsrichtung an fünf Stellen innerhalb des *mcyB-mcyC*-Fragments (s. Abb. 3.18 c, S. 55). Vor allem mittels *mcyBC_152*, *mcyBC_221*, *mcyBC_262*, und *mcyBC_304* in der Antikodierungsrichtung sowie *mcyBC_451* in der Kodierungsrichtung ließen sich *mcyB-mcyC*-Fragmente nachweisen und die unspezifischen PCR-Produkte aussondern, allerdings zeigten sowohl *mcyB-mcyC*-Fragmente als auch das unspezifische Amplikon die Kreuzhybridisierung mit der Sonde 1387_f zur Genotypisierung. Laut der *in silico* Analyse soll unter der im Versuch verwendeten Stringenz keine Kreuzhybridisierung entstehen. Sie ließ sich jedoch selbst bei erhöhter Stringenz nicht beseitigen, die die Hybridisierung anderer Targets mit deren Sonden beeinträchtigte. Da die gleichzeitig vorliegenden Sonden zur Detektion von *mcyA(NMT)* die vergleichbare Spezifität und die Fähigkeit zum Aussondern unspezifischer PCR-Produkte aufwiesen, aber keine Kreuzhybridisierung mit anderen Targets (Abb. 3.25), wurde die Verwendung von *mcyB-mcyC* als Target sowie dessen Sonden auf dem Array nicht fortgesetzt.

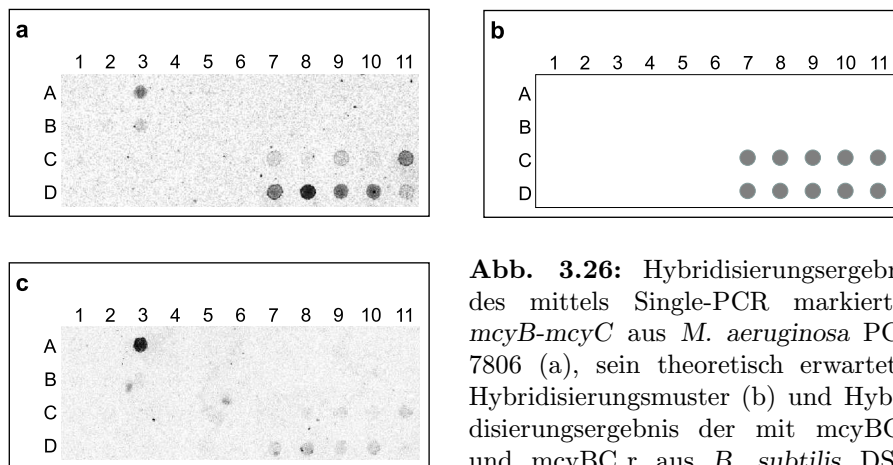
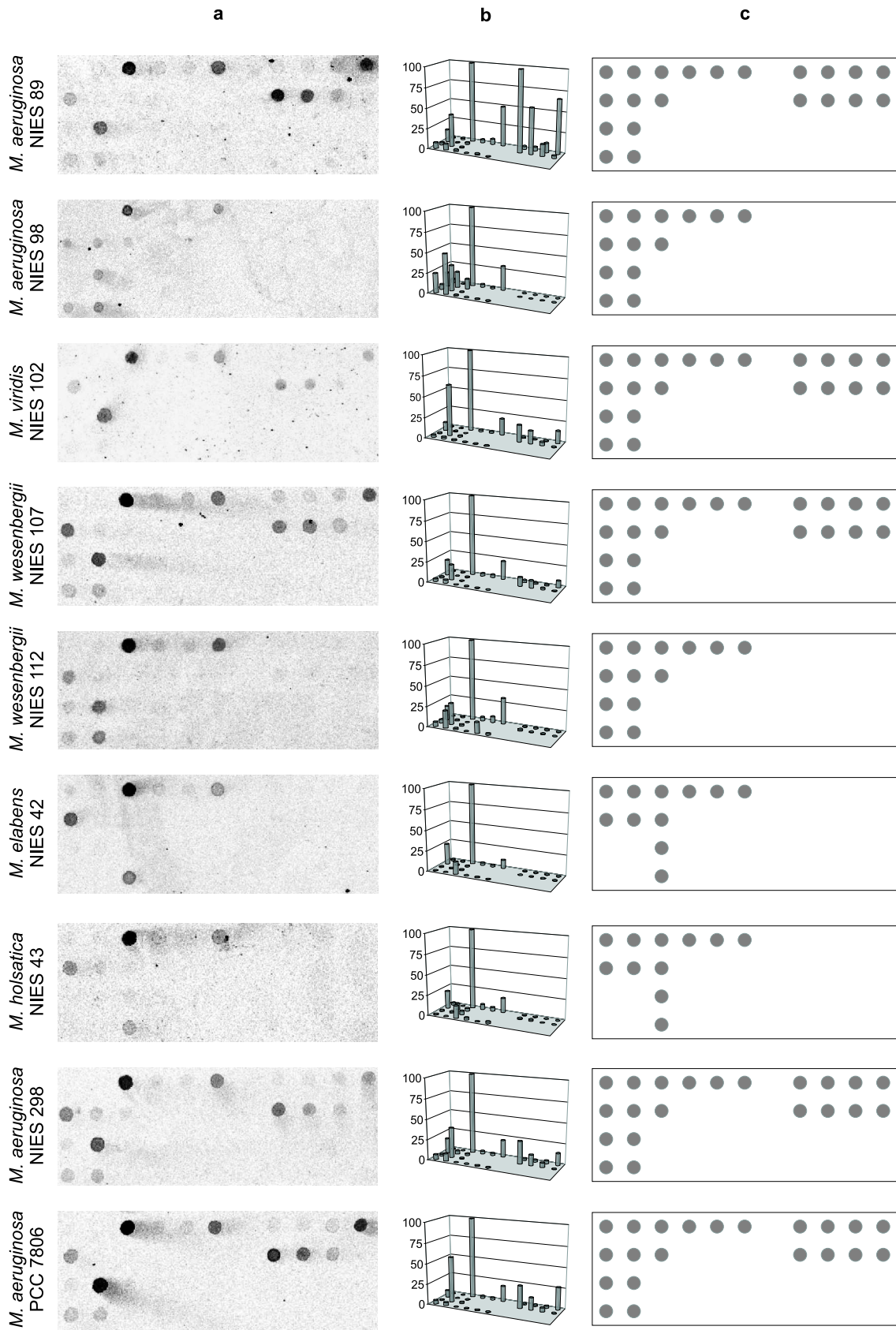


Abb. 3.26: Hybridisierungsergebnis des mittels Single-PCR markierten *mcyB-mcyC* aus *M. aeruginosa* PCC 7806 (a), sein theoretisch erwartetes Hybridisierungsmuster (b) und Hybridisierungsergebnis der mit *mcyBC_f* und *mcyBC_r* aus *B. subtilis* DSM 402 amplifizierten unspezifischen PCR-Produkte (c). Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

3.2.5.2 Hybridisierung der mittels Multiplex-PCR erzeugten Targets mit dem CyanoArray

Nach der Bestätigung, daß unter den angewandten Versuchsbedingungen keine Kreuzhybridisierung zwischen dem einen Target mit den Sonden anderer Targets entstehen konnte, wurden die mittels Multiplex-PCR erzeugten Targets aus 12 *Microcystis*-Stämmen, davon 7 microcystinproduzierenden und 5 nicht toxischen Stämmen, und 5 anderen Bakterien, inklusive zwei Cyanobakterien, zwei *Rhodococci* und einem *Bacillus*, mit dem entwickelten Array hybridisiert. Abb. 3.27 zeigt sowohl die nach der Anregung mit grünem Laserlicht (532 nm) gescannten Hybridisierungsergebnisse ohne weitere Bearbeitung, als auch die auf 1387_f normierten Darstellungen. Die Eigenschaft bezüglich der Microcystinbildung der einzelnen *Microcystis*-Stämme kann in Tab. 2.3.1 (S. 23) entnommen werden. Über die gesamte Arbeit hinweg wurde kein oder nur ein minimales Hybridisierungssignal mit den als negative Kontrolle dienenden Sonden Plank und bla gemessen, das jedoch kleiner als die maximale Standardabweichung eines dreifachen Versuchs von 5,2% war und daher vernachlässigt werden konnte. Durch Vergleich der Darstellungen a und b in Abb. 3.27 konnte festgestellt werden, daß anhand visueller Betrachtung der gescannten Bilder eine qualitative Aussage über die Hybridisierungsergebnisse getroffen werden kann. Dabei ist zu beachten, daß selbst die im Agarosegel mittels Färbung mit Ethidiumbromid kaum sichtbare 16S rDNA aus *M. aeruginosa* NIES 89 (Abb. 3.16, S. 52) eindeutig mittels des CyanoArrays detektiert wurde. Daher besteht die Notwendigkeit zur Überprüfung und Dokumentation eines Amplikongemisches aus einer Multiplex-PCR nur in der Entwicklungsphase der Methode, nicht aber in der praktischen Anwendung dieses Assays.

Unter den 6 Universalsonden, die sich an drei Stellen in 16S rDNA jeweils in der Kodierungs- und Antikodierungsrichtungen befinden, führte 1387_f stets zu einem zuverlässigen starken Hybridisierungssignal mit 16S rDNA aller getesteten Bakterien. 1387_f diente daher als positive Kontrolle dieses Arrays. Die Signalstärke von 1387_f wurde außerdem zur Normierung der Hybridisierungsergebnisse mit allen anderen Sonden ausgewählt. Au-



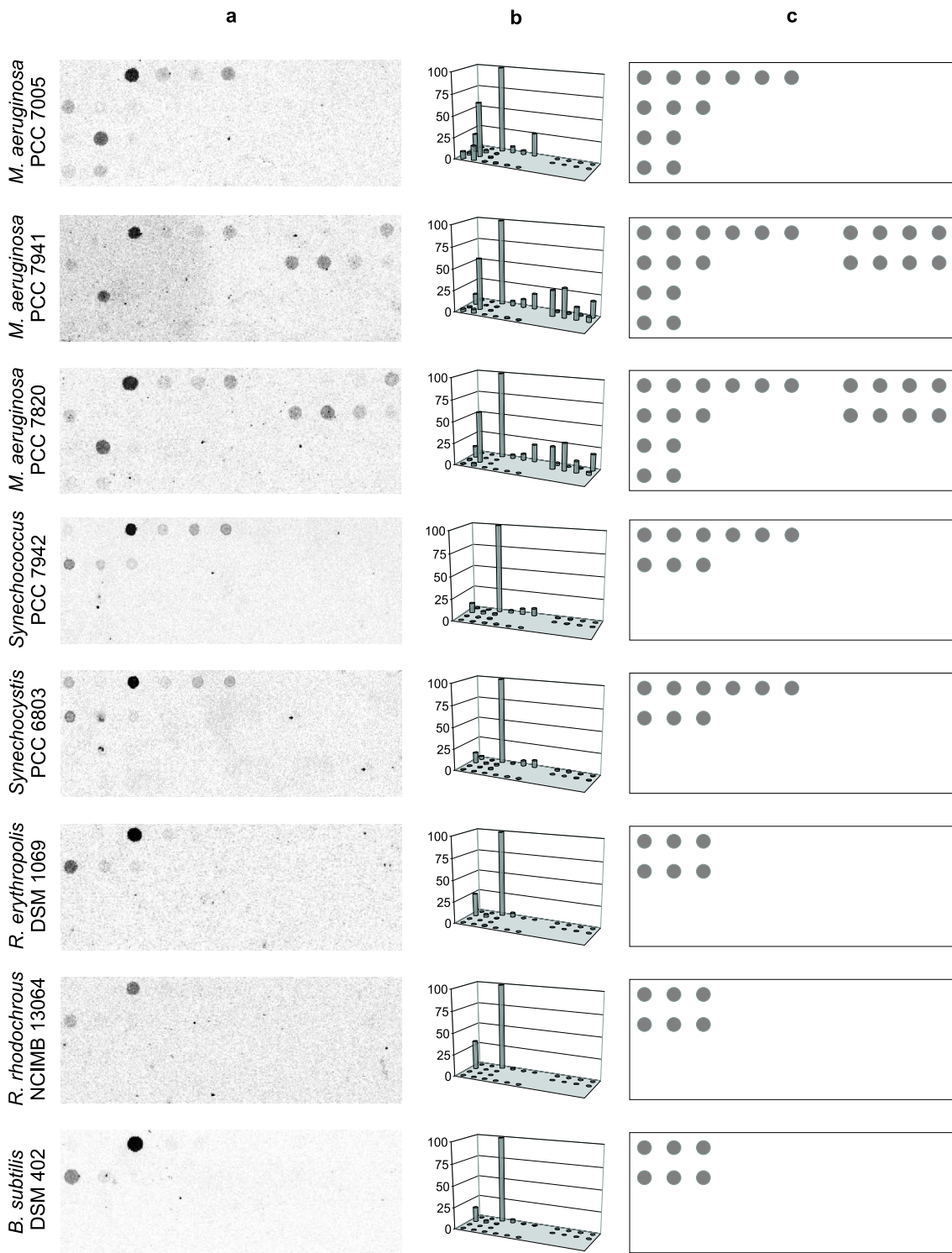


Abb. 3.27: Hybridisierungsergebnisse der mittels Multiplex-PCR markierten Targets mit dem CyanoArray. a: gescannte Bilder nach der Anregung mit grünem Laserlicht von 532 nm ohne weitere Bearbeitung; b: auf das Hybridisierungssignal von 1387_f normierte Darstellungen; c: theoretisch erwartete Hybridisierungsmuster. Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

ßer 1378_f konnte nur die Sonde 357_r mit allen 16S rDNA-Fragmenten hybridisieren, allerdings betrug ihre Signalstärke nur 15 %–25 % der von 1387_f. Die beiden anderen Universalsonden in der Antikodierungsrichtung, 907_r und 1387_r, hybridisierten nicht immer gut mit 16S rDNA-Fragmenten. 1387_r, die komplementäre Sequenz zu 1387_f, befindet sich an derselben Position wie 1387_f in 16S rDNA, verfügt über den gleichen GC-Gehalt wie 1387_f, hat jedoch nie eine so starke Hybridisierung wie 1387_f aufgewiesen. Diese Beobachtung, daß ein komplementäres Sondenpaar zu sehr unterschiedlichen Hybridisierungsergebnissen führt, zog sich durch die gesamte Arbeit in der Entwicklung vom CyanoArray (vgl. die Hybridisierungsergebnisse eines Sondenpaars in Kodierungs- und Antikodierungsrichtung in Abb. 3.25, S. 60 sowie Abb. 3.26, S. 61) und wurde ebenfalls von anderen Wissenschaftlern berichtet (Behr et al. 2000; Schedl et al. 2000; Ezaki 2001). Außerdem zeigten Sonden in derselben Richtung, mit derselben berechneten T_d , jedoch an unterschiedlichen Stellen des Targetstrangs erhebliche Unterschiede in der Hybridisierung (vgl. Hybridisierungsergebnisse aller Sonden zur Detektion von *mcyA(NMT)* in Kodierungs- oder Antikodierungsrichtung in Abb. 3.25, S. 60). In den meisten Fällen wurde beobachtet, daß die Hybridisierungssignale um so stärker wurden, je näher sich die Hybridisierungsstellen der Sonden an das 5'-Ende des Targetstrangs näherten, unabhängig von der T_d der Sonde (vgl. Signalstärke von 357_r und 1387_r in Abb. 3.27). Dies konnte jedoch nicht verallgemeinert werden, sonst müßte die Hybridisierung mit Micr_610_r stärker als die mit Micr_998_r sein, was in der ganzen Arbeit nie vorgekommen ist.

Der durch die Hybridisierungsstelle der Sonden im Targetstrang hervorgerufene Unterschied in den Hybridisierungsergebnissen kam ebenfalls unter Sonden für Cyanobakterien vor. Die hohe Spezifität zu Cyanobakterien und ausreichende Signalstärke machten die Sonde Cya_1411_f zu einem zuverlässigen Werkzeug für eine eindeutige Detektion von Cyanobakterien. Cya_1411_f war eine degenerierte Sonde, die aus vier Sonden von theoretisch gleicher Menge für unterschiedliche Cyanobakterien bestand. Daher kann ihr Hybridisierungssignal noch verstärkt werden, indem entweder ihre Konzentration beim Drucken auf das vierfache erhöht wird oder daraus vier Sondenspots gemacht werden, die jeweils nur eine von den vier degenerierten Sequenzen enthalten. Wenn überhaupt Hybridisierung mit Cya_361_f und Cya_762_f detektiert wurde, dann war die Signalstärke stets zu schwach, um daraus eine Aussage zu treffen.

Abgesehen von *M. aeruginosa* NIES 98 konnte bei der Hybridisierung mit der 16S rDNA aus *Microcystis* die Sonde Micr_998_f das stärkste Hybridisierungssignal aller vier *Microcystis*-spezifischen Sonden erzeugen. Selbst mit 16S rDNA aus *M. aeruginosa* NIES 98 war die Hybridisierung mit der Sonde Micr_998_f eindeutig. Die positive Hybridisierung mit Micr_998_f konnte daher als Nachweis für die Anwesenheit von *Microcystis*-Stämmen außer *M. elabens* und *M. holsatica* gewertet werden. Wenn eine Hybridisierung mit dem ebenfalls *Microcystis*-spezifischen Sondenpaar Micr_610_f und Micr_610_r überhaupt detektierbar war, war das Signal der Sonde in der Antikodierungsrichtung (Micr_610_r) stets stärker als das der Sonde in der Kodierungsrichtung (Micr_610_f). Das selbe Phänomen wurde auch in der Hybridisierung mit den für *M. elabens* und *M. holsatica* spezifischen Sonden ela/hol_623_f und ela/hol_623_r beobachtet. Das Sondenpaar ela/hol_623_f und ela/hol_623_r besitzt gleiche physikalische Eigenschaften wie Micr_610_f und Micr_610_r, und seine Position in 16S rDNA überschneidet sich mit der von Micr_610_f und Micr_610_r.

Das Hybridisierungssignal mit *ela/hol_623_r* war jedoch stark genug, um eine zuverlässige Aussage über die Anwesenheit von *M. elabens* und *M. holsatica* zu machen, während die Detektion anderer *Microcystis*-Stämme mit *Micr_610_r* nicht möglich war.

Die Hybridisierungsergebnisse in Abb. 3.27 zeigen, daß nicht nur die Targets aus den beiden Stämmen *M. aeruginosa* PCC 7806 und *M. aeruginosa* PCC 7820, deren *mcyA(NMT)* bereits sequenziert wurde, sondern auch die Targets aus den anderen fünf getesteten microcystinproduzierenden *Microcystis*-Stämmen, deren *mcyA(NMT)*-Sequenz noch nicht bekannt ist, mit mindestens zwei entworfenen *mcyA(NMT)*-Sonden, nämlich *methyl_800_f* und *methyl_326_r*, stark hybridisierten. Diese Sonden zeigten keinerlei Hybridisierung mit den Targets aus den getesteten Mikroorganismen, die Microcystin nicht produzieren. Die Fähigkeit dieser Sonden zur Diskriminierung der unspezifischen Produkte, die mit dem Primerpaar *methyl_f* und *methyl_r* während der PCR entstanden, wurden bereits in 3.2.5.1 gezeigt. Daraus läßt sich schließen, daß zumindest *methyl_800_f* und *methyl_326_r* den Nachweis von *mcyA(NMT)* erlauben. Es ist außerdem zu beachten, daß das Hybridisierungsmuster dieser acht Sonden zur Detektion von *mcyA(NMT)* sehr stark von dem bereits beschriebenen positions- und richtungsabhängigen Unterschied geprägt ist.

3.2.6 Spezielle Untersuchungen: Einsetzbarkeit von Random-Priming und Nick-Translation zur Fluoreszenzmarkierung

Da die Amplifikationseffizienz einer PCR nicht nur von der perfekten Sequenzpaarung zwischen dem Template und den Primern, sondern auch von der zu amplifizierenden Sequenz abhängig ist, hat die Targetvorbereitung mittels PCR neben dem gewünschten Amplifikationseffekt den Nachteil, daß manche Sequenzen trotz der perfekten Basenpaarung mit Primern diskriminiert und nicht mit amplifiziert werden, was zum falschen Ergebnis führt. Um das Problem zu umgehen, wurden anstelle von PCR zwei Markierungsmethoden, Random-Priming und Nick-Translation, für die Targetvorbereitung untersucht. Das mittels Random-Priming oder Nick-Translation erzeugte Gemisch wurde, abgesehen von einer Reinigung und Denaturierung, ohne weitere Behandlungen für die Hybridisierung eingesetzt. Die Möglichkeiten und Grenzen beider Fluoreszenzmarkierungsmethoden wurden anhand der Hybridisierungsergebnisse untersucht.

3.2.6.1 Random-Priming

Abb. 3.28 zeigt die repräsentativen Hybridisierungsergebnisse der einzelnen Targets, die zunächst mittels Single-PCR ohne Markierung amplifiziert und anschließend mittels Random-Priming fluoreszenzmarkiert wurden. In der Hybridisierung mit *mcyA(NMT)* und *mcyB-mcyC* kam zwar der positionsabhängige Unterschied immer noch vor, war aber nicht so ausgeprägt wie in Hybridisierungsergebnissen eines mittels PCR markierten Targets (vgl. Abb. 3.25 a, S. 60 mit Abb. 3.28 b und Abb. 3.26 a, S. 61 mit Abb. 3.28 c). Die Hybridisierung des mittels Random-Priming markierten Targets mit einem Sondenpaar in Kodierungs- und Antikodierungsrichtung zeigte eine vergleichbare Signalstärke. Diese Veränderungen wurden jedoch nicht in der Hybridisierung mit der mittels Random-

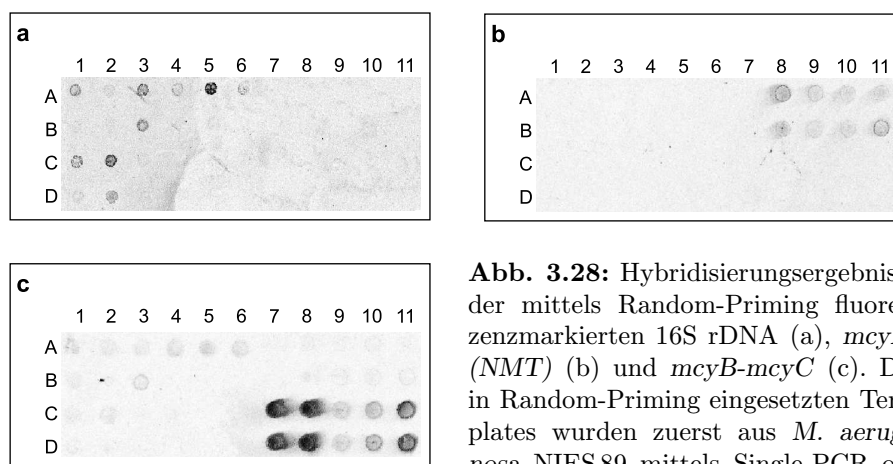


Abb. 3.28: Hybridisierungsergebnisse der mittels Random-Priming fluoreszenzmarkierten 16S rDNA (a), *mcyA*-(NMT) (b) und *mcyB-mcyC* (c). Die in Random-Priming eingesetzten Templates wurden zuerst aus *M. aeruginosa* NIES 89 mittels Single-PCR ohne Markierung erzeugt. Die Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll in 2.5.8, jedoch ohne partiellen Verdau mit DNase durchgeführt. Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

Priming markierten 16S rDNA beobachtet. Interessanterweise unterschied sich das Hybridisierungsmuster der mittels Random-Priming und mittels PCR markierten 16S rDNA sehr stark (vgl. Abb. 3.28 a mit Abb. 3.24 a, S. 59). Die Hauptunterschiede sind folgende:

1. Unter den Universalsonden zeigten in Abb. 3.28 a die Sonden 1387_f und 1387_r vergleichbare Signalstärke. Statt 357_r in Abb. 3.24 a zeigte hier 357_f eine detektierbare Hybridisierung.
2. Die Hybridisierung mit Cya_762_f war die stärkste, und zwar nicht nur unter den Sonden für Cyanobakterien, sondern unter allen Sonden zur Genotypisierung.
3. Unter den Sonden für *Microcystis*-Stämme mit der Kennzeichnung „Micr“ lieferten zusätzlich zu Micr_998_f noch die Sonden Micr_610_f und Micr_998_r stets eindeutige, detektierbare Hybridisierungssignale. Mit den beiden zuletzt genannten Sonden zeigte die mittels einer PCR markierten 16S rDNA unter denselben Hybridisierungsbedingungen jedoch nur ganz schwache bis gar keine Signale.

Bei der Hybridisierung der markierten genomischen DNA mit CyanoArray ist die unerwünschte Kreuzhybridisierung zwischen dem Target *mcyB-mcyC* und den Sonden zur Genotypisierung (Abb. 3.28 c sowie Abb. 3.26) zu erwarten. Da trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlichen Vorbehandlungen der genomischen DNA ihre Fluoreszenzmarkierung mittels Random-Priming nicht gelungen war, wurde die Untersuchung des Einsatzes von Random-Priming nicht fortgesetzt.

3.2.6.2 Nick-Translation

Ein repräsentatives Hybridisierungsergebnis mit den mittels Nick-Translation fluoreszenzmarkierten 16S rDNA, *mcyA(NMT)*, *mcyB-mcyC* sowie genomischen DNA wird in Abb. 3.29 dargestellt. Im Vergleich zu der Hybridisierung mit den mittels PCR markierten Targets wurde allgemein eine schwächere Positionsabhängigkeit beobachtet (vgl. Abb. 3.29 mit Abb. 3.24 a, Abb. 3.25 a, sowie Abb. 3.26 a, auf Seiten 59–61). Außer den Sondenpaaren 907_f und 907_r, 1387_f und 1387_r sowie Micr_610_f und Micr_610_r zeigte die Hybridisierung des mittels Nick-Translation markierten Targets mit einem Sondenpaar in Kodierungs- und Antikodierungsrichtung vergleichbare Signalstärke. Verglichen mit den Ergebnissen der mittels PCR markierten 16S rDNA zeichnete sich das Hybridisierungsmuster der mittels Nick-Translation vorbereiteten 16S rDNA durch die folgenden drei Punkte aus (vgl. Abb. 3.29 a mit Abb. 3.24, S. 59):

1. Statt 1387_f zeigte unter den Universalsonden in Abb. 3.29 a die Sonde 1387_r das stärkste Signal.
2. Unter Sonden für Cyanobakterien war in Abb. 3.29 a die Hybridisierung mit Cya_361_f und Cya_762_f viel stärker als mit Cya_1411_f.
3. Während Micr_998_f nach wie vor eine starke Hybridisierung mit dem Target aufwies, wurde mit Micr_998_r das stärkste Hybridisierungssignal detektiert. Die Hybridisierung mit Micr_610_f und Micr_610_r (Abb. 3.29 a) war stark genug, um eine eindeutige Aussage über die Anwesenheit von *Microcystis*-Stämmen zu machen, was bei der Hybridisierung mit der mittels PCR markierten 16S rDNA nicht möglich war.

Die bereits in 3.2.5.1 (S. 60) beschriebene, unerwünschte Kreuzhybridisierung zwischen dem Target *mcyB-mcyC* und den Sonden zur Genotypisierung wurde ebenfalls in diesem Versuch detektiert (Abb. 3.29 c) und ist bei der Verwendung der markierten genomischen DNA zur Hybridisierung zu erwarten. Zusätzlich dazu stellte sich durch das Hybridisierungsergebnis der mittels Nick-Translation markierten genomischen DNA mit CyanoArray noch ein anderes Problem heraus, nämlich daß das Gen *mcy*, das im Gegensatz zur 16S rDNA in nur wenigen Kopien in den toxischen *Microcystis*-Stämmen existiert, ohne Amplifikation selbst in einer Reinkultur mittels der hier verwendeten Methode kaum detektierbar war (Abb. 3.29 d). Die beiden Probleme müßten allerdings durch andere Strategien beseitigt werden können. Der Einsatz der Nick-Translation in der Targetvorbereitung sieht vielversprechend aus, bedarf jedoch eines anderen Konzeptes für die Assayentwicklung, das nicht mehr im Umfang dieser Arbeit steht.

3.2.7 Anwendung des CyanoArrays in Umweltproben

Nach der Entwicklung wurde der CyanoArray in drei Umweltproben getestet. In Tab. 3.2 stehen die Herkunft und die Analysendaten der Proben, die erst nach der Ermittlung der Hybridisierungsergebnisse mit dem CyanoArray bekanntgegeben wurden. Nach ihrer Ankunft am 04.08.2000 wurden die Proben möglichst homogen portioniert und sofort

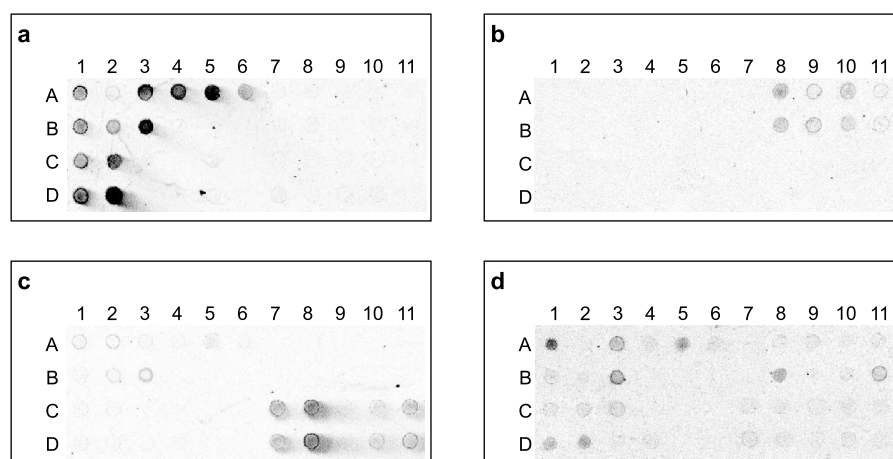


Abb. 3.29: Hybridisierungsergebnisse der mittels Nick-Translation fluoreszenzmarkierten 16S rDNA (a), *mcyA(NMT)* (b), *mcyB-mcyC* (c) und genomischen DNA (d) aus *M. aeruginosa* NIES 89. Außer genomischer DNA wurden die in Nick-Translation eingesetzten Templates zuerst aus *M. aeruginosa* NIES 89 mittels Single-PCR ohne Markierung erzeugt. Die Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll in 2.5.8, jedoch ohne partiellen Verdau mit DNase durchgeführt. Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C bis zur DNA-Extraktion gelagert. Laut ihrem Anbieter (Weller 2001) standen die Proben nach der Probennahme bis zur Auslieferung vor Licht geschützt bei RT.

Tab. 3.2: Herkunft sowie biologische und immunchemische Untersuchungsergebnisse der Umweltproben (Eikenberg 2000).

Probennummer	Herkunft (Ort/Datum)	Cyanobakterien ^a	Konz. an freiem Toxin ^b	Konz. des Toxins ^b in der Trockenbiomasse
000 019	Bergknappweiher (Ufer), Weilheim/19.06.2000	ohne Angabe	0,2 $\mu\text{g}/\text{l}$	ohne Angabe
000 037	Bergknappweiher (Ufer), Weilheim/03.08.2000	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	0,3 $\mu\text{g}/\text{l}$	1,5 mg/g
000 039	Nußbergerweiher (Überlaufbecken, befüllt), Weilheim/03.08.2000	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>Oscillatoria</i> - Stämme	0,1 $\mu\text{g}/\text{l}$	0,09 mg/g

^aDie Cyanobakterienspezies wurden mikroskopisch detektiert.

^bDie Konzentration des Toxins wurde mittels ELISA mit dem Antikörper MC10E7 bestimmt und in die Microcystin-LR-Äquivalente umgerechnet.

3.2.7.1 Einfluß der DNA-Extraktion auf Targetvorbereitung

Obwohl die genomischen DNAs mittels der herkömmlichen Phenol/Chloroform-Methode aus allen drei Proben extrahiert werden konnten, wurde zunächst überhaupt keine positive Hybridisierung mit den mittels PCR fluoreszenzmarkierten Targets aus der Probe 000 019 detektiert. Diese Probe enthielt viel Sediment und pflanzliche Partikel. Da eine Umweltprobe ohne jegliche bakterielle 16S rDNA höchst unwahrscheinlich ist, bestand die Vermutung, daß das DNA-Extrakt die Polymerase-Aktivität hemmenden Substanzen enthielt, was in DNA-Extrakten aus Umweltproben nicht selten ist. Mit Hilfe der Ethidiumbromid-Färbung wurde festgestellt, daß überhaupt keine Fragmente mittels PCR amplifiziert wurde, wodurch die Vermutung bestätigt wurde. Das Problem konnte in der vorliegenden Arbeit beseitigt werden, indem ein kommerzielles Kit zur DNA-Isolation aus komplexen Matrices mit Modifikationen bei der DNA-Extraktion eingesetzt wurde.

3.2.7.2 Hybridisierungsergebnisse der Umweltproben

Die Hybridisierungsergebnisse der Umweltproben werden in Abb. 3.30 dargestellt. Während mittels des CyanoArrays *Microcystis*-Stämme und *mcyA(NMT)* in den beiden toxischen, *Microcystis*-haltigen Proben 000 037 und 000 039 eindeutig nachgewiesen wurden, stand der immunchemisch gemessene Toxingehalt in der Probe 000 019 in Widerspruch zur negativen Hybridisierung der aus dieser Probe gewonnenen Targets mit den *mcyA(NMT)*-Sonden im CyanoArray. Eine naheliegende Vermutung besteht darin, daß die Zellen sowie die zellulären Komponenten während der Lagerung bei RT biologisch abgebaut wurden, so daß das möglicherweise von vornherein nur in kleiner Menge vorhandene Gen *mcy* in der 6 Wochen alten Probe 000 019 bereits vor Beginn der DNA-Extraktion vollständig degradiert worden und nicht mehr nachweisbar war. Eine weitere Möglichkeit liegt auf der genetischen Ebene, ob der hier entwickelte CyanoArray in der Lage ist, das Gen der Microcystin-Synthetase in Cyanobakterien anders als *Microcystis* zu detektieren. Mittels CyanoArrays wurden lediglich Cyanobakterien aber keine *Microcystis*-Stämme in der Probe 000 019 nachgewiesen. Da die Angabe über die Cyanobaktérienspezies in der Probe 000 019 fehlte, konnte nicht überprüft werden, ob das Ergebnis der Tatsache entspricht.

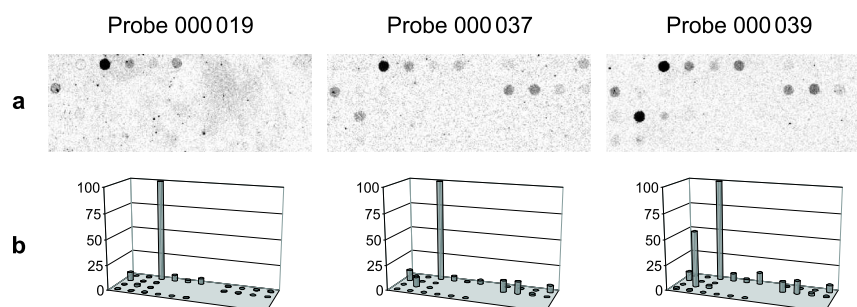


Abb. 3.30: Hybridisierungsergebnisse der Umweltproben mit CyanoArray. a: gescannte Bilder ohne weitere Bearbeitung; b: auf das Hybridisierungssignal von 1387_f normierte Darstellungen. Die Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll in 2.5.8 durchgeführt. Das Layout des Subarrays findet sich in Abb. 3.17, S. 53.

Kapitel 4

Diskussion

Aufgrund ihres vermehrt massenhaften Auftretens in verschiedenen Gewässern und oft in Verbindung mit der Freisetzung von Toxinen sind Cyanobakterien in den letzten Jahren verstärkt in das Interesse der Öffentlichkeit und der Wissenschaft gerückt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei molekularbiologische Methoden zur vorzeitigen Detektion der cyanobakteriellen Massenvermehrung sowie damit verbundenen Probleme entwickelt. Anhand der Untersuchungsergebnisse werden ihre Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten in diesem Kapitel näher diskutiert.

4.1 Entwicklung des CyanoSensors zur Detektion des bioverfügbaren Phosphors

Da Wasserblüten am häufigsten in eutrophen Gewässern vorkommen, ist es naheliegend, eine präventive Methode bezüglich der verfügbaren Nährstoffe zu entwickeln. Da Cyanobakterien Stickstoff in Form von Cyanophycin und Phycocyanin speichern und manche Spezies die N_2 -Fixierung durchführen können, spielt in der Natur neben Eisen und Silicium der Phosphor eine entscheidende Rolle in ihrem Wachstum (Paerl 1996). Die Reaktion von *Synechococcus* PCC 7942 auf eine Phosphatlimitierung wurde bereits gut untersucht (Ihlenfeldt und Gibson 1975). Die zur Aufnahme des gebundenen Phosphats benötigte, durch das Gen *phoA* kodierte alkalische Phosphatase wurde identifiziert (Ray et al. 1991). Bereits bei der Verwendung des Promotors von *phoA* (*PphoA*) aus *S. PCC 7942* konnte in einem Mutanten von *Synechococcus* eine durch die Phosphatverfügbarkeit kontrollierte Expression des Zilopeptides gezeigt werden (Collier und Grossman 1994). Zur Entwicklung eines mikrobiellen Reporterassays wurde in der vorliegenden Arbeit ein cyanobakterieller Reporterstamm APL verwendet, in dem die Luziferase als das Reporterprotein vorlag, deren Expression aufgrund der Fusion *PphoA::luxAB* unter Kontrolle vom Phosphatangebot stand.

Das auf der Flüssigkultur von APL basierende Testsystem wies eine gute Empfindlichkeit bei der Detektion von bioverfügbarem Phosphor auf (Gillor et al. 2001). Die Ausgangsidee des ersten Teils der hier vorgestellten Arbeit war, die Durchführung dieses Testsystems zu

vereinfachen, die Lagerfähigkeit des Assays zu verbessern und ihn in Hinblick auf einen möglichen Einsatz in Vor-Ort-Messungen zu optimieren. Dies wurde durch Immobilisierung der APL-Zellen erreicht.

4.1.1 Einfluß der Immobilisierung auf den Reporterassay

4.1.1.1 Immobilisierungsmatrizes

Die im Polyacrylamid immobilisierten Zellen zeigten eine extrem niedrige Überlebensrate. Dies ist auf die Toxizität von Acrylamid und den radikalen Polymerisierungsprozeß zurückzuführen. Die verzögerte Lichtausstrahlung nach Zusatz des Substrats für die Luziferase deutete auf eine Diffusionsbarriere dieser Matrix hin. Im Gegensatz dazu zeigten die bereits induzierten APL-Zellen nach der Immobilisierung im Agar vergleichbare Lumineszenzwerte wie die Zellen im freien Zustand. Außerdem wurde die Aktivität der Luziferase, die aufgrund einer Phosphatlimitierung *de novo* synthetisiert wurde, in den im Agar immobilisierten und in den freien APL-Zellen im gleichen Ausmaß gemessen. Daraus kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß die APL-Zellen den Immobilisierungsvorgang überlebten und Agar in der eingesetzten Menge die Lumineszenzmessung des Testsystems nicht störte. Die Verwendung von Agar zeichnete sich ferner durch die einfache Durchführung der Immobilisierung und günstige Materialkosten aus. Weiterhin zeigten die im Agar immobilisierten Sensorzellen makroskopisch¹ eine gleichmäßige Zellverteilung, die Voraussetzung für eine Punktmessung ist wie beim Detektor des hier verwendeten Luminometers.

Das Prinzip der bisher bekannten, im Agar immobilisierten mikrobiellen Reportersensoren (Köhler et al. 2000; Gil et al. 2000) liegt in der durch Analyten ausgelösten Expressionshemmung eines konstitutiv expremierten Reporterproteins, wobei in der Analyse nur die relative, nicht aber die absolute Inhibition jedes einzelnen Sensors eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu muß die gleiche Anzahl bzw. Dichte der bioaktiven Zellen in jedem einzelnen Sensor gewährleistet werden, wenn die Messung des Testsystems auf der absoluten Menge des aufgrund der Induktion *de novo* synthetisierten Reporterproteins beruht, wie beim CyanoSensor. Nur unter dieser Voraussetzung kann in solch einem Assay mittels des Sensors eine Kalibrierungskurve erstellt werden, mit der der Gehalt an Analyten ermittelt wird. Dieser Voraussetzung entsprechend erwies sich Agar als die ideale Matrix für die Herstellung des CyanoSensors.

4.1.1.2 Optimierung der Immobilisierung

Mit dem zunehmenden Volumen einer Zellsuspension bestimmter Zelldichte nimmt auch die Anzahl der Zellen zu. Bei der Immobilisierung der Sensorzellen in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte entspricht die Volumenänderung der Änderung der Dicke der immobilisierten Zellschicht. Ohne andere Faktoren zu berücksichtigen, ist die ausgesandte Biolumineszenz proportional zu der Menge der Sensorzellen, in Fall des CyanoSensors der Dicke

¹APL-Zellen wurden nach demselben Verfahren in einer durchsichtigen Mikrotiterplatte immobilisiert, und alle Kavitäten wiesen gleiche OD₇₂₀-Werte auf.

der immobilisierten Zellschicht. Wenn aber für die Induktion die Analyten und zur Lumineszenzmessung das Substrat dem Reporterstamm zugesetzt werden müssen wie beim CyanoSensor, ist die Diffusionslimitierung in einer dickeren immobilisierten Zellschicht größer als in einer dünneren (Strelitz 1998; Köhler 2000). Weiterhin kann die Biolumineszenz der in den unteren Schichten liegenden Zellen in einer dicken immobilisierten Masse wegen der Wechselwirkung mit anderen Zellen und der Matrix nur gedämpft zum Detektor gelangen und eventuell nicht erfaßt werden. Somit hat eine zunehmende Dicke der immobilisierten Zellschicht sowohl signalverstärkende als auch signalschwächende Wirkung auf das Testsystem. Die optimale Dicke der immobilisierten Zellschicht muß daher in jedem Assay empirisch ermittelt werden (Gil et al. 2000; Polyak et al. 2001). In dieser Arbeit wurde neben einer Senkung der Diffusionsbarriere noch aus einem weiteren Grund das kleinste, realisierbare Volumen von APL-Zellen zur Herstellung des CyanoSensors immobilisiert, so daß möglichst viel Induktionslösung dem Sensor zugesetzt werden konnte, um den Einfluß des in die immobilisierte Masse zugegebenen, zur Lebenserhaltung notwendigen Phosphats auf das Assaysystem möglichst weit zu senken. Die zum Erreichen der Meßempfindlichkeit benötigte Menge an Reporterzellen wurde durch die geeignete Zelldichte erzielt.

Während der Entwicklung des CyanoSensors mittels im Agar immobilisierten APL-Zellen wurde beobachtet, daß im Bereich $OD_{720} \leq 1,5$ die resultierende Lumineszenz mit zunehmender Zelldichte der zur Immobilisierung eingesetzten Zellsuspension stieg. Mit $OD_{720} > 1,5$ konvergierten die gemessenen Lumineszenzwerte gegen eine Asymptote. Dafür gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen verstärkt sich mit zunehmender Zelldichte aufgrund der zunehmenden Anzahl der Sensorzellen die ausgestrahlte Biolumineszenz. Gleichzeitig wird der erfaßbare Anteil der emittierten Lumineszenz durch die Absorption des Lichts von den Zellen beeinträchtigt. Ferner ist zu beachten, daß der Sauerstoff an der oxidativen enzymatischen Reaktion der Luziferase beteiligt ist (S. 12). Mit einer erhöhten Zelldichte kann das Sauerstoffangebot ein limitierender Faktor für die Reaktion sein, so daß die Aktivität der exprimierten Luziferase nicht vollständig erfaßt werden kann. Mit einer sehr hohen Zelldichte ist es sogar möglich, daß die verfügbaren Nährstoffe in der immobilisierten Zellmasse für die induzierten Biosynthese der Reporterproteine nicht ausreichen (Gil et al. 2000; Polyak et al. 2001). Im Fall von Cyanobakterien, also phototrophen Bakterien, ist zusätzlich noch die gegenseitige Abschirmung von der Beleuchtung in einer dichten immobilisierten Zellmasse von besonderer Bedeutung, da ihnen Licht nicht nur als Energie, sondern auch als einen Regulationsfaktor vieler Biosynthesen dient. Im Vergleich zu anderen nichtphototrophen Bakterien kann die bereits erwähnte Lichtabsorption von Zellen bei Cyanobakterien im erhöhten Ausmaß auftreten.

4.1.2 Optimierung des CyanoSensors

Der Wildtypstamm von APL ist ein Cyanobakterium, ein phototrophes Bakterium. Es wurde berichtet, daß eine Reihe von biologischen Aktivitäten in Cyanobakterien von Licht reguliert wird, zum Beispiel die Aufnahme von externem Phosphat und die Synthese vieler Proteine (Simonis und Urbach 1973; Singer und Doolittle 1975; Grillo und Gibson 1979; Wagner und Falkner 1992; Hirschberg und Chamovitz 1994; Utkilen und Gjølme 1992; Golden 1995; Utkilen und Gjølme 1995; Kaebnick et al. 2000). Dies macht es

verständlich, weshalb die durch eine Phosphatlimitierung induzierte Biolumineszenz in den Sensorzellen von der Beleuchtungsintensität abhängig war. Ein kritischer Faktor in der Anwendung des CyanoSensors ist daher eine homogene Lichtquelle. Es ist außerdem bekannt, daß die cyanobakterielle Bioaktivität nicht nur von der Quantität der Beleuchtung, sondern auch von ihrer Qualität, d. h. ihren Wellenlängen bzw. ihrem Spektrum, reguliert wird (Mann 1995; Falkowski und Rave 1997; Kaebernick et al. 2000). Selbst die Beleuchtungsschwankungen beeinflussen die cyanobakterielle Bioaktivität (Riegmann et al. 1985; Golden et al. 1998; Johnson und Golden 1999). Infolgedessen ist schon jetzt eine Schwierigkeit in der praktischen Anwendung des CyanoSensors zur Überwachung des verfügbaren Phosphors in einem Gewässer denkbar, nämlich die eventuell notwendige quantitative, qualitative und periodische Simulation der Beleuchtung im Labor wie im zu untersuchenden aquatischen Ökosystem. In Freilandmessungen müßte das Problem jedoch durch die natürliche Beleuchtung gelöst werden können.

Da die ergänzende Klonierung von *luxCDE* in den Reporterstamm APL nicht erfolgreich war und die zellulären langkettigen Aldehyde als Substrat für die expremierte Luziferase im APL nicht ausreichten (Gillor 1999), benötigte die Messung der Luziferase-Aktivität in APL-Zellen den Zusatz des Substrats. Die geringe Löslichkeit der langkettigen Aldehyde in Wasser bereitet Schwierigkeiten im Ansetzen einer homogenen Substratlösung. Außerdem üben die langkettigen Aldehyde die Überschußhemmung auf die Luziferase-Aktivität aus. Das Ausmaß der Hemmung hängt von der Zusammensetzung der Substratlösungen ab, wie der Anwesenheit von Rinderserumalbumin und dem Puffersystem (Holzman und Baldwin 1983). Daher ist die empirische Untersuchung der verwendeten Substratlösung für einen Reporterassay unentbehrlich, dessen Messung auf der bakteriellen Luziferase beruht und den Substratzusatz benötigt. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Igepal und DMSO, einem Tensid und einem organischen Lösungsmittel zur Erhöhung der Löslichkeit, eine homogene Substratlösung zubereitet und ihre optimale Konzentration zur Lumineszenzmessung des Sensorsystems ermittelt werden. Sollte die Klonierung von *luxCDE* in den Reporterstamm doch gelingen, kann eine handhabbare Art des Detektionssystems verwirklicht und die Lumineszenzmessung wesentlich vereinfacht werden, was besonders vorteilhaft in der Vor-Ort-Anwendung ist.

Die Kultivierungsgeschichte der Sensorzellen spielte eine wichtige Rolle in der Herstellung des CyanoSensors. Cyanobakterien und andere Mikroorganismen haben während der Evolution spezielle Strategien zum Überleben der Phosphatlimitierung entwickelt. Zelluläres Speichern des Phosphats in Form der Polyphosphat-Reserve ist eine der Strategien und ermöglicht Cyanobakterien selbst in einem völlig phosphatfreien Medium 3–4 Zellteilungen (Collier und Grossman 1992; Chorus und Mur 1999). Dies hat zur Folge, daß eine Schätzung des cyanobakteriellen Biomassezuwachses anhand des chemisch ermittelten Gehalts an gelöstem Phosphat nicht möglich ist (Chorus und Mur 1999). So lange intrazelluläres Polyphosphat verfügbar ist, leiden die Zellen nach Entfernen des anorganischen Phosphats aus dem Medium keinen unmittelbaren Mangel an Phosphat (Mahasneh et al. 1993; Houmar 1995; Mann 1995). Der gesamte Gehalt des intrazellulären Phosphors korreliert positiv mit der externen Phosphatkonzentration, negativ mit dem Kulturalter einer Batch-Kultur und nimmt während der Phosphatlimitierung ab (Batterton und van Baalen 1968; Sicko-Goad und Jensen 1976; Grillo und Gibson 1979; Mahasneh et al. 1993). Die Arbeitsgruppe von van Dien hat demonstrieren können, daß in *E. coli* der Abbau des zel-

lulären Polyphosphats durch Polyphosphatase während der Periode der Phosphatlimitierung eine erhöhte Phosphatkonzentration im periplasmatischen Raum verursachte, was wiederum zur Repression aller Gene unter der Kontrolle des Pho-Regulons führte (Sharfstein et al. 1996; van Dien et al. 1997; van Dien und Keasling 1998). Solche physiologische Beschaffenheit und ihre Wechselwirkung mit dem Ökosystem spiegelte sich im Assaysystem mit APL als Sensorzellen wider. Die CyanoSensoren, die mit den APL-Zellen aus einer 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur in der mitte- bis spät-logarithmischen Phase hergestellt wurden, reagierten rasch auf die Phosphatlimitierung. Dies ist durch den niedrigen Gehalt des externen Phosphats und infolgedessen die gleichfalls niedrige intrazelluläre Phosphatkonzentration zu erklären. Die Induktion der Sensoren, deren APL-Zellen ebenfalls aus einer 1/5-BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur, jedoch in jüngeren oder älteren Zuständen stammten, wurde wahrscheinlich entweder durch das vorhandene zelluläre Polyphosphat oder das durch Abbau des Polyphosphats und anderer Zellkomponenten freigesetzte Phosphat gehemmt. Sensorzellen aus einer BG-11^{Hepes, Strp}-Kultur zeigten das ähnliche altersabhängige Verhalten. Sie enthielten als Folge der hohen externen Phosphatkonzentration jedoch einen viel höheren Gehalt an zellulärem Polyphosphat, das die Induktion der Luziferase-Biosynthese im Reporterstamm APL stark hemmt.

4.1.3 Charakterisierung des CyanoSensors

Für eine meßbare konzentrationsabhängige Korrelation zwischen den externen PO_4^{3-} -Gehalten und der resultierenden Biolumineszenz betrug die kürzest benötigte Probeninkubationszeit des CyanoSensors 8 h. Wenn man bedenkt, daß das Wachstum und der Stoffwechsel von Cyanobakterien verhältnismäßig langsam ist, in der Natur häufig weniger als eine Generation pro Tag (Paerl 1996), kann dieser CyanoSensor als ein schneller Sensor betrachtet werden. Ähnlich wie die APL-Flüssigkultur als Sensor (Gillor et al. 2001) verschob sich der Detektionsbereich des CyanoSensors mit verlängerter Induktionszeit auf höhere Phosphatkonzentrationsbereiche: $0,3 \mu\text{M} - 8 \mu\text{M} \text{PO}_4^{3-}$ nach Inkubation von 8 h und $3 \mu\text{M} - 15 \mu\text{M} \text{PO}_4^{3-}$ nach Inkubation von 15 h unter Beleuchtung von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Somit kann der CyanoSensor ein Gewässer detektieren, das wegen seines PO_4^{3-} -Gehalts, der im Detektionsbereich des CyanoSensors liegt, mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50 % zum eutrophen Status neigt (Klapper 1992). Dieser Detektionsbereich deckt auch die durchschnittliche Konzentration des gelösten Phosphat-Phosphors im Bodensee vom 1980 bis 1994 ($25 \mu\text{g/l} - 93 \mu\text{g/l}$), einem Süßwasser im mesotrophen Status (Stabel und Kleiner 1995). Die Verschiebung des Detektionsbereichs ist die Folge des Phosphatverbrauchs von Sensorzellen (Gillor et al. 2001) und erlaubt die Detektion von verfügbarem Phosphat in höheren Konzentrationen, was bei der Anwendung des Sensors zur Überwachung eines eutrophen Gewässers von besonderer Bedeutung ist.

Außer dem Verbrauch des zellulären Phosphats erhöhen die Mikroorganismen während der phosphatlimitierten Phase ihre Fähigkeit zur Aufnahme des Phosphats aus organischen Quellen, indem sie *de novo* Phosphatasen bilden, durch deren Aktivität das in organischen Verbindungen gebundene Phosphat freigesetzt wird. Die organischen phosphathaltigen Substanzen, wie Phospholipide, Phosphoproteine, Nukleinsäuren, pflanzliches Phytin, totes Biomaterial und tierische Sekretionen, sind in jedem Ökosystem überall und jederzeit vorhanden. Sie sind jedoch nur unter Limitierung von anorganischem Phosphat für die Mi-

krorganismen verfügbar (Grillo und Gibson 1979; Wagner und Falkner 1992; Carmichael 1994). Unterschiedliche organische phosphathaltige Substanzen sind für Cyanobakterien unterschiedlich verwertbar. Zum Beispiel zeigte *Synechococcus* abhängig von den Phosphatquellen unterschiedliche Wachstumsraten und Aktivität der alkalischen Phosphatase (Ihlenfeldt und Gibson 1975). Die Grenze der chemischen Methoden zur Bestimmung des gesamten oder gelösten aktiven Phosphats liegt eben darin, daß sie die phosphathaltigen Substanzen nicht nach ihrer tatsächlichen Verwertbarkeit erfassen können. Die Analysenspektren des CyanoSensors demonstrierten die von den Phosphatquellen abhängige Induktion. Somit ist der CyanoSensor dazu fähig, die wirkliche Bioverfügbarkeit unterschiedlicher Phosphorquellen widerzuspiegeln.

Abhängig vom physiologischen Zustand sind die Reaktionen eines Mikroorganismus auf eine externe Phosphatlimitierung verschiedenartig, was bereits während der Entwicklung des CyanoSensors beobachtet wurde. Darüber hinaus hat jedes Cyanobakterium seinen spezifischen Bedarf an Nährstoffen. Damit der CyanoSensor wirklich als Werkzeug für die Vorhersage einer cyanobakteriellen Blüte eingesetzt werden kann, sind weitere Informationen aus detaillierten und intensiven Untersuchungen unentbehrlich, insbesondere aus langjährigen physiologischen und ökologischen Studien von Cyanobakterien sowie aus den Korrelationsuntersuchungen hinsichtlich des Nährstoffbedarfs zwischen dem Reporterstamm APL und anderen blütenbildenden Cyanobakterien.

Nach Lagerung von drei Wochen wies der CyanoSensor noch eine ausreichende Induzierbarkeit auf, was auf die Lebensfähigkeit der Sensorzellen während der Lagerung hindeutet. Die Abnahme der durch Induktion resultierenden Biolumineszenz in gelagerten CyanoSensoren ist auf das Sterben der Sensorzellen zurückzuführen. Nach dreimonatiger Lagerung war die durch eine Phosphatlimitierung induzierte Biolumineszenz der Sensoren so gering, daß sie praktisch keinen Anwendungswert mehr hatten. Die Beobachtung, daß im Vergleich zu den frisch aufbereiteten CyanoSensoren die gelagerten CyanoSensoren einen niedrigeren Schwellenwert für das Anschalten des *PphoA* und einen Detektionsbereich in niedrigerem Phosphatkonzentrationsbereich aufwiesen, ist durch den Einfluß des externen Phosphats zu erklären. Während der Lagerung kann das in der Decklösung enthaltene Phosphat ins Agargel diffundieren. Ferner kann Phosphat noch durch Zersetzung der toten Biomasse freigesetzt werden. Dieses zusätzliche Phosphat steht bereits während der Lagerung den Sensorzellen zur Verfügung und kann außerdem durch Waschen im Vorkonditionsschritt nicht vollständig entfernt werden. Dadurch wird die Induktion in gelagerten Sensoren gehemmt und infolgedessen der Schwellenwert zum Anschalten des Promotors niedriger. Diese Annahme muß noch durch die Bestimmung des Gehalts an zellulärem Phosphat und der Phosphatkonzentration im Agargel geklärt werden.

Bei der Anwendung von APL-Flüssigkulturen als Sensor in gefilterten Proben aus verschiedenen Tiefen des Sees Genezareth, Israel, konnten Gillor und ihre Mitarbeiter zeigen, daß abgesehen von einigen Proben von einer einzigen bestimmten Stelle im See Genezareth die Luziferase-Aktivität der APL-Zellen umgekehrt proportional zu der chemisch ermittelten Konzentration des gesamten gelösten Phosphats in allen anderen untersuchten gefilterten Umweltproben war (Belkin 2000; Gillor et al. 2001). Dabei wurde keine Rücksicht auf die Beleuchtungsstärke in der entsprechenden Wassertiefe genommen, und eine Interpretation der Meßdaten bezüglich des bioverfügbaren Phosphors war bisher noch nicht möglich. Wie bereits erwähnt, können chemische analytische Methoden die wirkliche Bioverwertbarkeit

der vorhandenen Nährstoffe nicht erfassen. Daher muß theoretisch nicht unbedingt eine Korrelation zwischen dem chemisch ermittelten Gehalt des gesamten oder gelösten Phosphats und der für Cyanobakterien tatsächlich verfügbaren Phosphatmenge bestehen. Aus den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, daß die biosensorisch gemessenen Konzentrationen anorganischen Phosphats in künstlichen Proben mit den chemisch ermittelten Werten gut korrelierten und der CyanoSensor die verfügbare Phosphorquelle nach ihrer Verwertbarkeit erfassen konnte, ist zu erwarten, daß die gemessenen Lumineszenzwerte mit Hilfe eines Modells in eine Äquivalenz des bioverfügbaren Phosphats umgerechnet werden können. Um dieses Modell zu entwickeln, müssen noch Messungen und Untersuchungen von Umweltproben mit CyanoSensoren durchgeführt werden.

Ohne Zusatz von bestimmten Spurenmetallen in Umweltproben veränderte sich der physiologische Zustand der APL-Zellen so stark, daß die Durchführung eines Induktionsversuchs mit den Zellen nicht möglich war (Gillor et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit kamen die guten Ergebnisse bei der Messung der künstlichen Proben mittels CyanoSensoren vermutlich nur dadurch zustande, daß die Konzentrationen anderer Nährstoffe annähernd konstant gehalten wurden wie die in den Standardverdünnungsreihen, so daß die durch physiologische Veränderungen hervorgerufenen Artefakte vermieden werden konnten. Im Gegensatz zu Umweltproben ist dies in Matrices wie Leitungswasser oder Mineralwasser recht einfach zu erzielen. Algenblüten treten jedoch unter sehr unterschiedlichen limnologischen und hydrologischen Bedingungen auf. Außerdem kann das bioverfügbare Phosphat in ungelöster Form vorkommen, das auf Sedimenten, Kolloiden und Partikeln adsorbiert und dadurch nach Filtration nicht mehr erfaßt werden kann. In einer Umweltprobe können noch Mikroorganismenfreßer vorhanden sein, welche die Sensorzellen während des Versuchs zehren. Für die praktische Anwendung müssen daher die Robustheit des CyanoSensors noch untersucht und die notwendige sowie geeignete Vorbehandlung der Umweltprobe entwickelt werden.

4.1.4 Vergleich des CyanoSensors mit der Flüssigkultur als Sensor

Der grundlegende Unterschied zwischen dem CyanoSensor und der Flüssigkultur als Sensor besteht im Aufbau des Assays. Während das externe Phosphat der Flüssigkultur vor Beginn des Induktionsversuchs durch das Waschen mit einem phosphatfreien Medium nahezu vollständig entfernt und somit sein Einfluß auf das Assaysystem auf das Minimum reduziert werden konnte, waren Spuren von Phosphat im CyanoSensor und in der Decklösung für die Lagerung zur Lebenserhaltung der Zellen notwendig. Die dadurch ermöglichte Lagerfähigkeit des immobilisierten Sensors muß jedoch den Nachteil in Kauf nehmen, daß das im CyanoSensor enthaltene Phosphat die Induktion der *de novo* Synthese vom Reporterprotein in APL-Zellen repremiert. Nach dem Protokoll zur Herstellung des CyanoSensors betrug die Phosphatkonzentration in einem frisch hergestellten CyanoSensor $0,213 \mu\text{M}$. Demzufolge liegt die theoretisch berechnete PO_4^{-3} -Konzentration in einer Kavität mit $1,5 \text{ ml BG-11}_{(-\text{P})}$ als Induktionslösung bei $27,8 \text{ nM}$.

Mit der APL-Flüssigkultur als Sensor wurde nach einer Induktionszeit von 30 h unter Beleuchtung mit $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ein Detektionsbereich von 2 nM bis $2 \mu\text{M}$ Phosphat erreicht (Gillor et al. 2001). Abgesehen von der Induktionszeit, die fast doppelt so lang war wie

die in den mit CyanoSensor durchgeführten Experimenten, wies im Vergleich zum CyanoSensor die flüssige APL-Kultur als Sensor eine um etwa 100fach niedrigere Meßgrenze und infolgedessen einen 100fach breiteren Detektionsbereich auf. Der Detektionsbereich der APL-Flüssigkultur ist vergleichbar mit dem der spektroskopischen Methode (Zimmermann und Platen 2000). Aus dem oben genannten Grund kann der CyanoSensor diesen Detektionsbereich niemals erreichen. Dennoch ist, wie bereits gezeigt, der CyanoSensor durchaus in der Lage, ein Gewässer zu detektieren, das aufgrund seines Phosphatgehalts mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50 % zur Eutrophierung mit Folgen wie Wasserblüten neigt (Klapper 1992). Der auf Basis zahlreicher langjähriger Studien postulierte Schwellenwert des Phosphors für die Entstehung der cyanobakteriellen Blüten, 10 mg/m^3 (Abb. 1.1), kann ebenfalls vom CyanoSensor erfaßt werden. Eine noch niedrigere Detektionsgrenze scheint nach bisherigen wissenschaftlichen Kenntnissen nicht notwendig zu sein. Außerdem muß noch einmal betont werden, daß es sich hier nicht um die Entwicklung einer Methode mit einer niedrigeren Detektionsgrenze handelt, sondern um die Entwicklung einer Methode mit der Fähigkeit, die Bioverfügbarkeit der Nährstoffe in physiologischen und ökologischen wichtigen Konzentrationsbereichen zu erfassen.

Gegenüber der Flüssigkultur als Sensor bietet der CyanoSensor einige in dieser Arbeit zum Ziel gesetzte Verbesserungen, nämlich die Vereinfachung der Assaydurchführung, die Verringerung des benötigten Platzes für den Assay, den möglichen Einsatz in der Vor-Ort-Messung und die Lagerfähigkeit des Sensors. Somit ist das Ziel im ersten Teil der hier vorgestellten Arbeit erreicht.

4.2 Entwicklung des CyanoArrays zur Detektion von *Microcystis* und *mcy*

Die gesundheitsschädlichen Wirkungen der cyanobakteriellen Blüten erfordern eine zuverlässige Methode zur qualitativen Detektion der toxinbildenden Cyanobakterien und eine vorbeugende Methode zur vorzeitigen Erkennung eines potentiellen Ausbruchs der Toxinbildung. Dazu eignet sich besonders ein molekulargenetisches System für die Identifizierung der toxischen Cyanobakterien und die Detektion der Gene, die für die Synthese der Toxine verantwortlich sind. Aufgrund der aufgeklärten strukturellen Organisation der Microcystinbiosynthese und der entschlüsselten Sequenz des Microcystin-Synthetase kodierenden Gens (*mcy*) wurden in der vorliegenden Arbeit das Gen *mcy* und die cyanobakterielle Gattung *Microcystis*, der in Wasserblüten am häufigsten anzutreffende Produzent der Microcystine, als Modellsequenz und -mikroorganismus ausgewählt. Die Ausgangsidee dieser Arbeit war, einen möglichst einfachen, schnellen und zuverlässigen Assay zur gleichzeitigen Detektion von *Microcystis*-Stämmen und *mcy* zu entwickeln. Dies wurde mittels eines Mikroarrays mit spezifischen Oligonukleotid-Sonden erreicht.

4.2.1 Entwurf der Sonden

Ein auf dem Oligonukleotid-Array basierender Assay beruht auf der spezifischen Hybridisierung der Targets mit ihren Sonden. Die Sondenspezifität wird in erster Linie während

des Entwurfs durch die eingestellten Parameter *in silico* bestimmt. In der Praxis wird dann die erwünschte spezifische Hybridisierung durch geeignete Versuchsbedingungen erreicht, während die unspezifische Hybridisierung unter denselben Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden muß. Dabei spielt T_d , die Dissoziationstemperatur, eine wesentliche Rolle. Viele Faktoren beeinflussen T_d einer Nukleinsäuresequenz (Tijssen 1993). Außer einigen aus unterschiedlichen Publikationen, eventuell mit Modifikationen übernommenen Sonden, die vor allem als positive Kontrolle des Arrays dienten, waren alle im Rahmen dieser Arbeit entworfenen Sonden ohne Haarnadelschlingen und hatten eine Länge von 18 bp und einen GC-Gehalt von 50 %, so daß ihre T_d nach der empirischen Gleichung $T_d (\text{°C}) = 4 \cdot N_{G+C} + 2 \cdot N_{A+T}$ bei 54 °C lag. Dennoch wurden mit einigen in dieser Art entworfenen Sonden nie zufriedenstellende Hybridisierungen erhalten. Selbst die mit den gleichen Parametern konstruierten Sondenpaare zeigten richtungsabhängige Unterschiede in der Signalstärke. Zum Beispiel wurde die extrem starke Hybridisierung mit 1378_f, die wahrscheinlich auf ihren hohen Gehalt an GC und die daraus resultierende hohe T_d zurückzuführen ist, mit ihrer komplementären Sonde 1387_r nie erhalten. Da alle Sonden keine Haarnadelschlingen besaßen und ein zueinander komplementäres Sondenpaar zu sehr unterschiedlichen Hybridisierungsergebnissen führte, liegt das Problem offensichtlich nicht allein in der Sekundärstruktur der Sequenzen. Ferner wurde beobachtet, daß sich die Hybridisierungsergebnisse derjenigen Sonden stark voneinander unterschieden, die die gleiche berechnete T_d besaßen und deren Hybridisierungsstellen sich an demselben Nukleinsäurenstrang, jedoch an verschiedenen Stellen befanden. Obwohl es keine allgemeingültigen Regeln für den Sondenentwurf zu geben scheint, wurde in dieser Arbeit beobachtet, daß die Sonden tendenziell zur besseren Hybridisierung führten, wenn ihre Hybridisierungsstellen im ersten Drittel des 5'-Ende des Targets lagen. Die Hybridisierungsstärke der Sonde stieg, wenn sich die Position ihrer entsprechenden Hybridisierungsstelle dem 5'-Ende des Targets näherte.

Eine beachtenswerte Entdeckung ist der positive Einfluß des partiellen DNase-Verdaus der Targets vor der Hybridisierung auf die Hybridisierungseffizienz. Diese enzymatische Behandlung konnte außerdem die richtungs- und positionsabhängigen Unterschiede in der Hybridisierung leicht verringern. Die Wirkung der enzymatischen Fragmentierung ist auf die folgende Tatsache zurückzuführen: Während des DNase-Verdaus entstehen durch unspezifisches Schneiden viele kleine Fragmente aus den ursprünglich langen Amplikons. Dies bedeutet, daß jede Position im ursprünglichen Amplikon nach der Fragmentierung das 5'-Ende eines kleinen Fragments sein kann. Anders betrachtet liegt die Hybridisierungsstelle einer Sonde, die ursprünglich eher in der Mitte oder am 3'-Ende des Amplikons liegt, jetzt mit großer Wahrscheinlichkeit näher am 5'-Ende eines neuen kleinen Fragments. Wie bereits im vorigen Kapitel gezeigt, fand in den meisten Fällen das 5'-Ende des Targets besser an der entsprechenden Sonde. Daher konnte die richtungs- und positionsabhängige Hybridisierung durch die Fragmentierung mit DNase leicht verringert werden. In FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) wurde gezeigt, daß die Hybridisierungseffizienz einer Sonde durch zugesetzte, sogenannte Hilfsoligonukleotide erhöht werden konnte (Fuchs et al. 2000). Die Hilfsoligonukleotide binden an Sequenzen neben der Hybridisierungsstelle der Sonden und schwächen dadurch die Bildung der Sekundärstruktur der in FISH als Target dienenden rRNA sowie die Wechselwirkungen der rRNA mit ribosomalen Proteinen. Infolgedessen wird dann die Hybridisierungsstelle im Target für die Sonde zugänglicher sein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung der Sekundärstruktur in Targets

durch Fragmentierung inhibiert bzw. aufgehoben. Außerdem sind die durch Fragmentierung entstandenen kürzeren dsDNAs thermoinstabiler und werden leichter zur ssDNAs überführt. Aufgrund der enzymatischen Aktivität der DNase liegen manche Stellen in der Targetfragmenten bereits nach dem partiellen Verdau als ssDNAs vor (Sambrook et al. 2000). All diese genannten Wirkungen der Fragmentierung mittels DNase begünstigen die Hybridisierung und haben eine erhöhte Hybridisierungseffizienz zur Folge. Daß die von der Sondenrichtung und -position abhängigen Hybridisierung bei der Verwendung der mittels Random-Priming und Nick-Translation hergestellten Targets als schwächer beobachtet wurde, unterstützt ebenfalls die Erklärungen.

Das Problem mit der richtungs- und positionsabhängigen Hybridisierung wurde auch von anderen Wissenschaftlern beobachtet (Southern et al. 1994; Behr et al. 2000; Schedl et al. 2000; Ezaki 2001). Dies verhindert eine sequenzunabhängig einheitliche Hybridisierung in einer auf der Mikroarraytechnik basierenden Analytik und bringt viele unerwartete Probleme in der Entwicklung sowie Anwendung eines Mikroarrays. In der Arbeitsgruppe von Southern wurden daher Grundlagenforschung mit Oligonukleotid-Mikroarrays betrieben, zum Beispiel die Auswirkung von Faktoren wie Gestalt, Länge und die Basenzusammensetzung der Target- und Sondensequenz auf die Hybridisierungseffizienz (Southern et al. 1994). Momentan ist es noch nicht möglich, *in silico* den besten Sequenzbereich und die richtige Richtung für die Sonden zu finden. Im Regelfall muß, wie in der vorliegenden Arbeit, für eine Targetsequenz Sonden in unterschiedlichen Positionen des Targets und in beiden Richtungen empirisch untersucht werden.

Abgesehen von den Aufgaben und dem verwendeten Trägermaterial für die Sondenimmobilisierung unterscheiden sich der CyanoArray und der von Rudi et al. (2000) vorgestellte Array auf Nylonmembran zur Detektion von Cyanobakterien in der Konzeption und den daraus resultierenden Eigenschaften der Sonden. In der Arbeit von Rudi und Mitarbeitern wurde eine Oligonukleotid-Sequenz als Primer zur spezifischen Markierung des Targets eingesetzt, während ihre komplementäre Sequenz als Sonde verwendet wurde. Somit ergab sich in ihrer Arbeit für jedes Target nur eine Sonde, die sich erstens an einer speziellen Stelle, nämlich am Ende der markierten Targets, befand, und zweitens den zur spezifischen Markierung eingesetzten „Primer“ detektiert. Wie bereits anhand der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und anderen bisherigen Forschungsarbeiten verdeutlicht, beeinflussen die Sekundärstruktur des Targets und die Basenzusammensetzung der Sonden erheblich die Hybridisierungseffizienz. In der Regel wird daher in der Mikroarraytechnik vermieden, eine Sonde zur Detektion der Endsequenz eines Targets oder des für die Targetmarkierung eingesetzten Primers zu verwenden. Eine besondere Stärke der Analytik mittels Mikroarrays ergibt sich zweifellos aus der hochredundanten Messung vieler paralleler Hybridisierungsereignisse. Diese Redundanz, die ein hohes Maß an Nachweissicherheit gewährleistet, besteht nicht in der mehrfachen Plazierung identischer Sonden für die mehrfache Hybridisierung auf dem Array, sondern darin, daß viele Sonden mit unterschiedlicher Sequenz für eine Targetnukleinsäure vorhanden sind. Aus dieser Sicht nutzte der hier entwickelte CyanoArray, der für ein Target mehrere Sonden enthielt, die Stärke und die Vorteile der Mikroarraytechnik besser und bot dementsprechend eine höhere Nachweissicherheit als der von Rudi et al. vorgestellte Array.

Da die Entdeckung des Gens der Microcystin-Synthetase (*mcy*) relativ neu war (Meißner et al. 1996; Dittmann et al. 1996; Dittmann et al. 1997) und bislang das *mcy*-Operon

nur aus zwei *Microcystis*-Stämmen sequenziert worden ist (Nishizawa et al. 2000; Tillett et al. 2000), wurden anhand der verfügbaren partiellen Sequenzen an zwei Stellen im *mcy*-Operon zwei Datensätze, *mcyA*(NMT) und *mcyB-mcyC*, als Grundlagen für den Sondenentwurf erstellt. Innerhalb jedes Datensatzes sind die Sequenzen mit einer Identitätsquote von über 94 % hoch konserviert und weisen weniger als 1 % Sequenzähnlichkeit (Similarität) zu den nächsten ähnlichen Sequenzen in der Datenbank von EMBL und GenBank auf. Der Grund, weshalb bei der Verwendung von *mcyB-mcyC*-Amplikons als Targets die Kreuzhybridisierung mit einer Universalsonde zur Genotypisierung beobachtet wurde, die theoretisch nicht vorkommen soll und sich mit höherer Stringenz nicht vollständig beseitigen ließ, bleibt ungeklärt. Dies unterstreicht jedoch die dynamische Beweglichkeit einer Genbank und der daraus entworfenen Sonden. In der Tat gibt es noch viel mehr unbekannte Gene, die daher beim Sondenentwurf nicht berücksichtigt werden können. Sobald eine neue Gensequenz bekannt wird, könnten die bisher gültigen Sonden oder die molekulare Klassifizierung ungültig werden (Ludwig et al. 1998).

4.2.2 Optimierung der Targetvorbereitung

Unabhängig von der Hybridisierungstechnik spielen die Amplifikation und Markierung der Targets eine entscheidende Rolle in der Empfindlichkeit und Robustheit eines auf Mikroarray basierenden Assays. In der vorliegenden Arbeit wurden die Targets mittels einer PCR amplifiziert, die ihrerseits nur 0,5 μg –1,0 μg vom DNA-Extrakt benötigte. Somit können Targets aus einer in einer Probe nur in geringer Kopienzahl vorhandenen Sequenz oder aus nicht bzw. schwer kultivierbaren Mikroorganismen ohne jegliche Kultivierung und Anreicherung gewonnen werden. Dadurch konnte die Probenvorbereitung wesentlich vereinfacht und die Diskriminierung der Mikroorganismen vermieden werden, die mit einer zeitaufwendigen laboratorischen Kultivierung und Anreicherung von Mikroorganismen einhergeht und zu falschen Ergebnissen führt. Obwohl das fluoreszenzmarkierte Nukleotid Cy3-dUTP die Polymerase-Aktivität hemmt (Molecular Dynamics 1999), konnte die im vorigen Kapitel dargestellten Ergebnisse demonstrieren, daß die Ausbeute der in dieser Arbeit verwendeten PCR mit Cy3-dUTP-Markierung für mehrere Hybridisierungsversuche ausreichte. Verglichen mit dem von Rudi et al. (2000) entwickelten Assay, wo die Amplifikation und die Markierung in zwei Schritten hintereinander durchgeführt wurden, wurde die Targetvorbereitung durch die Kombination von Amplifikation und Markierung in einer einzigen PCR vereinfacht. Durch den unspezifisch auf den ganzen Amplikon verteilten Einbau von Cy3-dUTPs ist die Fluoreszenz eines solchen Targets viel stärker als die eines am Sequenzende markierten Fragments, und demzufolge wird die Detektionsgrenze des Assays verbessert. Außerdem sind die auf diese Weise markierten Targets nach der Fragmentierung, die sich während der Assayentwicklung als eine notwendige Maßnahme zur Erhöhung der Hybridisierungseffizienz herausstellte, immer noch in der Hybridisierung einsetzbar. In der vorliegenden Arbeit ist die Einbaurate von Cy3-dUTP in die PCR-Produkte offensichtlich ausreichend für eine direkte Detektion der Hybridisierungssignale. Selbst mittels Ethidiumbromid gefärbte, unter UV-Anregung kaum sichtbare Amplikons konnten nach Hybridisierung mit dem Array eindeutig detektiert werden. Die häufig in der Hybridisierungsdetektion verwendete, mit Enzymen zur Verbesserung der Nachweisgrenze gekoppelte indirekte Detektion (Behr et al. 2000; Rudi et al. 2000) ist daher nicht notwendig. Die Fähigkeit und der Erfolg einer Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Aufbe-

reitung von zwei Targetfragmenten konnten ebenfalls in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Zwar wurden je nach dem eingesetzten Template die beiden Targets mit teilweise stark abweichender Effizienz amplifiziert, dies spielt jedoch in einem qualitativen Detektionssystem keine Rolle. Da die Erhöhung der Anzahl der zu amplifizierenden und markierenden Fragmente in einer Multiplex-PCR möglich ist (Henegariu et al. 1997), ist voraussehbar, daß noch mehr für die Diagnostik der molekularen Ökologie wichtige Targetfragmente mittels der Multiplex-PCR vorbereitet und deren Sonden in den bisher entwickelten CyanoArray einbezogen werden. Dadurch können die Anwendungsbereiche des auf der Mikroarraytechnik basierenden Assays erweitert werden.

Die Amplifikationseffizienz einer PCR hängt nicht nur von der perfekten Sequenzpaarung zwischen dem Template und den Primern, sondern auch von der zu amplifizierenden Sequenz ab. Aus diesem Grund können manche Sequenzen trotz der perfekten Basenpaarung mit Primern diskriminiert und mittels PCR nicht mit amplifiziert werden, was dann zum falschen Ergebnis führt. Wie im vorigen Kapitel gezeigt, bietet die Nick-Translation eine interessante Alternative zur PCR in der Markierung von gesamten genomischen DNA-Extrakten. Da aber die Templates während der Nick-Translation nicht amplifiziert werden, haben die Ergebnisse ebenfalls gezeigt, daß für eine direkte Detektion die Signalstärke der nur in weniger Kopienzahl vorhandenen Gene nicht ausreichend war. Dafür sollte wohl doch eine indirekte Detektion mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion zur Signalvergrößerung eingeschaltet werden.

Bei der Verwendung des CyanoArrays in Umweltproben stellte sich heraus, daß der mittels Phenol/Chloroform gewonnene DNA-Extrakt aus einer Umweltprobe Substanzen enthielt, die die Polymerase-Aktivität hemmten und zum Mißlingen der Targetvorbereitung mittels PCR führten. Eine häufig in Umweltproben vorkommende, enzymaktivitätshemmende Substanz ist die Huminsäure aus Sedimenten. Außerdem haben die Cyanobakterien noch die Besonderheit, daß sie allgemein eine große Menge von klebrigen Polysacchariden in ihrer Zellwand enthalten, die nicht nur ein vollständiges Lysieren der Zellen erschweren, sondern auch die meisten Reinigungsverfahren für Nukleinsäuren, einschließlich kommerziellen Kits zur DNA-Isolierung, zum Scheitern bringen. Ein DNA-Extrakt von Cyanobakterien kann vor allem noch reich an Pigmenten der Photosynthesenapparatur sein, die viele der darauf folgenden enzymatischen Reaktionen hemmen. Folglich wurden seit Mitte der achtziger Jahre verschiedene spezielle Methoden zur DNA-Isolierung aus Cyanobakterien entwickelt (Reith et al. 1986; Porter 1986; Golden et al. 1987; Joset 1988; Giovannoni et al. 1990; Mak und Ho 1991; Cohen et al. 1994; Palenik 1994; Jackman und Mulligan 1995; Leff et al. 1995; Kramer et al. 1996; Ferris et al. 1996; Nishihara et al. 1997; West und Adams 1997). Die meisten konnten jedoch nur DNAs aus bestimmten Cyanobakterien isolieren oder versagten bei den Umweltproben. Vor kurzem haben Tillett und Neilan eine einfach durchzuführende und vielversprechende Methode zur Isolation der Nukleinsäure mittels Xanthogenat vorgestellt (Tillett und Neilan 2000). Mit Hilfe dieser Methode konnten DNAs oder RNAs aus allen getesteten bakteriellen und cyanobakteriellen Stämmen sowie algenblütenhaltigen Umweltproben isoliert werden. Sie konnten ferner nachweisen, daß im Gegensatz zu anderen Nukleinsäureextrakten die mittels Xanthogenat gewonnenen DNA- oder RNA-Extrakte keine Polymerase-Aktivität hemmenden Substanzen enthielten. In der vorliegenden Arbeit konnte das Problem mit der DNA-Extraktion aus Cyanobakterien in Umweltproben mit Hilfe einer kommerziellen Reinigungssäule und an-

gegebenen Modifikationen umgangen werden. Hinsichtlich der Probenvorbereitung im auf dem CyanoArray basierenden Assay muß jedoch noch überprüft werden, ob sich das Problem tatsächlich durch die Reinigungssäule und Modifikationen konsequent lösen läßt oder die Xanthogenat-Methode in den Assay einbezogen werden muß.

4.2.3 Bewertung des CyanoArrays

Technisch bedingt können die meisten molekularbiologischen Methoden zur genetischen Analyse von Mikroorganismen, wie FISH (Amann et al. 1995; Schönhuber et al. 1999; Daims et al. 1999; Fuchs et al. 2000), Dot-Blot-Hybridisierung (Stahl 1995) und selektive PCR (Rudi et al. 1997; Moffitt et al. 2001), zur gleichen Zeit nur einen oder eine kleine Gruppe von ausgesuchten Mikroorganismen detektieren. Im Gegensatz dazu ermöglicht der Oligonukleotid-Mikroarray das Screening von einer Vielzahl von Sonden in ein und demselben Versuch, selbst wenn unterschiedliche Aufgaben vorliegen wie im Fall dieser Arbeit.

4.2.3.1 Genotypisierung

Nach der Sequenzierung wurde festgestellt, daß einige abweichende Basen in den 16S rRNAs der *Microcystis*-Stämme, die zunächst als die einzigen möglichen Stellen für die Sonden zur Differenzierung der Stämme schienen, lediglich Fehler in der Datenbank von EMBL und GenBank sind oder mit geringer Wahrscheinlichkeit die unterschiedlichen Sequenzen der 16S rRNA eines einzelnen Stamms sein können. Heterogenität der Sequenzen von 16S rRNA innerhalb eines Stamms kommt in der Natur vor (Fox et al. 1992; Manz et al. 1992; Stackebrandt und Goebel 1994; Clayton et al. 1995; Nübel et al. 1996) und erschwert den Entwurf stammspezifischer Sonden. Die Ausgangsidee dieser Arbeit, einen Oligonukleotid-Mikroarray anhand der Sequenzen von 16S rRNA zur Identifizierung von toxischen *Microcystis*-Stämmen zu entwickeln, um eine morphologische Bestimmung der Taxonomie zu ersetzen, ist aufgrund der zu hohen Sequenzähnlichkeit innerhalb der 16S rRNAs der *Microcystis*-Stämme gescheitert. Selbst in ITS zwischen 16S und 23S rDNA, der normalerweise hoch variabel ist, erweisen 47 untersuchte *Microcystis*-Stämme eine Sequenzähnlichkeit von 93,3% – 100% (Otsuka et al. 1999). Ein SONDENSATZ zur Differenzierung von *Microcystis* auf der Stammebene kann wahrscheinlich nur unter Verwendung der Gensequenzen als Targets ermöglicht werden, die eine noch höhere Variabilität aufweisen, z. B. IGS im Phycocyanin-Operon (Neilan et al. 1995).

Abgesehen von der molekularen Klassifizierung auf der Stammebene ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, einen Oligonukleotid-Mikroarray mit den Sonden auf der Gattungsebene für *Microcystis* als Prototyp zu entwickeln und die SONDENSPEZIFITÄT unter den ermittelten Hybridisierungsbedingungen zu gewährleisten, worin die Problematik aller auf SONDENSPEZIFITÄT basierenden Technik liegt. Zusätzlich enthält dieser Array noch Sonden auf höheren taxonomischen Ebenen. Momentan dienen solche Sonden in dem einfachen Array nur als positive Kontrolle. In der Praxis können sie nach Erweiterung der erfaßten Arten von Mikroorganismen im Array von großer Bedeutung sein. Zum Beispiel weist ein positives Signal mit den gattungsspezifischen Sonden (Sonden auf höheren taxonomischen

Ebenen) auf die Anwesenheit einer noch unbekanntes oder noch nicht im Array erfaßten Art dieser Gattung hin, wenn gleichzeitig die Hybridisierung mit allen artenspezifischen Sonden (Sonden auf niedrigeren taxonomischen Ebenen) negativ ist.

4.2.3.2 Detektion von *mcy*

Aus der genetischen Analyse stellte sich heraus, daß zwischen der 16S rRNA und der Toxizität der *Microcystis*-Stämme keine Korrelation besteht (Neilan et al. 1997; Otsuka et al. 1999). Unter Verwendung von Genfragmenten als Sonden haben Neilan et al. und Nishizawa et al. mittels Dot-Blot- und Southern-Hybridisierung festgestellt, daß die Bildung von Microcystinen in vielen *Microcystis*-Stämmen mit der Anwesenheit von *mcyB* bzw. der Adenylierungsdomäne in *mcyABC* gekoppelt ist (Neilan et al. 1999; Nishizawa et al. 1999). Bezüglich des Vorhandenseins von *mcyA(NMT)* in toxischen *Microcystis*-Stämmen entsprechen die neuesten Ergebnisse von Tillett et al. (2001) den bisherigen Kenntnissen. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß hinsichtlich einer zuverlässigen Bewertung des toxischen Potentials der cyanobakteriellen Blüten die Kombination von den Sonden zur Genotypisierung mit denen, die spezifisch für die repräsentativen Fragmenten im Gen der Microcystin-Synthetase sind, die besten Voraussetzungen bietet. Die vorliegende Arbeit zeigte, daß die Amplikons aus allen microcystinproduzierenden *Microcystis*-Stämmen an mindestens zwei von den konstruierten Sonden für *mcyA(NMT)* banden, während die Amplikons aus microcystinnichtbildenden *Microcystis*-Stämmen sowie anderen Cyanobakterien und Bakterien zu keiner positiven Hybridisierung mit Sonden für *mcyA(NMT)* führten. Beachtenswert ist, daß die *mcyA(NMT)*-Sequenzen von nur zwei von den sieben getesteten toxischen *Microcystis*-Stämmen bekannt sind. Dies bestätigt die Fähigkeit dieser Sonden zur Detektion von *mcyA(NMT)*. Selbst wenn die selektive PCR für *mcyA(NMT)* unspezifische Amplikons erzeugte, wurde mit ihnen keine unspezifische Hybridisierung detektiert. Die hohe Spezifität dieser Sonden wird dadurch noch einmal unterstrichen. Verglichen mit der Verwendung der Fragmente von *mcy* als Sonden für dessen Detektion zeichneten sich die für den CyanoArray konstruierten Oligonukleotid-Sonden durch folgende Vorteile aus: 1. Sie sind durch Synthese für jeden Anwender leicht verfügbar; 2. Sie besitzen die gleiche oder ähnliche Hybridisierungseigenschaft wie die gängigen Sonden zur genetischen Klassifizierung und können daher ohne weitere Modifikationen in demselben Array aufgenommen werden. Somit werden auch die Anwendungsbereiche des Arrays erweitert.

Aus ihren Untersuchungsergebnissen kamen Nishizawa und Tillett zu den Schlußfolgerungen, daß alle getesteten microcystinproduzierenden *Microcystis*-Stämme das Gen *mcy* besitzen. Die microcystinnichtproduzierenden *Microcystis*-Stämme können jedoch *mcy* entweder enthalten oder nicht enthalten (Nishizawa et al. 1999; Tillett et al. 2000). Kaebnick et al. (2000) haben berichtet, daß die Bildung von Microcystin-Synthetase und die Produktion von Microcystinen in *M. aeruginosa* PCC 7806 nicht von denselben Faktoren reguliert werden und zwischen der Menge an Microcystin-Synthetase und der Menge der gebildeten Microcystinen keine kausale Beziehung besteht. Die Anwesenheit von *mcy* in *Microcystis*-Stämmen ist daher nicht das einzige Kriterium für einen definitiven Ausbruch der Produktion von Microcystinen. In allen Fällen bedeutet jedoch eine positive Hybridisierung mit den Sonden zur Detektion von *mcyA(NMT)* die Anwesenheit von *mcy* und eine bereits vorhandene oder potentielle Gefahr in Gewässern. In diesem Sinne kann der

CyanoArray einen wesentlichen Beitrag zur vorzeitigen Erkennung der bevorstehenden Gefahr von Toxinbildung leisten. In der vorliegenden Arbeit wurde kein *mcyA(NMT)* in microcystinnichtproduzierenden *Microcystis*-Stämmen gefunden. Es ist daher höchst interessant, mittels des in dieser Arbeit entwickelten CyanoArrays die Stämme zu untersuchen, die von Nishizawa und Tillett als nicht toxisch, jedoch mit der Ausstattung von *mcy* im Genom, geschildert wurden.

4.2.3.3 Anwendung des CyanoArrays

Bei der Anwendung des CyanoArrays zeigten zwei Umweltproben eine gute qualitative Korrelation zwischen den Ergebnissen des CyanoArrays und den der mikroskopischen und immunchemischen Untersuchungen. In der dritten Probe führten die unterschiedlichen Methoden zu uneinheitlichen Aussagen. Eine plausible Erklärung liegt in der unsachgemäßen Behandlung und Lagerung der Probe nach der Probennahme, so daß die zur Diagnostik benötigten Nukleinsäurefragmente wahrscheinlich bereits vor Beginn des Versuchs mit dem CyanoArray abgebaut worden waren, während die gegen chemische und biologische Degradation stabilen Microcystine, seien es bereits in der Probe vorhandene oder erst während des Zellabbaus freigesetzte, in dieser Probe chemisch noch detektierbar waren. Außerdem kann es noch nachfolgend genannte tiefgründige genetische Ursache geben. Microcystine werden auch von anderen Cyanobakterien, wie *Anabaena*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* und *Planktothrix* produziert. Mittels Dot-Blot-Hybridisierung haben Neilan und Mitarbeiter bereits nachweisen können, daß ein 1,157 bp *mcy*-Fragment aus dem toxischen *Microcystis aeruginosa* HUB 524 mit genomischen DNAs aus microcystinbildenden Cyanobakterien anderer Gattungen hybridisieren konnte (Neilan et al. 1999). Mit Hilfe anderer molekularer Methoden wie REP-PCR und RELF haben Lyra et al. die Inkonsistenz zwischen der genetischen Klassifizierung und der Toxizität über einen großen Umfang von cyanobakteriellen Gattungen bestätigen können (Lyra et al. 2001). Über die Gensequenzen und -homologie der Microcystin-Synthetasen aus anderen cyanobakteriellen Gattungen ist bisher noch nichts bekannt. Da mittels des CyanoArrays in der dritten Probe Cyanobakterien detektiert wurden, ist es durchaus möglich, daß die chemisch detektierten Microcystine von Cyanobakterien anderer Gattungen als *Microcystis* produziert worden waren. Ob dieser CyanoArray in der Lage ist, das Gen der Microcystin-Synthetase aus anderen cyanobakteriellen Gattungen zu detektieren, muß noch in weiteren Versuchen geklärt werden.

Obwohl bereits über 60 Varianten der natürlich vorkommenden Microcystine identifiziert wurden, gibt es nur 4 käufliche Standardverbindungen (Hummert 2000). Dies erschwert die Analytik der Microcystine mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ohne Kopplung mit Massenspektrometrie zur Detektion. Mittels immunchemischer Methode ist es wegen der Kreuzaktivität der verwendeten Antikörper nicht möglich, die einzelnen Substanzen zu differenzieren. Die Varianten der Microcystine unterscheiden sich je nach den variablen Aminosäuren und anderen Modifikationen in den Grundgerüsten stark in ihrer Toxizität. Ein in Microcystin-LR-Äquivalent umgerechneter Meßwert kann daher die wirkliche Toxizität nicht widerspiegeln. Die molekulargenetische Methode bietet eine mögliche Lösung für das Problem, indem die Teilsequenzen, die die Domänen in Microcystin-Synthetasen für die Erkennung der variablen Aminosäuren sowie für deren

Modifikationen kodieren, mit ihren spezifischen Sonden im Mikroarray detektiert werden. Sollte dies gelingen, können die Analysendaten hinsichtlich der Toxizität besser bewertet und im Fall eines potentiellen Ausbruchs der Toxinbildung geeignetere Maßnahmen ergriffen werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

Im Anfangsteil dieser Arbeit konnte ein Reporterassay im immobilisierten Format entwickelt werden. Mit diesem System ließ sich die für Cyanobakterien verfügbare Phosphorquelle in Gewässern erfassen. Durch Immobilisierung wurde die Durchführung des Assays wesentlich vereinfacht, der für den Versuch benötigte Platz verkleinert und der Sensor lagerfähig und für Vor-Ort-Messungen einsetzbar gemacht. Um seinen Einsatz in der Überwachung und Voraussage der Bildung von cyanobakteriellen Blüten zu überprüfen, müssen noch Untersuchungen mit dem in dieser Arbeit entwickelten Sensor in Umweltproben stattfinden. Da es sich bei diesem System um einen *in vivo* Assay handelt, der von den Eigenschaften und vor allem dem physiologischen Zustand der Sensorzellen abhängig ist, muß noch ein Modell für die Interpretation und Übertragung der gemessenen Daten entwickelt werden. Da das cyanobakterielle Auftreten und der Ausbruch der Wasserblüten nicht nur von einem einzigen Umweltfaktor wie der Verfügbarkeit von Phosphor, sondern von komplexen Wechselwirkungen mit vielen Faktoren abhängig sind, ist die weitere Konstruktion von Reporterstämmen unter Verwendung von anderen Promotoren sowie aus anderen Wildtypstämmen für ein umfassendes System zur Überwachung von Gewässern und zur Voraussage der Wasserblütenbildung unentbehrlich.

Ein wesentlicher Fortschritt, der im Fortgang dieser Arbeit erzielt wurde, ist die Möglichkeit, ohne Kultivierung *Microcystis*-Stämme und das Gen der Microcystin-Synthetase (*mcy*) in einer Wasserprobe mittels des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Oligonukleotid-Mikroarrays in einem Versuch objektiv und zuverlässig zu detektieren. Eine positive Hybridisierung mit den Sonden zur Detektion von *mcy* ist ein Anzeichen für die vorhandene oder potentielle Toxizität der Probe. Mittels der Multiplex-PCR unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden ließen sich die Targetvorbereitung und die Detektion vereinfachen. Außer der Miniaturisierung liegt ohne Zweifel ein wesentliche Vorteil eines Mikroarrays in seiner praktisch unbegrenzten Fähigkeit zur Erweiterung. Es ist denkbar, Sonden zur Detektion von anderen Cyanobakterien oder überhaupt anderer Mikroorganismen als eine Biodiversitätsanalyse eines Ökosystems in den vorhandenen Prototyp des Arrays zu integrieren. Sollten die Gensequenzen, die für die Synthese anderer Cyanotoxine verantwortlich sind, bekannt sein, könnten die entsprechenden Sonden konstruiert und in den Array aufgenommen werden, um das Detektionsspektrum des Arrays zu erweitern.

A Anhang

A.1 Medien und Lösungen

BG-11 (Rippka 1988) und vom BG-11 abgeleitete Varianten

NaNO ₃	1,5 g
K ₂ HPO ₄	0,04 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,075 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,036 g
Zitronensäure	6 mg
Eisenammoniumcitrat	0,6 mg
Na ₂ MgEDTA · H ₂ O	1,0 mg
Na ₂ CO ₃	0,04 g
Spurenelementenlösung A5	1 ml
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 7,4

Anstelle von 1,5 g/l NaNO₃ enthält BG-11* nur 0,17 g/l NaNO₃ und zusätzlich 0,85 g/l NaHCO₃. Das BG-11^{Hepes, Strp} Medium für die Kultivierung des Reporterstamms APL, der die Resistenz gegen Streptomycin besaß, wurde mit 2 mM HEPES (pH = 7,2) gepuffert und mit 25 mg/l Streptomycin versetzt. Die Bruchzahl vor BG-11 steht für die PO₄⁻³-Konzentration bezogen auf die in BG-11. Zum Beispiel beträgt die PO₄⁻³-Konzentration von 1/5-BG-11 (48 μM) 1/5 von der in BG-11 (240 μM). In BG-11_(-P), PO₄⁻³-freiem Medium, wurde K₂HPO₄ durch äquivalentes KCl ersetzt. Die Standardreihe zur Kalibrierung des CyanoSensors wurde mittels BG-11_(-P) mit unterschiedlichem PO₄⁻³-Zusatz von 0 μM bis 240 μM hergestellt.

Spurenelementenlösung A5 (Rippka 1988)

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,222 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,39 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	79 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	49,4 mg
ddH ₂ O	ad 1 000 ml

MA (Watanabe et al. 2000)

Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	50 mg
KNO ₃	0,1 g
NaNO ₃	50 g
Na ₂ SO ₄	40 mg
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	50 mg
β-Na ₂ Glycerophosphat · 5 H ₂ O	0,1 g
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 mg
H ₃ BO ₃	20 mg
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,5 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	5 mg
ZnCl ₂	0,5 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	5 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,8 mg
Bicin	0,5 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 8,6

CB (Watanabe et al. 2000)

Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0,15 g
KNO ₃	0,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	40 mg
β-Na ₂ Glycerophosphat · 5 H ₂ O	50 mg
Vitamin B ₁₂	0,1 µg
Biotin	0,1 µg
Thiamin HCl	10 µg
PIV-Metall-Lösung	3 ml
Bicin	0,5 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 9,0

CT (Watanabe et al. 2000)

Statt 0,5 g Bicin enthält CT Medium 0,4 g TAPS und hat einen pH-Wert von 8,2.
Die restliche Zusammensetzung ist gleich wie die vom CB Medium.

PIV-Metall-Lösung (Watanabe et al. 2000)

FeCl ₃ · 6 H ₂ O	19,6 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	3,6 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,2 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,4 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25 mg
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	100 mg
ddH ₂ O	ad 100 ml

20× SSC

NaCl	175,3 g
Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O	88,2 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 7,0

20× TE

Tris	24,24 g
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5,84 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 7,4

1× TE

1× TE wird durch Verdünnung von 20× TE mit ddH₂O und gegebenenfalls Einstellung der gewünschten pH-Werte zubereitet.

1× Tris-Puffer

Tris-HCl	1,576 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 8,5

Reinigungslösung zur Reinigung der Objektträger (Eisen und Brown 1999)

NaOH	70,0 g
ddH ₂ O	280 ml
Ethanol (95 %)	420 ml

Die Lösung muß klar sein.

Poly-L-Lysin-Lösung

Poly-L-Lysin (0,1 % w/v)	70,0 ml
PBS	70 ml
ddH ₂ O	560 ml

Zum Abmessen von Poly-L-Lysin und Ansetzen dieser Lösung werden ausschließlich Meßzylinder und Becherglas aus Kunststoff verwendet.

PBS-Puffer

NaCl	8,0 g
KCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,8 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 7,2

Blokierungslösung (Eisen und Brown 1999)

Bernsteinsäure Anhydrat	9 g
1-Methyl-2-pyrrolidinon	335 ml
Natriumborat (1 M, pH 8,0)	15 ml

Diese Lösung wird vor Gebrauch frisch angesetzt.

Substratlösung für bakterielle Luziferase

0,1 % (v/v) n-Nonanal in DMSO	1 ml
0,1 % (w/v) Igepal in ddH ₂ O	1 ml
ddH ₂ O	6 ml

Diese Lösung wird täglich frisch angesetzt.

10× TBE

Tris	108 g
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	7,45 g
H ₃ BO ₃	55 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 8,0

50× TAE

Tris	242 g
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	18,612 g
Eisessig	57,1 g
ddH ₂ O	ad 1 000 ml
	pH 8,0

1× TAE für Agarose-Gelelektrophorese

1× TAE wird durch Verdünnung von 50× TAE mit ddH₂O zubereitet.

Auftragspuffer für Agarose-Gelelektrophorese

Glycerin (wasserfrei)	30 g
Bromphenolblau	0,2 g
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0,93 g
ddH ₂ O	ad 100 ml
	pH 7,5

A.2 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxynukleinsäure
E	Einstein = 1 mol Photonen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IGS	intergenic spacer
ITS	internal transcribed spacer
kb	Kilobase = 1000 bp
<i>lux</i>	Gen der Luziferase aus Leuchtbakterien
<i>mcy</i>	Gen der Microcystin-Synthetase
<i>mcyA(NMT)</i>	N-Methyltransferase-Domäne in <i>mcyA</i>
<i>mcyB-mcyC</i>	Fragment zwischen <i>mcyB</i> und <i>mcyC</i>
NaOAc	Natriumacetat
NIES	National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan
NRPS	nichtribosomale Polypeptid-Synthetase
OD ₇₂₀	optische Dichte bei 720 nm
PCC	Pasteur Culture Collection, Paris, Frankreich
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKS	Polyketid-Synthase
PNA	Peptidnukleinsäure
<i>phoA</i>	Gen der alkalische Phosphatase
<i>PphoA</i>	Promotor von <i>phoA</i>
rDNA	Gen der rRNA
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RAPD	random amplified polymorphic DNA
REP	repetitive extragenetic palindromic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RLU	relative Lichteinheit
RT	Zimmertemperatur
SDS	sodium dodecylsulphate (Natriumdodecylsulphat)
SSC	salt sodium citrate (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
ssDNA	einzelsträngige Desoxynukleinsäure
Strp ^r	Resistenz gegen Streptomycin
<i>T_d</i>	Dissoziationstemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAPS	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymaktivitätseinheit (unit)

A.3 Aufbau der Beleuchtungseinrichtung

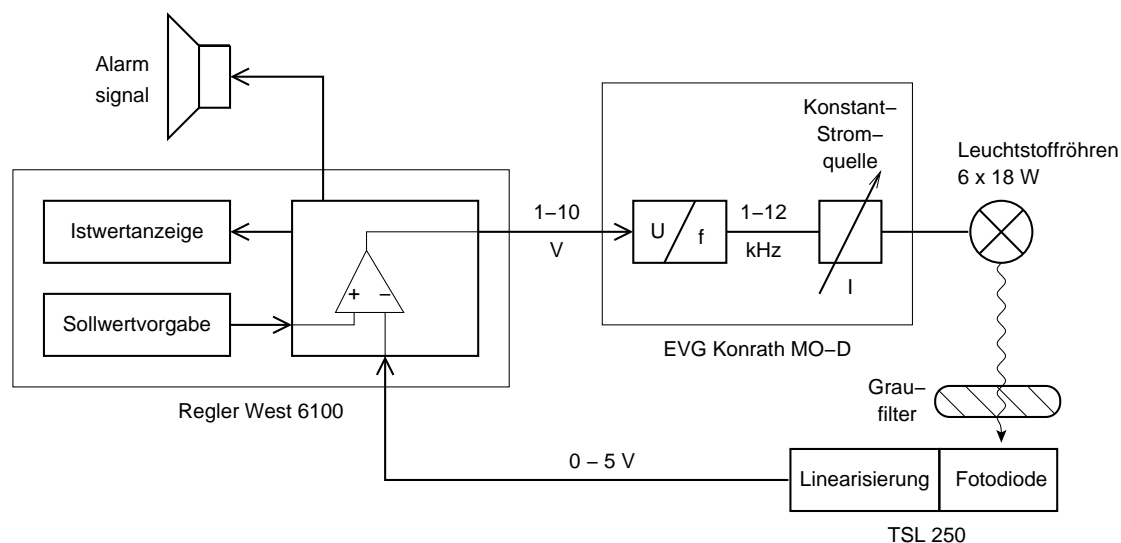


Abb. .1: Blockschaltbild der geregelten Beleuchtungseinrichtung. Lichtquelle: sechs Leuchtstoffröhren von OSRAM, hellweiß, 18 W. Elektronisches Vorschaltgerät, dimmbar, MO-D von KONRATH SONDERLEUCHTE, Dortmund. Regler: West 6100 Mini-Industrieregler von WEST INSTRUMENTS, Wölfersheim, Deutschland. Lichtsensor: Licht-/Spannungswandler TSL250, (3–9) VDC. Zur Anpassung an die Empfindlichkeit des Lichtsensors wurden jeweils passende Graufilter von COKIN[®], Frankreich eingesetzt: Grey ND 2 × (A152) und Grey ND 4 × (A153).

B Literaturverzeichnis

- Aiba, H., M. Nagaya und T. Mizuno (1993). *Sensor and regulator proteins from the cyanobacterium Synechococcus species PCC 7942 that belong to the bacterial signal-transduction protein families: implication in the adaptive response to phosphate limitation*. Mol. Microbiol., 8:81–91.
- Allen, M. M. (1984). *Cyanobacterial cell inclusions*. Annu. Rev. Microbiol., 38:1–25.
- Amann, R. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev., 59:143–169.
- Armstrong, R. A. (1999). *An optimization-based model of iron-light-ammonium co-limitation of nitrate uptake and phytoplankton growth*. Limnol. Oceanogr., 44:1436–1446.
- Batterton, J. C. und C. van Baalen (1968). *Phosphorus deficiency and phosphate uptake in the blue-green alga Anacystis nidulans*. Can. J. Microbiol., 14:341–348.
- Beasley, V. R., W. O. Cook, A. M. Dahlem, S. B. Hooser, R. A. Lovell und W. M. Valentine (1989). *Intoxication in livestock and water fowl*. Food. Anim. Pract., 5:345–361.
- Behr, T., C. Koob, M. Schedl, A. Mehlen, H. Meier, D. Knopp, E. Frahm, U. Obst, K.-H. Schleifer, R. Niessner und W. Ludwig (2000). *A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of Enterococci by reverse hybridization*. System. Appl. Microbiol., 23:563–572.
- Belkin, S. (2000). Persönliche Mitteilung. The Hebrew University of Jerusalem, Israel.
- Belkin, S., D. R. Smulski, A. C. Vollmer, T. K. van Dyk und R. A. LaRossa (1996). *Oxidative stress detection with Escherichia coli harboring a katG':lux fusion*. Appl. Environ. Microbiol., 62:2252–2256.
- Billinton, N., M. G. Barker, C. E. Knight, A. W. Goddard, N. J. Fielden und P. R. Walmsley (1998). *Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity biosensor*. Biosens. Bioelectron., 13:831–838.
- Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy und H. F. Noller (1978). *Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4801–4805.

- Cai, Y. und P. Wolk (1990). *Use of a conditionally lethal gene in Anabaena sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences.* J. Bacteriol., 172:3138–3145.
- Carmichael, W. W. (1992). *Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins.* J. Appl. Bacteriol., 72:445–459.
- Carmichael, W. W. (1994). *The toxin of cyanobacteria.* Sci. Am., 270:64–72.
- Chorus, I. und L. Mur (1999). *Preventative measures.* In: I. Chorus und J. Bartram, Hrsg.: *Toxic Cyanobacteria in Water, a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London und New York.
- Clayton, R. A., G. Sutton, P. S. Hinkle Jr., C. Bult und C. Fields (1995). *Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa.* Int. J. Syst. Bacteriol., 45:595–599.
- Cohen, M. F., J. G. Wallis, E. L. Campbell und J. C. Meeks (1994). *Transposon mutagenesis of Nostoc sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives.* Microbiology, 140:3233–3240.
- Collier, J. L. und A. R. Grossman (1992). *Chlorosis induced by nutrient deprivation in Synechococcus sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same.* J. Bacteriol., 174:4718–4726.
- Collier, J. L. und A. R. Grossman (1994). *A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria.* EMBO J., 13:1039–1047.
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer und M. Wagner (1999). *The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set.* System. Appl. Microbiol., 22:434–444.
- Dillon, P. L. und F. H. Rigler (1975). *A simple method for predicting the capacity of a lake for development based on lake trophic status.* J. Fish. Res. Board. Can., 32:1519–1531.
- Dittmann, E., K. Meißner und T. Börner (1996). *Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa.* Phycologia, 35 (Suppl.):62–67.
- Dittmann, E., B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Döhren und T. Börner (1997). *Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806.* Mol. Microbiol., 26:779–787.
- Eikenberg, A. (2000). *Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern zur Detektion von Microcystin.* Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Eisen, M. B. und P. O. Brown (1999). *DNA arrays for analysis of gene expression.* Methods Enzymol., 303:179–205.

- Elser, J. J., E. R. Marzolf und C. R. Goldman (1990). *Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47:1468–1477.
- Erbe, J. L., A. C. Adams, K. B. Taylor und L. M. Hall (1996). *Cyanobacteria carrying an smt-lux transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations*. J. Ind. Microbiol., 17:80–83.
- Eriksson, J. E., D. Toivola, J. A. O. Meriluoto, H. Karaki, Y.-G. Han und D. Hartshorne (1990). *Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 173:1347–1353.
- Ezaki, S. (2001). Persönliche Mitteilung. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.
- Falconer, E. R. und D. S. K. Yeung (1992). *Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins*. Chem.-Biol. Interact., 81:181–196.
- Falconer, I. R. (1993). *Algaltoxins in seafood and drinking water*. Academic Press, London.
- Falkowski, P. G. und J. A. Raven (1997). *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford.
- Ferris, M. J., G. Muyzer und D. M. Ward (1996). *Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community*. Appl. Environ. Microbiol., 63:340–346.
- Ford, C. Z., G. S. Sayler und R. S. Burlange (1999). *Containment of a genetically engineered microorganism during a field bioremediation application*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:397–400.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey und P. Jurtschuk Jr. (1992). *How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity*. Int. J. Syst. Bacteriol., 42:166–170.
- Francis, G. (1878). *Poisonous Australian lake*. Nature, 18:11–12.
- Fuchs, B.M., F. Glockner, J. Wulf und R. Amann (2000). *Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes*. Appl. Environ. Microbiol., 66:3603–3607.
- Ganf, G. G. und R. L. Oliver (1982). *Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of algae by blue-green algae in the plankton of a stratified lake*. J. Ecol., 70:829–844.
- Geitler, L. (1932). *Cyanophyceae*. In: L. Rabenhorst, Hrsg.: *Doktor L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich and der Schweiz*, Bd. 14. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Gil, G. C., R. J. Mitchell, S. T. Chang und M. B. Gu (2000). *A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium*. Biosens. Bioelectron., 15:23–30.

- Gillor, O. (1999). Persönliche Mitteilung. The Hebrew University, Jerusalem.
- Gillor, O., A. Post und S. Belkin (2001). *Phosphorus bioavailability monitoring by a bioluminescent cyanobacterial sensor strain*. eingereicht.
- Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, T. M. Schmidt und N. R. Pace (1990). *Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton*. Appl. Environ. Microbiol., 56:2572–2575.
- Giovannoni, S. J., S. Turner, G. J. Olsen, S. Barns, D. J. Lane und N. R. Pace (1988). *Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts*. J. Bacteriol., 170:3584–3592.
- Golden, S. S. (1995). *Light-Responsive gene expression in cyanobacteria*. J. Bacteriol., 177:1651–1654.
- Golden, S. S. (1997). *Neutral site vectors for Synechococcus sp. strain PCC 7942*. <http://ACS.TAMU.EDU/~ssg7231/1301.html>.
- Golden, S. S., J. Brusslan und R. Haselkorn (1987). *Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome*. Methods Enzymol., 153:215–231.
- Golden, S. S., C. H. Johnson und T. Kondo (1998). *The cyanobacterial circadian system: a clock apart*. Curr. Opin. Microbiol., 1:669–673.
- Gorham, P. R. und W. W. Carmichael (1988). *Hazards of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria)*. In: C. A. Lembi und J. Waaland, Hrsg.: *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Gould, S. J. und S. Subramani (1988). *Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology*. Anal. Biochem., 175:5–13.
- Grillo, J. F. und J. Gibson (1979). *Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium Synechococcus*. J. Bacteriol., 140:508–517.
- Gürtler, V. und V. A. Stanisich (1996). *New approach to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region*. Microbiology, 142:3–16.
- Harris, G. P. (1986). *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*. Chapman and Hall, London.
- Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance und P. H. Vogt (1997). *Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step Protocol*. BioTechniques, 23:504–511.
- Hirschberg, J. und D. Chamovitz (1994). *Carotenoids in cyanobacteria*. In: D. A. Bryant, Hrsg.: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Holzman, T. F. und T. O. Baldwin (1983). *Reversible inhibition of the bacterial luciferase catalyzed bioluminescence reaction by aldehyde substrate: Kinetic mechanism and ligand effects*. Biochemistry, 22:2838–2846.

- Honkanen, R. E., J. Zwiller, R. E. Moore, S. L. Daily, B. S. Khatra, M. Dukelow und A. L. Boynton (1990). *Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases*. J. Biol. Chem., 256:19401–19404.
- Horne, A. J. und M. L. Commins (1987). *Macronutrient controls on nitrogen fixation in planktonic cyanobacterial populations*. N. Z. J. Mar. Freshwater Res., 21:413–423.
- Houmard, J. (1995). *How do cyanobacteria perceive and adjust to their environment?*. In: I. Joint, Hrsg.: *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*, Bd. G 38 d. Reihe NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel und N. R. Pace (1998). *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*. J. Bacteriol., 180:4765–4774.
- Hummert, C. (2000). *Algentoxine und LC-MS: Die Möglichkeiten und Grenzen auf dem Weg zum „universellen Bestimmungsverfahren“*. Vortrag auf dem Deutschen Lebensmittelchemikertag, Universität Hohenheim.
- Ihlenfeldt, M. J. A. und J. Gibson (1975). *Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in Anacystis nidulans (Synechococcus)*. Arch. Microbiol., 102:23–28.
- Iteman, I., R. Rippka, N. T. de Marsac und M. Herdman (2000). *Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA – 23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria*. Microbiology, 146:1275–1286.
- Jackman, D. M. und M. E. Mulligan (1995). *Characterization of a nitrogen-fixation (nif) gene cluster from Anabaena azollae 1a shows that closely related cyanobacteria have highly variable but structured intergenic regions*. Microbiology, 141:2235–2244.
- Jensen, J. P., E. Jeppesen, K. Olrik und P. Kristensen (1994). *Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 51:1692–1699.
- Jochimsen, E. M., W. W. Carmichael, J. S. An, D. Cardo, S. T. Cookson, C. E. M. Holmes, M. B. D. Antunes, D. A. Demelo, T. M. Lyra, V. S. T. Barreto, S. M. F. O. Azevedo und W. R. Jarvis (1998). *Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil*. N. Engl. J. Med., 338:873–878.
- Johnson, C. H. und S. S. Golden (1999). *Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism*. Annu. Rev. Microbiol., 53:389–409.
- Joset, F. (1988). *Transformation in Synechocystis PCC 6714 and 6803: Preparation of Chromosomal DNA*. Methods Enzymol., 167:712–714.
- Kaebnick, M., B. A. Neilan, T. Börner und E. Dittmann (2000). *Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster*. Appl. Environ. Microbiol., 66:3387–3392.
- Kentemnich, T., G. Haverkamp und H. Bothe (1990). *Die Gewinnung von molekularem Wasserstoff durch Cyanobakterien*. Naturwissenschaften, 77:12–18.
- Klapper, H. (1992). *Eutrophierung und Gewässerschutz*. Gustav Fischer Verlag, Jena.

- Kleinkauf, H. und H. von Döhren (1996). *A nonribosomal system of peptide biosynthesis*. Eur. J. Biochem., 236:335–351.
- Köhler, S. (2000). *Biochemische Nachweisverfahren auf der Basis genetischer Regulationselemente: vom Reporterassay zum Repressor/DNA-Bindungstest*. Doktorarbeit, Universität Stuttgart. <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2001/752>.
- Köhler, S., S. Belkin und R. D. Schmid (2000). *Reporter gene bioassays in environmental analysis*. Fresenius. J. Anal. Chem, 366:769–779.
- Komárek, J. und K. Anagnostidis (1989). *Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 - Nostocales*. Arch. Hydrobiol., 82 (Suppl.):247–345.
- Kondo, R., T. Yoshida, Y. Yuki und S. Hiroishi (2000). *DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, Microcystis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50:767–770.
- Kramer, J. G., M. Wyman, J. P. Zehr und D. G. Capone (1996). *Diel variability in transcription of the structural gene for glutamine synthetase (glnA) in natural populations of the marine diazotrophic cyanobacterium Trichodesmium thiebautii*. FEMS Microbiol. Ecol., 21:187–196.
- Kromkamp, J. (1987). *Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria*. N. Z. J. Mar. Freshwater Res., 21:457–65.
- Kromkamp, J., A. van den Heuvel und L. R. Mur (1989). *Phosphorus uptake and photosynthesis by phosphate-limited cultures of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. Br. Phycol. J., 24:347–355.
- Lane, D. J. (1991). *16S/23S rRNA sequencing*. In: E. Stackebrandt und M. Goodfellow, Hrsg.: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Leff, L. G., J. R. Dana, J. V. McArthur und L. J. Shimkets (1995). *Comparison of methods of DNA extraction from stream sediment*. Appl. Environ. Microbiol., 61:1141–1143.
- Lewis, W. M. (1978). *Dynamics and succession of the phytoplankton in a tropical lake: Lake Lanao, Philippines*. J. Ecol., 66:849–880.
- Lu, W., H. Evans, S. . McColl und V. A. Saunders (1997). *Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region*. FEMS Microbiol. Lett., 153:141–149.
- Ludwig, W., R. Amann, E. Martinez-Romero, W. Schönhuber, S. Bauer, A. Neef und K.-H. Schleifer (1998). *rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria*. Plant and Soil, 204:1–19.
- Ludwig, W. und K.-H. Schleifer (1994). *Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis*. FEMS Microbiol. Rev., 15:155–173.
- Ludwig, W. und O. Strunk (1996). *ARB: A software environment for sequence data*. <http://arb-home.de>.

- Lukac, M. und R. Aegerter (1993). *Influence of trace metals on growth and toxin production of Microcystis aeruginosa*. Toxicon, 31:293–305.
- Lyra, C., J. Hantula, E. Vainio, J. Rapala, L. Rouhiainen und K. Sivonen (1997). *Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene*. Arch. Microbiol., 167:176–184.
- Lyra, C., S. Suomalainen, M. Gugger, C. Vezie, P. Sundman, L. Paulin und K. Sivonen (2001). *Molecular characterization of planktic cyanobacteria of Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis and Planktothrix genera*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51:513–526.
- MacKintosh, C., K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen und G. A. Codd (1990). *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*. FEBS Lett., 264:187–192.
- MacKintosh, R. W., K. N. Dalby, D. C. Campbell, P. T. Cohen, P. Cohen und C. MacKintosh (1995). *The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1*. FEBS Lett., 371:236–240.
- Mahasneh, I. A., A. Kumar und D. N. Tiwari (1993). *The switch-on time of the phosphomonoesterase activity in relation to cellular phosphorus in six strains of blue-green algae (Cyanobacteria)*. Phycologia, 32:180–183.
- Mak, Y. M. und K. K. Ho (1991). *An improved method for the isolation of chromosomal DNA from various bacteria and cyanobacteria*. Nucleic Acids Res., 20:4101–4102.
- Maneewannakul, S., K. Maneewannakul und K. Ippen-Ihler (1994). *The pKSM710 vector cassette provides tightly regulated lac and T7lac promoters and strategies for manipulating N-terminal protein sequences*. Plasmid, 31:300–307.
- Mann, N. H. (1995). *How do cells express nutrient limitation at the molecular levels?*. In: I. Joint, Hrsg.: *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*, Bd. G 38 d. Reihe NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner und K.-H. Schleifer (1992). *Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and Solutions*. System. Appl. Microbiol., 15:593–600.
- Marahiel, M. A., T. Stachelhaus und H. D. Mootz (1997). *Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis*. Chem. Rev., 97:2651–2673.
- Meighen, E. A. und P. V. Dunlap (1993). *Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence*. Adv. Microb. Physiol., 34:1–67.
- Meißner, K., E. Dittmann und T. Börner (1996). *Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa contain sequences homologous to peptide synthetase genes*. FEMS Microbiol. Lett., 135:295–303.
- Moffitt, M. C., S. I. Blackburn und B. A. Neilan (2001). *rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus Nodularia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51:505–512.

- Molecular Dynamics (1999). *Application Note 62: Fluorescent DNA Labeling by PCR*. Molecular Dynamics and Amersham Pharmacia Biotech. http://www.mdyn.com/app_notes/appnotes/AN62/an62.pdf.
- Moore, R. E., J. L. Chen, B. S. Moore und G. M. Patterson (1991). *Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the Adda and Masp units*. J. Amer. Chem. Soc., 113:5083–5084.
- Nagaya, M., H. Aiba und T. Mizuno (1994). *The sphR product, a two-component system response regulator protein, regulates phosphate assimilation in Synechococcus sp. strain PCC 7942 by binding to two sites upstream from the phoA promoter*. J. Bacteriol., 176:2210–2215.
- Namikoschi, M. und K. L. Rinehart (1996). *Bioactive compounds produced by cyanobacteria*. J. Ind. Microbiol., 17:373–384.
- Neilan, B. A., E. Dittmann, L. Rouhiainen, R. A. Bass, V. Schaub, K. Sivonen und T. Börner (1999). *Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria*. J. Bacteriol., 181:4089–4097.
- Neilan, B. A., D. Jacobs, T. del Dot, L. L. Blackall, P. R. Hawkins, P. T. Cox, und A. E. Goodman (1997). *rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 47:693–697.
- Neilan, B. A., D. Jacobs und A. E. Goodman (1995). *Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus*. Appl. Environ. Microbiol., 61:3875–3883.
- Niemeyer, C. M. und D. Blohm (1999). *DNA-Mikroarrays*. Angew. Chem., 111:3039–3043.
- Nishihara, H., H. Miwa, M. Watanabe, M. Nagashima, O. Yagi und Y. Takamura (1997). *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discrimination genotypes of Microcystis cyanobacteria*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 61:1067–1072.
- Nishiwaki-Matsushima, R., T. Ohta, S. Nishiwaki, M. Sukanuma, K. Kohyama, T. Ishikawa, W. W. Carmichael und H. Fujiki (1992). *Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR*. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 118:420–424.
- Nishizawa, T., M. Asayama, K. Fujii, K.-i. Harada und M. Shirai (1999). *Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in Microcystis spp.* J. Biochem., 126:520–529.
- Nishizawa, T., A. Ueda, M. Asayama, K. Fujii, K.-i. Harada, K. Ochi und M. Shirai (2000). *Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin*. J. Biochem., 127:779–789.
- Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig und H. Backhaus (1996). *Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis*. J. Bacteriol., 178:5636–5643.

- Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato und H. Shinagawa (1985). *Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens*. *Mutat. Res.*, 147:219–229.
- Oliver, R. L. und G. G. Ganf (2000). *Freshwater blooms*. In: B. A. Whitton und M. Potts, Hrsg.: *The Ecology of Cyanobacteria, their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, S. Matsumoto und M. M. Watanabe (2000). *Morphological variability of colonies of Microcystis morphospecies in culture*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46:39–50.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto und M. M. Watanabe (1998). *16S rDNA sequences and phylogenetic analysis of Microcystis strains with and without phycoerythrin*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164:119–124.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto und M. M. Watanabe (1999). *Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus Microcystis based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 172:15–21.
- Otsuka, S., S. Suda, S. Shibata, H. Oyaizu, S. Matsumoto und M. M. Watanabe (2001). *A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus Microcystis Kützinger ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:873–879.
- Pace, N. R. (1996). *New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology*. *ASM News*, 62:463–470.
- Pace, N. R. (1997). *A molecular view of microbial diversity and the biosphere*. *Science*, 276:734–740.
- Padhy, R. N. (1985). *Cyanobacteria employed as fertilizers and waste disposers*. *Nature*, 317:475–476.
- Paerl, H. W. (1996). *A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments*. *Phycologia*, 35 (Suppl.):25–35.
- Palenik, B. (1994). *Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:3212–3219.
- Palinska, K. A., W. Liesack, E. Rhiel und W. E. Krumbein (1996). *Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates*. *Arch. Microbiol.*, 166:224–233.
- Petri, R. (2000). *Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur Phylogenie der respiratorischen Nitratreduktase*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel. http://e-diss.uni-kiel.de/diss_351/.
- Petri, R. (2001). *DNA-Extraktion mit QIAamp-Kit: Modifikation 1*. Persönliche Mitteilung. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.

- Pick, F. R. und D. R. S. Lean (1987). *The role of macronutrients (C, N, P) in controlling cyanobacterial dominance in temperate lakes*. N. Z. J. Mar. Freshwater Res., 21:425–434.
- Polyak, B., E. Bassis, A. Novodvoretz, S. Belkin und R. S. Marks (2001). *Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxins: system optimization*. Sens. Actuators B, 74:18–26.
- Porter, R. D. (1986). *Transformation in cyanobacteria*. CRC Crit. Rev. Microbiol., 13:111–132.
- Ptitsyn, L. R., G. Horneck, O. Komova, S. Kozubek, E. A. Krasavin, M. Bonev und P. Rettberg (1997). *A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant Escherichia coli cells*. Appl. Environ. Microbiol., 63:4377–4384.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'Ari und M. Hofnung (1982). *SOS chromotest: a direct assay of induction of SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:5971–5975.
- Ray, J. M., D. Bhaya, M. A. Block und A. R. Grossmann (1991). *Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of Synechococcus sp. strain PCC 7942*. J. Bacteriol., 173:4297–4309.
- Redfield, A. C. (1958). *The biological control of the chemical factors in the environment*. Am. Sci., 46:205–221.
- Reith, M. E., D. E. Laudenbach und N. A. Straus (1986). *Isolation and nucleotide sequence analysis of the ferredoxin I gene from the cyanobacterium Anacystis nidulans R2*. J. Bacteriol., 168:1319–1324.
- Reynolds, C. S. (1992). *Eutrophication and the management of planktonic algae: what Vollenweider couldn't tell us*. In: D. W. Sutcliffe und J. G. Jones, Hrsg.: *Eutrophication: Research and Application to Water Supply*. Freshwater Biological Association, Ambleside, England.
- Reynolds, K. A. (1998). *Combinatorial biosynthesis: Lesson learned from nature*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:12744–12746.
- Riegman, R. und L. C. Mur (1984). *Regulation of phosphate uptake kinetics in Oscillatoria agardhii*. Arch. Microbiol., 139:28–32.
- Riegmann, R., M. Rutgers und L. R. Mur (1985). *Effects of photoperiodicity and light irradiance on phosphate-limited Oscillatoria agardhii in chemostat cultures*. Arch. Microbiol., 142:66–71.
- Rippka, R. (1988). *Isolation and purification of cyanobacteria*. Methods Enzymol., 167:3–27.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman und R. Y. Stanier (1979). *Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. J. Gen. Microbiol., 111:1–61.

- Rudi, K., O. M. Skulberg, F. Larsen und K. S. Jakobsen (1997). *Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8*. Appl. Environ. Microbiol., 63:2593–2599.
- Rudi, K., O. M. Skulberg, R. Skulberg und K. S. Jakobsen (2000). *Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization*. Appl. Environ. Microbiol., 66:4004–4011.
- Runnegar, M. T., S. Kong und N. Berndt (1993). *Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins*. Am. J. Physiol., 93:G224–G230.
- Sakamoto, M (1966). *Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence upon lake depth*. Arch. Hydrobiol., 62:1–28.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (2000). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schedl, M., T. Behr, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, R. Niessner und D. Knopp (2000). *Optimization of reverse hybridization in microplates coated with rRNA targeted oligonucleotide probes*. System. Appl. Microbiol., 23:573–581.
- Scheffer, M., S. Rinaldi, A. Gragnani, L. R. Mur und E. H. van Nes (1997). *On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes*. Ecology, 78:272–282.
- Schönhuber, W., B. Zarda, S. Eix, P. Rippka, M. Herdman, W. Ludwig und R. Amann (1999). *In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes*. Appl. Environ. Microbiol., 65:1259–1267.
- Scholin, C. A. und D. M. Anderson (1996). *LSU rDNA-based RFLP assays for discriminating species and strains of Alexandrium (Dinophyceae)*. J. Phycol., 32:1022–1035.
- Scholin, C. A., K. R. Buck, T. Britschgi, G. Cangelosi und F. P. Chavez (1996). *Identification of Pseudo-nitzschia australis (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats*. Phycologia, 35:190–197.
- Schopf, W. und B. Packer (1987). *Early archean (3.3 billion – 3.5 billion-year old) microfossils from Warrawoona group, Australia*. Science, 237:70–72.
- Schreiter, P. P.-Y. (2000). *A bioluminescent Fe-reporterstrain of Synechocystis PCC 6803 harbouring ho1::luxAB in genom*. Unveröffentlichte Daten.
- Selifonova, O., R. Burlage und T. Barkay (1993). *Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment*. Appl. Environ. Microbiol., 59:3083–3090.
- Sharfstein, S. T., S. J. van Dien und J. D. Keasling (1996). *Modulation of the phosphate-starvation response in Escherichia coli by genetic manipulation of the polyphosphate pathways*. Biotech. Bioeng., 51:434–438.

- Sicko-Goad, L. und T. E. Jensen (1976). *Phosphate metabolism in blue-green algae. II. Changes in phosphate distribution during starvation and the „polyphosphate overplus“ phenomenon in Plectonema boryanum.* Amer. J. Bot., 63:183–188.
- Simonis, W. und W. Urbach (1973). *Photophosphorylation in vivo.* Ann. Rev. Plant Physiol., 24:89–114.
- Singer, R. A. und W. F. Doolittle (1975). *Control of gene expression in blue-green algae.* Nature, 253:650–651.
- Sivonen, K. und G. Jones (1999). *Cyanobacterial toxins.* In: I. Chorus und J. Bartram, Hrsg.: *Toxic Cyanobacteria in Water, a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London und New York.
- Smith, V. H. (1982). *The nitrogen and phosphorus dependence of algal biomass in lakes: An empirical and theoretical analysis.* Limnol. Oceanogr., 27:1101–1112.
- Smith, V. H. (1983). *Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by bluegreen algae in lake phytoplankton.* Science, 221:669–671.
- Southern, E. M., S. C. Case-Green, J. Elder, M. Johnson, K. Mir, L. Wang und J. Williams (1994). *Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids.* Nucleic Acids Res., 22:1368–1373.
- Stabel, H.-H. und J. Kleiner (1995). *Folgen der Phosphatabnahme für die Phytoplanktonentwicklung im Bodensee.* Wasser-Abwasser, 136:601–607.
- Stackebrandt, E. und B. M. Goebel (1994). *Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.* Int. J. Syst. Bacteriol., 44:846–849.
- Stahl, D. A. (1995). *Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology.* Mol. Ecol., 4:535–542.
- Stahl, D. A. und R. Amann (1991). *Development and application of nucleic acid probes.* In: E. Stackbrandt und M. Goodfellow, Hrsg.: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Stal, L. J. (2000). *Cyanobacterial mats and stromatolites.* In: B. A. Whitton und M. Potts, Hrsg.: *The Ecology of Cyanobacteria, their Diversity in Time and Space.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Strelitz, B. (1998). Persönliche Mitteilung. UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.
- Tijssen, P. (1993). *Hybridization with Nucleic Acid Probes. Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation,* Bd. 24 d. Reihe *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Tillett, D., E. Dittmann, M. Erhard, H. von Döhren, T. Börner und B. A. Neilan (2000). *Structural organization of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system.* Chem. Biol., 7:753–764.

- Tillett, D. und B. A. Neilan (2000). *Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria*. J. Phycol., 36:251–258.
- Tillett, D., D. L. Parker und B. A. Neilan (2001). *Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (mcyA) of the cyanobacterial genus Microcystis: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies*. Appl. Environ. Microbiol., 67:2810–2818.
- Trimbee, A. M. und E. E. Prepas (1987). *Evaluation of total phosphorus as a predictor of the relative biomass of blue-green algae with emphasis on Alberta Lakes*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44:1337–1342.
- Turner, S., K. M. Pryer, V. P. W. Miao und J. D. Palmer (1999). *Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis*. J. Eukaryot. Microbiol., 46:327–338.
- Utkilen, H. und N. Gjølme (1992). *Toxin produktion by Microcystis aeruginosa as a function of light in continuous cultures and its ecological significance*. Appl. Environ. Microbiol., 58:1321–1325.
- Utkilen, H. und N. Gjølme (1995). *Iron-stimulated toxin production in Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 61:797–800.
- van Dien, S. J. und J. D. Keasling (1998). *A dynamic model of the Escherichia coli phosphate-starvation response*. J. theor. Biol., 190:37–49.
- van Dien, S. J., S. Keyhani, C. Yang und J. D. Keasling (1997). *Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in Escherichia coli for investigation of phosphate secretion from the cell*. Appl. Environ. Microbiol., 63:1689–1695.
- van Dyk, T. K., T. R. Reed, A. C. Vollmer und R. A. LaRossa (1995). *Synergistic induction of the heat shock response in Escherichia coli by simultaneous treatment with chemical inducers*. J. Bacteriol., 177:6001–6004.
- Vollenweider, R. A. (1968). *Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular references to phosphorus and nitrogen as factors of eutrophication*. EAS/CSI/68 27. OECD Techn. Pre., Paris.
- Wagner, F. und G. Falkner (1992). *Concomitant changes in phosphate uptake and photophosphorylation in the blue-green alga Anacystis nidulans during adaptation to phosphate deficiency*. J. Plant Physiol., 140:163–167.
- Watanabe, M. F. und S. Oishi (1985). *Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (Microcystis aeruginosa) under culture conditions*. Appl. Environ. Microbiol., 49:1342–1344.
- Watanabe, M. M., M. Kawachi, M. Hiroki und F. Kasai (2000). *NIES-Collection. List of Strains: Microalgae and Protozoa*. National Institute for Environmental Studies, Ibarake, Japan, 6 Aufl.
- Weller, M. (2001). Persönliche Mitteilung. Institut für Wasserchemie, Technische Universität München.

- West, N. Y. und D. G. Adams (1997). *Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site*. Appl. Environ. Microbiol., 63:4479–4484.
- Whitton, B. A. und M. Potts (2000). *Introduction to the cyanobacteria*. In: B. A. Whitton und M. Potts, Hrsg.: *The Ecology of Cyanobacteria, their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Wicks, R. J. und P. G. Thiel (1990). *Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of cyanobacterium Microcystis aeruginosa in a hypertrophic African reservoir*. Environ. Sci. Technol., 24:1413–1418.
- Wilmotten, A. (1994). *Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria*. In: D. A. Bryant, Hrsg.: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Yu, S. Z. (1989). *Drinking water and primary liver cancer*. In: Z. U. Tang, W. C. Wu und S. S. Xia, Hrsg.: *Primary Liver Cancer*. Springer-Verlag, Berlin.
- Yu, S. Z. (1995). *Primary prevention of hepatocellular carcinoma*. J. Gastroenterol. Hepatol., 10:674–682.
- Zimmermann, D. und H. Platen (2000). *Experimentation of the reliability of rapid tests in a ring study*. Int. Environ. Tech., 10:13–14.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. D. Schmid für die freundliche Aufnahme im Institut, die Überlassung des Themas und die motivierende Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat. Für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Tagungen möchte ich mich bei ihm auch bedanken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. T. T. Bachmann, dem Arbeitsgruppenleiter der Gruppe Analytischer Biotechnologie, danke ich für seine vielseitigen Gedankenanstöße sowie seine Hilfe beim Verfassen der Publikationen.

Frau Dr. J. Schmitt und Herrn Dr. R. Petri möchte ich ganz herzlich für ihre Diskussionsbereitschaft bei molekularbiologischen und genetischen Fragestellungen danken. Bezüglich der Publikationen haben sie mir ebenfalls viele praktische Hilfe gegeben. Herrn Dr. R. Petri möchte ich besonders für seine hilfreichen Anregungen und Ermutigung danken.

Herrn Dr. W. Ludwig vom Institut für Mikrobiologie, Technische Universität München, danke ich für die freundliche zweitägige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die ausführliche Einführung in die Software ARB.

Herrn Dr. M. Weller und Frau A. Eikenberg vom Institut für Wasserchemie, Technische Universität München, danke ich für die zur Verfügung gestellten Umweltproben samt analytischer Daten.

Frau Dr. H. Distelbarth vom Biologischen Institut, Universität Stuttgart, danke ich für die freundliche Überlassung des beleuchteten Inkubators und den zur Verfügung gestellten Quantum Sensor und den Microvolt Integrator, die zum Eichen der im Rahmen dieser Arbeit konzipierten Beleuchtungseinrichtung benötigt wurden.

Gewerkmeister Herrn R. Schneider und Elektriker Herrn G. Dieterle danke ich für die Anfertigung der von mir im Rahmen dieser Arbeit konzipierten Beleuchtungseinrichtung.

Mein Dank richtet sich weiterhin an das AquaSense-Projekt im Rahmen des EU Research and Technological Development Programme „Environment and Climate“ (ENV4-CT97-0493) für die finanzielle Unterstützung dieser Forschungsarbeit und an die Projektpartner Herrn Prof. S. Belkin und Frau O. Gillor, The Hebrew University of Jerusalem, Frau Dr. A.-L. Etienne und Frau Dr. C. Richaud, Laboratoire de Photorégulation et Dynamique des Membranes Végétales, CNRS, Paris, sowie Herrn Dr. A. Post, The Interuniversity Institute for Marine Science, Eilat, für die gute Zusammenarbeit. Frau O. Gillor danke ich auch für die Überlassung des Reporterstamms APL.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Anregungen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle noch vielen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biosensor sowie des Instituts danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, denen eine berufliche Ausbildung nach meinen Vorstellungen stets ein großes Anliegen war, Roger, der meine Arbeit geduldig mittrug und mich auf vielfältige Weise unterstützte, sowie allen Freunden, die zu allen Zeiten in ihren Gebeten an mich und meine Arbeit dachten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln und den Ratschlägen der jeweils namentlich aufgeführten Personen, selbständig verfaßt habe.

Besigheim, den 1. Februar 2002

Lebenslauf

persönliche Daten:

Name: Pat Pei-Yeh Schreiter (geb. Lee)
geboren: am 30.12.1966 in Taipeh, Taiwan, Republik China
Familienstand: verheiratet seit 06.09.1996 mit Roger Schreiter
Staatsangehörigkeit: seit 12. Feb. 2001 deutsch

Ausbildung:

Sept. 1973 – Juli 1979 Grundschule in Taipeh
Sept. 1979 – Juni 1982 Mittelschule in Taipeh
Juli 1982 Bestehen der Aufnahmeprüfung für Oberschulen
Sept. 1982 – Juni 1985 Oberschule *Taipei Municipal First Girls' High School*
Juli 1985 Bestehen der Prüfung zur allg. Hochschulreife
Sept. 1985 – Juni 1989 Studium der Chemie an der National Taiwan University in
Taipeh mit Abschluß Bachelor of Science
Okt. 1989 – Sept. 1990 Studium *Deutsch als Fremdsprache* an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Okt. 1990 – März 1993 Studium der Übersetzung Russisch-Deutsch und Chinesisch-
Deutsch an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
Fachbereich Angewandte Sprach- und Kulturwissenschaft in
Germersheim
Apr. 1993 – Okt. 1993 Studium der Chemie an der Universität Stuttgart
Nov. 1993 – Sept. 1996 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Stuttgart
30. März 1994 Bestehen des ersten Prüfungsabschnittes (Vorprüfung) der
Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
24. Juni 1996 Bestehen des zweiten Prüfungsabschnittes (Hauptprüfung
Teil A) der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
(1. Staatsexamen)
Juni 1997 – Aug. 1997 Praktikum am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt
Stuttgart als Voraussetzung für die Hauptprüfung Teil B der
Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker (2. Staatsexamen)
Sept. 1997 Unterbrechung des Praktikums zum Zwecke einer Promotion
Sept. 1997 – Jan. 1998 Mitarbeit als wissenschaftliche Hilfskraft zum Erwerb
molekularbiologischer Arbeitstechniken am Institut für
Technische Biochemie der Universität Stuttgart
Feb. 1998 – Juli 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Anfertigung einer
Dissertation am Institut für Technische Biochemie der
Universität Stuttgart
25. Juli 2001 Erlangen des Titels Diplom-Lebensmittelchemikerin durch das
Nachdiplomierungsverfahren gemäß der „Ordnung der
Universität Hohenheim für die Verleihung des akademischen
Grades des Diplom-Lebensmittelchemiker/Diplom-
Lebensmittelchemikerin“

Publikationen und wissenschaftliche Präsentationen:

Schreiter, P. P.-Y., O. Gillor, A. Post, S. Belkin, R. D. Schmid, T. T. Bachmann (2001). *Monitoring of phosphorus Bioavailability in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain*, Biosens. Bioelectron., 16:811–818.

Schreiter, P. P.-Y., R. Petri, W. Ludwig, M. Weller, R. Nießner, T. T. Bachmann, R. D. Schmid (2002). *Identification of microcystin producers and detection of potentially toxic water samples using nucleotide microarrays*, eingereicht.

Schreiter, P. P.-Y., T. T. Bachmann, O. Gillor, S. Belkin, R. D. Schmid (2000). *Cyanobacterial sensor for detection of phosphate bioavailability*, Poster auf THE 4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOCHEMICAL ENGINEERING, Feb., 2000, Stuttgart.

Schreiter, P. P.-Y., T. T. Bachmann, R. D. Schmid, O. Gillor, S. Belkin, *Monitoring of algal blooms using cyanobacterial reporter assays and DNA-Chips*, Vortrag auf THE SIXTH WORLD CONGRESS ON BIOSENSORS, May, 2000, San Diego.