universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung zur Klassifizierung, Identifizierung und Differenzierung von *Yersinia* Arten

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Sabine Amann
Matrikel-Nummer:	0101103
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Molekulare Biologie
Betreuerin / Betreuer:	Doz. Dipl.-Biol. Dr. Hans-Jürgen Busse

Wien, am 12.10.2007

Zusammenfassung

Eine spezifische und schnelle Identifizierung von *Yersinia pestis*, dem Erreger der Pest, ist für eine entsprechende Behandlung sowie zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung, speziell im Fall eines bioterroristischen Angriffs, unerlässlich. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere PCR-Methoden zur Identifizierung und Differenzierung dieses Bakteriums entwickelt, mit denen auch der Nachweis des atypischen Biovars Pestoides als *Y. pestis* neben den herkömmlichen Biovaren möglich war. Weiters gelang die Entwicklung einer Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Identifizierung von Stämmen der Spezies *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*.

Weiters wurde in der vorliegenden Arbeit das Genus *Yersinia* chemotaxonomisch untersucht, wobei atypischen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen sowie der Spezies *Y. ruckeri* besondere Beachtung galt.
Ergebnisse von biochemischen Untersuchungen, MLST und MLVA legten die Vermutung nahe, dass einige *Y. pseudotuberculosis* Stämme eine neue, mit *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* nah verwandte Spezies darstellen (Dr. Holger Scholz, persönliche Mitteilung). Die Abklärung des taxonomischen Status dieser als *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ bezeichneten Isolate mittels Chinonanalyse und DNA-DNA Hybridisierungen ergab, dass die Isolate eindeutig der Spezies *Y. pseudotuberculosis* zuzuordnen sind. Eine Differenzierung der „pseudopest“ Isolate von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* war nur durch das Lipidprofil, das ein zusätzliches Aminolipid enthielt, möglich.

Der taxonomische Status von *Y. ruckeri*, dem Erreger der Rotmaulseuche, wurde bereits seit seiner anfänglichen Klassifizierung 1978 kontrovers betrachtet (Ewing et al.). Kürzlich konnte durch MLST der 16S rRNA und vier Housekeeping Genen gezeigt werden, dass *Y. ruckeri* phylogenetisch klar von anderen *Yersinia* Spezies abgetrennt werden kann (Kotetishvili et al., 2005). Um festzustellen ob die Platzierung dieser Spezies im Genus *Yersinia* durch chemotaxonomische Charakteristika unterstützt wird, wurden der Typstamm und sechs weitere Isolate von *Y. ruckeri* gemeinsam mit anderen *Yersinia* Spezies der Analyse von Chinonen, polaren Lipiden und Polyaminen unterzogen.

Eine Differenzierung basierend auf dem Chinonsystem, das sich bei allen *Yersinia* Spezies aus der Hauptkomponente Ubichinon Q-8 und geringen Anteilen Q-9 und Menachinon MK-8 zusammensetzte, war nicht möglich. Auch das Profil der polaren Lipide erlaubte keine eindeutige Differenzierung zu denen der anderen *Yersinia* Spezies. Im Gegensatz dazu konnten bei den Polyaminmustern deutliche Unterschiede beobachtet werden. Die *Y. ruckeri* Stämme zeigten ein Polyaminmuster, das sowohl Putrescin als auch Cadaverin als Hauptkomponenten und außerdem relativ hohe Anteile an 1,3-Diaminopropan enthielt. Zusätzlich konnte ausschließlich bei *Y. ruckeri* bei einigen Polyaminen eine dramatische Konzentrationsveränderung im Verlauf des Wachstums beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die phylogenetische separate Position von *Y. ruckeri* und deuten auf eine mögliche Reklassifizierung in ein neues Genus innerhalb der *Enterobacteriaceae* hin.

Abstract

Specific and rapid identification of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague, is essential for appropriate treatment and prevention of further spread, especially in terms of bioterrorism. For this purpose several PCR-systems for identification and differentiation of this bacterium have been developed in this study. These PCR-systems also allowed the detection of atypical strains of biovar Pestoides together with conventional biovars. Furthermore, a multiplex-PCR for simultaneous identification of *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* strains has been developed.

Moreover, the genus *Yersinia* with focus on atypical *Y. pseudotuberculosis* strains as well as on the species *Y. ruckeri* was chemotaxonomically examined in the present study.

Results of biochemical examination, MLST and MLVA suggested that some *Y. pseudotuberculosis* strains might represent a new species which is closely related to *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* (Dr. Holger Scholz, personal notice). Clarification of the taxonomic status of these isolates referred to as *Y. pseudotuberculosis* "pseudopest" based on quinoneanalysis and DNA-DNA hybridization revealed assignment to *Y. pseudotuberculosis*. Polar lipid profile did allow differentiation from *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* by exhibiting an additional aminolipid.

The taxonomic status of *Y. ruckeri,* the causative agent of enteric redmouth disease, has been controversial since its initial classification in 1978 (Ewing et al.). Recently, it has been shown by multilocus sequence typing of 16S rRNA and four housekeeping genes that *Y. ruckeri* clearly separates phylogenetically from other *Yersinia* species (Kotetishvili et al., 2005). In order to examine whether placement of this species in the genus *Yersinia* is supported by chemotaxonomic characteristics, the typestrain and six isolates of *Y. ruckeri* have been subjected to analyses of quinones, polar lipids and polyamines.

The quinone system which consisted of the major compound ubiquinone Q-8 and minor amounts of Q-9 and menaquinone MK-8 in all *Yersinia* species, did not allow differentiation. Also the polar lipid profile did not allow unambiguous differentiation from other *Yersinia* species. In contrast, significant differences could be observed concerning its polyamine patterns. In contrast to reference strains *Y. ruckeri* exhibited a

polyamine pattern with both Putrescine and Cadaverine as major components and significant amounts of 1,3-Diaminopropane. Additionally, concentration of some polyamines did change dramatically during growth which could be detected only in *Y. ruckeri*. These data support the phylogenetically separate position of *Y. ruckeri* and suggest that this species might be reclassified in a novel genus within the *Enterobacteriaceae*.

1 EINLEITUNG 3

1.1 Das Genus *Yersinia* 3

1.2 Enteropathogene *Yersinia* 5

1.3 *Y. pestis* als Krankheitserreger 5

1.4 Die Genetik von *Y. pestis* 8

1.5 Chemotaxonomische Methoden 12

1.5.1 Chinone 12

1.5.2 Polyamine 13

1.5.3 Polare Lipide 14

1.6 Genomisches Fingerprinting 15

1.6.1 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 15

1.6.2 Repetitive Sequenzen 15

1.7 Das Ziel dieser Arbeit 19

2 MATERIAL UND METHODEN 21

2.1 Bakterienstämme 21

2.2 Medien 22

2.3 Puffer und andere Lösungen 24

2.4 Gewinnung von Biomasse 27

2.5 Erstellung einer Wachstumskurve 28

2.6 Physiologische Methoden 28

2.6.1 Temperaturtoleranz 28

2.6.2 Salztoleranz 29

2.7 Chemotaxonomische Methoden 29

2.7.1 Extraktion und Analyse von Chinonen und polaren Lipiden 29

2.7.2 Extraktion und Analyse von Polyaminen 31

2.7.3 Reduzierende SDS-PAGE (Gesamtzellprotein PAGE) 33

2.8 Biochemische Methoden 33

2.8.1 Säurebildung aus Kohlenstoffquellen 33

2.8.2 Hämolysetest 34

2.9 Molekularbiologische Methoden 34
2.9.1 DNA-Isolierung 34
2.9.2 Bestimmung der DNA - Konzentration 36
2.9.3 Genomisches Fingerprinting 37
2.9.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR) 40
2.9.5 Klonierung 41
2.9.6 Präzipitation von DNA 42
2.9.7 Bestimmung des G+C Verhältnis 43
2.9.8 DNA-DNA Hybridisierung 43

3 ERGEBNISSE 49

3.1 Entwicklung von PCR-Methoden zur Identifizierung von *Yersinia* Spezies 49
3.1.1 Entwicklung einer Multiplex-PCR 56

3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung von *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ 58
3.2.1 Chemotaxonomische Untersuchungen 58
3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen 61

3.3 Chemotaxonomische Charakterisierung von *Y. ruckeri* 64
3.3.1 Physiologische und biochemische Untersuchungen 66
3.3.2 Chemotaxonomische Untersuchungen 68

3.4 Mitwirkung an der Beschreibung von *Y. similis* sp. nov. 74

4 DISKUSSION 75

4.1 Identifizierung und Differenzierung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* mittels PCR 75

4.2 Untersuchungen an *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ 79

4.3 Untersuchungen zur chemotaxonomischen Differenzierung von *Y. ruckeri* 82

5 LITERATURVERZEICHNIS 87

1 EINLEITUNG

1.1 Das Genus *Yersinia*

Das Genus *Yersinia* wurde nach dem Bakteriologen Alexandre Yersin benannt, dem es 1894 in Hongkong erstmals gelang den Erreger der Pest zu isolieren (Yersin, 1894). Lehmann und Neumann beschrieben den Erreger 1896 als *Bacterium pestis* (Lehmann and Neumann, 1896), welcher nach mehreren Änderungen der Nomenklatur schließlich als *Yersinia pestis* benannt wurde.

Das Genus *Yersinia* (Van Loghem, 1944) ist ein Mitglied der Familie der *Enterobacteriaceae* und gehört zu den *Gammaproteobacteria*. *Yersinia* sind Gram-negative, 1 bis 3 µm lange Stäbchen, die keine Endosporen bilden, mit einem G+C Gehalt zwischen 46 und 50 mol%. Sie sind aufgrund von peritrich angeordneten Flagellen, die temperaturabhängig bei unter 30°C ausgebildet werden, beweglich. Eine Ausnahme dazu bildet der Typstamm *Y. pestis*, der immer unbeweglich ist. Yersinien sind fakultativ anaerob und besitzen sowohl einen respiratorischen als auch einen fermentativen Metabolismus. In Färbungen nach Gram, Giemsa oder Wayson ist vor allem beim Typstamm eine bipolare Färbung zu beobachten (Bottone et al., 2001). Die Zusammensetzung der Zellwand sowie der Gesamtzell-Lipide entspricht der von anderen *Enterobacteriaceae* (Bottone et al., 2001; Tornabene, 1973). Die Lipopolysaccharide (LPS) zeigen in der Kernregion und im Aufbau des Lipid A ebenfalls keine Unterschiede zu Mitgliedern der *Enterobacteriaceae*. Im Gegensatz zu anderen Spezies der *Yersinia* fehlen *Y. pestis* aber O-spezifische Seitenketten (Bruneteau and Minka, 2003).

Dem Genus *Yersinia* sind zur Zeit zwölf Spezies zugeordnet: *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei* und *Y. ruckeri*. Eine dreizehnte Spezies, *Y. philomiragia*, wurde 1989 als *Francisella philomiragia* ins Genus *Francisella* transferiert (Hollis et al., 1989). Zurzeit befindet sich ein Manuskript zur Beschreibung der neuen Spezies *Y. „similis“* im Begutachtungsprozess, die aufgrund von Unterschieden in der 16S DNA sowie von phänotypischen Merkmalen aus *Y. pseudotuberculosis* ausgegliedert wurde (Sprague et al., eingereicht). Weiters wurden *Y. pseudotuberculosis* Stämme entdeckt, die in MLST (Multilocus Sequence Typing) und

MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis) ähnlicher zu *Y. pestis* als zu *Y. pseudotuberculosis* sind. Diese Stämme wurden deshalb als *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ bezeichnet (Dr. Holger Scholz, persönliche Mitteilung).

Die acht Spezies *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei* und *Y. ruckeri* werden manchmal als *Y. enterocolitica*-ähnliche Bakterien bezeichnet. Stämme dieser Spezies, mit Ausnahme von *Y. ruckeri*, waren ursprünglich alle *Y. enterocolitica* zugeordnet, bis basierend auf biochemischen Eigenschaften bzw. DNA-DNA Hybridisierungen die einzelnen Spezies beschrieben wurden (Sulakvelidze, 2000). *Y. aleksiciae* wurde erst kürzlich aus der Spezies *Y. kristensenii* ausgegliedert (Sprague and Neubauer, 2005).

Durch Vergleich der 16S rDNA Sequenz konnte gezeigt werden, dass das Genus *Yersinia* innerhalb der *Gammaproteobacteria* ein kohärentes Cluster bildet, dessen intragenetische Verwandtschaft durch fünf „Sublines“ charakterisiert ist. *Y. enterocolitica*, *Y. rohdei* sowie *Y. ruckeri* bilden je eine eigene „Subline“, wogegen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. frederiksenii* in einer „Subline“ zusammengefasst sind. Die fünfte „Subline“ wird durch *Y. mollaretii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* und *Y. aldovae* gebildet (Ibrahim et al., 1993). Eine weitere Bestimmung des Verwandtschaftsgrads innerhalb des Genus *Yersinia* erfolgte vor kurzem basierend auf MLST (Multilocus Sequence Typing) von vier verschiedenen, konservierten „Housekeeping“-Genen – *glnA*, *gyrB*, *recA* und *Y-HSP60* – sowie des 16S rRNA Gens (Kotetishvili et al., 2005). Es zeigte sich, dass MLST zur Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von Yersinien besser geeignet ist als die Analyse der 16S rRNA Sequenz, obwohl diese einen guten phylogenetischen Marker zur Differenzierung und Identifizierung darstellt (Olsen and Woese, 1993). Kotetishvili et al. (2005) konnten zwischen den Spezies *Y. aldovae* und *Y. intermedia*, sowie zwischen *Y. bercovieri* und *Y. mollaretii* eine enge Verwandtschaft feststellen, wohingegen *Y. ruckeri* eine große genetische Distanz zu den anderen *Yersinia* Spezies zeigte. Die Stellung von *Y. ruckeri*, dem Auslöser der Rotmaulseuche (Enteric Red Mouth Disease, ERMD) bei Fischen, im Genus *Yersinia* wird schon seit der Erstbeschreibung (Ewing et al., 1978) in Frage gestellt.

Weiters stellen *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. rohdei* und *Y. ruckeri* zusammen mit *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* jeweils genetisch homogene Arten dar, während *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* sowie *Y. mollaretii* heterogener sind. Bei *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii* sind einige der untersuchten

Stämme genetisch so sehr unterschiedlich zum jeweiligen Typstamm der Spezies, dass es sich bei diesen Stämmen möglicherweise um noch unbekannte *Yersinia* Spezies handelt könnte (Kotetishvili et al., 2005). Diese großen genetischen Distanzen innerhalb dieser Spezies wurden auch schon von Dolina und Peduzzi (1993) gezeigt.

1.2 Enteropathogene *Yersinia*

Das Genus *Yersinia* enthält drei humanpathogene Spezies: *Y. pestis*, den Erreger der Pest sowie die Enteropathogene *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind häufige Krankheitserreger bei Tieren, die meist nach oraler Aufnahme zu mesenterialer Adenitis und chronischer Diarrhö führen, wobei auch die Entwicklung einer tödlichen Septikämie möglich ist (Bottone et al., 2001). Die Infektion mit enteropathogenen Yersinien erfolgt beim Menschen oral durch kontaminierte Lebensmittel und Wasser sowie durch direkten Kontakt, wie z. B. durch infizierte Blutkonserven. *Y. enterocolitica* führt hauptsächlich zu gastrointestinalen Symptomen wie akuter Enteritis (v. a. bei Kindern), Enterocolitis, mesenterialer Lymphadenitis sowie terminaler Ileitis. Vor allem in immunsupprimierten Patienten ist das Auftreten einer Septikämie möglich. Zu den Folgeerkrankungen zählen Arthritis, Erythema nodosum, Reiter's Syndrom, Glomerulonephritis und Myocarditis (Bottone, 1997). Eine Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* äußert sich mit mesenterialer Adenitis, in immunkompromittierten Personen kann auch eine schwere Septikämie auftreten (Bottone et al., 2001).
Die Pathogenität von *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* und *Y. mollaretii* bei Tieren sowie Menschen wurde noch nicht eindeutig geklärt; es scheint sich aber um opportunistische Pathogene zu handeln (Bottone et al., 2001).

1.3 *Y. pestis* als Krankheitserreger

Y. pestis ist als Auslöser von drei großen Pandemien bekannt. Die justinianische Pest trat von 541 bis 750 n. Chr. auf und hatte ihren Ursprung vermutlich in Ost- oder Zentralafrika. Von Ägypten aus verbreitete sie sich über den mittleren Osten und den

Mittelmeerraum (Fig. 1.1). Zur zweiten Pandemie, die im 14. Jahrhundert begann, gehört der so genannte „Schwarze Tod“, der den Tod von etwa einem Drittel der damaligen europäischen Bevölkerung verursachte. Diese Pandemie ist wahrscheinlich auf einen Krankheitsausbruch in Zentralasien zurückzuführen, der sich entlang der Handelsrouten nach Westen ausbreitete (Fig. 1.1). Bis ins späte 17. Jahrhundert kam es in ganz Europa immer wieder zu neuen Epidemien, was auch großen Einfluss auf Religion, Kultur, Wirtschaft und Politik dieser Zeit hatte sowie zur Verbesserung der hygienischen Standards und Entwicklung von medizinischen Einrichtungen wie z. B. Krankenhäusern führte. Die dritte Pandemie begann 1855 in China und erreichte 1894 Kanton und Hongkong, von wo aus die Pest sich bedingt durch neue Technologien wie die Dampfschifffahrt rasch weltweit ausbreiten konnte (Perry and Fetherston, 1997). Bis heute kommt es immer wieder zu vereinzelten Ausbrüchen der Krankheit. So berichtete die WHO beispielsweise für das Jahr 2003 von 2118 Fällen mit 182 Todesopfern in neun Ländern (World Health Organization, 2004). Bedeutend dafür ist die enzootische Verteilung von *Y. pestis* in Regionen auf der ganzen Welt (Fig. 1.1), wobei sich die größten Gebiete in Nordamerika und der früheren UdSSR befinden (Perry and Fetherston, 1997).

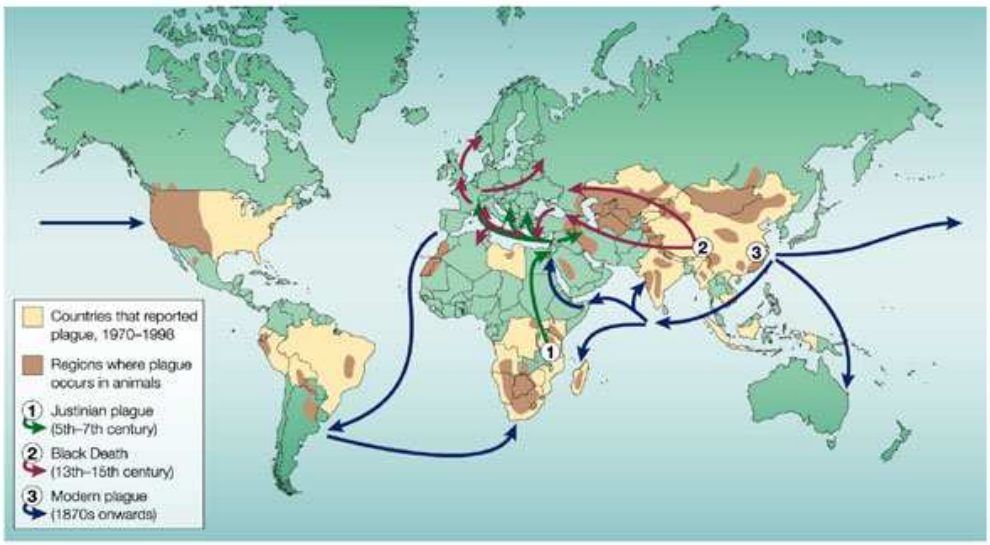


Fig. 1.1 Weltweite Verteilung der Pest. Die Routen der drei großen Pandemien sind mit Pfeilen markiert. Die erste Pandemie (1, grün) breitete sich aus Afrika stammend über Ägypten bis in den Mittelmeerraum aus. Die zweite Pandemie (2, rot) begann in Zentralasien und erreichte über nach Westen führende Handelswege ganz Europa. Die dritte Pandemie (3, blau) verbreitete sich weltweit, wobei diese ihren Ursprung in China hatte. Weiters sind enzootische Regionen braun bzw. Länder, die zwischen 1970 und 1996 von Pestfällen berichteten, beige gekennzeichnet. (Wren, 2003).

Pest ist eine zoonotische Erkrankung, die hauptsächlich bei Nagetieren auftritt. Die Übertragung des Pesterregers *Y. pestis* erfolgt in erster Linie durch Flöhe. Die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder direkter Kontakt spielen dagegen eine untergeordnete Rolle (Perry and Fetherston, 1997). Nach Aufnahme von *Y. pestis* über infiziertes Blut vermehrt sich das Bakterium im Mitteldarm des Flohs und bildet nach zwei Tagen Klumpen, die sich bis in den Proventriculus, der den Magen von der Speiseröhre trennt, und den Oesophagus ausbreiten. Bedingt durch diese Blockade wird bei erneuter Nahrungsaufnahme infiziertes Blut vom Floh in den Wirt zurückerbrochen, was zur Infektion führt (Perry and Fetherston, 1997).
Die Bakterien werden am Ort der Injektion von Makrophagen phagozytiert, sind aber in der Lage in diesen zu überleben und sich intrazellulär zu vermehren (Pujol and Bliska, 2005). In den Makrophagen wandern sie zu regionalen Lymphknoten, wo sie sich nach dem Wechsel zu extrazellulärer Replikation in großer Zahl weiter vermehren und zur Ausbildung der charakteristischen Beulen führen. Zusätzlich können die Bakterien auch durch Penetration von Gewebe in lymphatische Gefäße gelangen, um auf diesem Weg die regionalen Lymphknoten zu erreichen (Wren, 2003). Über das lymphatische System sowie das Blut kann sich die Infektion im ganzen Körper ausbreiten (Perry and Fetherston, 1997).

Die durch *Y. pestis* ausgelöste Erkrankung kann in verschiedenen Formen in Erscheinung treten. Die klassische Form ist die Beulenpest, die sich nach Ansteckung durch einen Flohbiss oder über offene Wunden entwickelt. Innerhalb von 2 bis 6 Tagen führt sie zu Fieber, Kopfweh, Schüttelfrost, Magen-Darm Beschwerden, wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö, sowie geschwollenen Lymphknoten (Bubo), die charakteristisch für diese Krankheitsform sind (Perry and Fetherston, 1997). Die Letalität liegt unbehandelt bei über 50 %, nach Behandlung zwischen 10 und 15 % (Rakin, 2003). Durch fehlende oder verzögerte Behandlung können Komplikationen wie Meningitis, Pneumonie (sekundäre Pestpneumonie) und Bakteriämie (sekundäre Pestseptikämie) entstehen.
Die primäre Pestseptikämie ist eine Bakteriämie ohne sichtbares Anschwellen der Lymphknoten (Lymphadenopathie), bei der die Symptome denen der Beulenpest entsprechen. Unbehandelt liegt die Todesrate bei fast 100 %, bei Behandlung mit Antibiotika zwischen 30 und 50 %.

Pestpneumonie stellt die dritte Erkrankungsform dar, die durch Tröpfcheninfektion bei engem Kontakt mit infizierten Personen hervorgerufen werden kann. Nach kurzer Inkubationszeit von 1-3 Tagen äußert sie sich durch hohes Fieber, Atemnot sowie Husten mit charakteristischem blutigem Sputum. Unbehandelt liegt die Letalität bei dieser Form bei 90-95 % (Perry and Fetherston, 1997; Rakin, 2003).

Obwohl natürliche Resistenzen in *Y. pestis* im Vergleich zu anderen pathogenen Bakterien selten sind wurden kürzlich Antibiotika-resistente Stämme entdeckt (Galimand et al., 1997; Guiyoule et al., 2001). Die für die Resistenz verantwortlichen Gene sind dabei auf einem Plasmid kodiert, das durch Konjugation übertragen werden kann. Diese Stämme stellen eine zusätzliche potentielle Bedrohung beim Einsatz von *Y. pestis* als Biowaffe dar. *Y. pestis* eignet sich aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit durch die weltweite Verbreitung von enzootischen Regionen, seiner einfachen Kultivierbarkeit, seiner hohen Virulenz verbunden mit einer hohen Sterblichkeitsrate bei Pestpneumonie sowie dem Fehlen eines wirksamen Impfstoffes generell gut als Biowaffe (Rakin, 2003). Zwar existieren zwei Typen von Impfstoffen, die entweder auf abgetöteten Gesamtzellen oder attenuierte, lebenden Zellen basieren, diese können aber zu Nebenwirkungen führen, verhelfen nur für kurze Dauer zu Immunität und bieten darüber hinaus auch keinen Schutz vor einer Infektion mit Aerosolen (Anisimov et al., 2004; Titball and Williamson, 2001). An der Entwicklung eines effektiven Impfstoffes wird derzeit aber intensiv geforscht. So konnte vor kurzem durch Deletion des *yopH* Gens in *Y. pestis* CO92 ein attenuierter Lebendimpfstoff entwickelt werden, der Schutz vor einer Infektion mit *Y. pestis* CO92 bietet (Bubeck and Dube, 2007). Weiters könnte die genetische Diversität von *Y. pestis* beim Einsatz als Biowaffe ausgenützt werden um die Virulenz zu erhöhen oder die Diagnose, Behandlung und Prävention zu erschweren (Anisimov et al., 2004).

1.4 Die Genetik von *Y. pestis*

Durch Sequenzierung von Fragmenten von fünf „Housekeeping"-Genen (*thrA*, *trpE*, *glnA*, *tmk*, *dmsA*) und einem Gen, das in die Lipopolysaccharid Biosynthese involviert ist (*manB*), - so genanntes MLST (Multilocus Sequence Typing) –, Analyse von sSNPs

(synonymous Single Nucleotide Polymorphisms), MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis) und Untersuchung der Verteilung von IS100 Insertionselementen wurde gezeigt, dass *Y. pestis* ein hoch konservierter Klon von *Y. pseudotuberculosis* ist, der sich erst kurz vor der ersten großen Pestpandemie, d. h. vor 1'500 – 40'000 Jahren, aus *Y. pseudotuberculosis* entwickelt hat (Achtman et al., 2004; Achtman et al., 1999). Diese enge Verwandtschaft wurde kürzlich mit MLST von anderen Genen (Kotetishvili et al., 2005) sowie durch Analyse der O-Antigen Gencluster (Skurnik et al., 2000) und Sequenzvergleich der Gene *tuf* (Elongationsfaktor Tu) und *atpD* (F-ATPase β-Untereinheit) (Paradis et al., 2005) bestätigt, wurde aber bereits früher durch DNA-DNA Hybridisierung (Bercovier et al., 1980) und Analyse der 16S rRNA Sequenzen (Ibrahim et al., 1993; Trebesius et al., 1998) nachgewiesen.

Durch Vergleiche der kompletten Genome eines *Y. pseudotuberculosis* Stammes und verschiedener *Y. pestis* Stämme (Achtman et al., 2004; Chain et al., 2004; Chain et al., 2006) sowie DNA Microarray-Analyse (Hinchliffe et al., 2003) wurde versucht die Evolution von *Y. pestis* nachzuvollziehen. Es wurde festgestellt, dass massiver Genverlust sowie durch Insertionselemente vermittelte intragenomische Neuordnung essentiell für die Entwicklung waren, vor allem für die Entwicklung der Pathogenität von *Y. pestis*. *Y. pestis* besitzt im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis* bedeutend mehr Insertionselemente, die durch Rekombination zur Genomumstrukturierung beitragen (Chain et al., 2004; Chain et al., 2006; Hinchliffe et al., 2003; Parkhill et al., 2001). Obwohl auch die Aneignung von neuem genetischen Material durch horizontalen Gentransfer nachgewiesen werden konnte (Chain et al., 2004; Hinchliffe et al., 2003; Parkhill et al., 2001), scheint dieser eine geringere Bedeutung für die Evolution von *Y. pestis* gehabt zu haben (Chain et al., 2004).
Y. pestis weist eine starke Diversität auf, wie durch Ribotyping (Guiyoule et al., 1994), VNTR Analyse (Variable Number of Tandem Repeats) (Adair et al., 2000; Klevytska et al., 2001), Genotypisierung basierend auf der Verteilung von IS-Elementen im Genom (Motin et al., 2002) sowie Analyse von sechs DFRs (Difference Regions), die mittels substraktiver Hybridisierung identifiziert wurden (Radnedge et al., 2002), gezeigt wurde. Das große Spektrum an Wirten und die weltweite Verteilung von *Y. pestis* bildet die Grundlage der genetischen und phänotypischen Diversität dieser Spezies. So können sich *Y. pestis* Stämme neben den bereits erwähnten Faktoren in ihrer Virulenz sowie der Anzahl und Größe der Plasmide unterscheiden (Anisimov et al., 2004). Im Gegensatz zu

Russland und Asien wurde in Stämmen der amerikanischen Kontinente eine limitierte Diversität beobachtet (Anisimov et al., 2004; Guiyoule et al., 1994), wobei diese Beobachtung ihre Ursache in der noch nicht erfolgten Entdeckung oder in der fehlenden Publizierung haben könnte (Anisimov et al., 2004). Diese Diversität zeigte sich besonders in Stämmen, die dem Biovar Antiqua zugeordnet sind (Adair et al., 2000; Chain et al., 2006; Motin et al., 2002).

Y. pestis wurde 1951 basierend auf Unterschieden der phänotypischen Merkmale Glycerinfermentation, Nitratreduktion sowie Ammoniumoxidation in die drei Biovare Antiqua, Medievalis und Orientalis unterteilt (Devignat, 1951). Stämme des Biovar Antiqua fermentieren Glycerin und reduzieren Nitrat, während Stämme der Biovare Medievalis und Orientalis nur zur Glycerinfermentation bzw. Nitratreduktion befähigt sind. Die Fähigkeit zur Fermentation von Melibiose unterscheidet Medievalis Stämme zusätzlich von den anderen Biovaren (Mollaret and Mollaret, 1965). Möglicherweise ist der Verlust der Fähigkeit zur Glycerinfermentation des Biovar Orientalis auf eine Deletion im Gen für die Glycerin-3-phosphatdehydrogenase *glpD* zurückzuführen (Motin et al., 2002).
Aufgrund von epidemiologischen Untersuchungen sowie historischen Daten wurden die drei Biovare mit je einer der drei Pandemien assoziiert, wobei Antiqua die erste, Medievalis die zweite und Orientalis die dritte Pandemie verursacht haben soll. Diese Annahme wurde auch auf die derzeitige geografische Verteilung der Biovare gestützt: während Stämme der Biovare Antiqua und Medievalis aus Afrika bzw. Zentralasien isoliert werden, sind Orientalis Isolate weltweit verstreut (Devignat, 1951; Guiyoule et al., 1994).

Die Einteilung in Biovare wurde durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes basierend auf RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) unterstützt (Achtman et al., 1999). Auch in weiteren phylogenetischen Untersuchungen wie VNTR Analyse (Klevytska et al., 2001) und MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis) (Pourcel et al., 2004) konnte eine Clusterbildung der Biovare beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden kürzlich bei Untersuchung von sSNPs (synonymous Single Nucleotide Polymorphisms) große Diskrepanzen zur klassischen Einteilung entdeckt, weshalb anstelle von Biovaren die Unterteilung von *Y. pestis* in acht molekulare Gruppen vorgeschlagen wurde (Achtman et al., 2004). Die Einteilung

von *Y. pestis* Stämmen in Biovare wurde vor kurzem basierend auf dem Vergleich verschiedener *Y. pestis* Genome erneut in Frage gestellt (Chain et al., 2006).
In der früheren Sowjetunion wurde eine Einteilung von *Y. pestis* in die Subspezies *pestis, altaica, caucasica, hissarica, ulegeica* und *talassica* vorgeschlagen, die dort derzeit weit verbreitet ist (Anisimov et al., 2004). Chinesische Wissenschaftler bevorzugen dagegen eine Einteilung in 18 „Ecotypes", die auf verschiedenen biochemischen Eigenschaften basiert (Zhou et al., 2004b).

Kürzlich wurde ein viertes *Y. pestis* Biovar beschrieben, dessen Stämme nach der traditionellen Einteilung zum Biovar Medievalis gezählt werden (Zhou et al., 2004c). Das Biovar Microtus ist gekennzeichnet durch ein einzigartiges genomisches Profil, das durch massiven Genverlust entstanden ist, dem Unvermögen zur Fermentation von Arabinose sowie durch seine ungewöhnliche Pathogenität, die möglicherweise auf den Verlust von virulenzspezifischen Genen zurückzuführen ist. Stämme dieses Biovars sind tödlich für kleine Nagetiere, während in größeren Säugetieren wie Meerschweinchen, Hasen, Rhesusaffen, Schafen und Menschen keine Pesterkrankung ausgelöst wird (Zhou et al., 2004c).
Weiters wird eine Gruppe von atypischen *Y. pestis* Stämmen, die im Kaukasus und der Mongolei aus Nagetieren isoliert wurden, als Pestoides bezeichnet (Martinevskii, 1969). Pestoides Stämme unterscheiden sich von den klassischen Biovaren durch Fermentation von Rhamnose und Melibiose (Achtman et al., 2004). Zusätzlich sind Pestoides Stämme über die Biovare Antiqua und Medievalis verteilt oder gar nicht typisierbar (Adair et al., 2000; Motin et al., 2002; Radnedge et al., 2002).

Die Pathogenität von *Y. pestis* und den anderen humanpathogenen *Yersinia* beruht auf Virulenzfaktoren, die sowohl chromosomal als auch auf Plasmiden kodiert sind (Brubaker, 1991). Der Großteil dieser Virulenzfaktoren ist auf einem 70 kb großen Plasmid kodiert, das alle humanpathogenen *Yersinia* Spezies besitzen. Dieses Virulenzplasmid, pLCR bzw. pCD1 in *Y. pestis*, kodiert das Typ III Sekretionssystem, durch das Effektorproteine, die so genannten Yops (*Yersinia* outer proteins), in die Wirtszellen injiziert werden. *Y. pestis* besitzt zusätzlich zwei einzigartige Virulenzplasmide, pMT1/pFra und pPCP1/pPst, die maßgeblich zur gesteigerten Virulenz von *Y. pestis* beigetragen und in den enteropathogenen *Yersinia* Spezies fehlen. Das ungefähr 100 Kb große Plasmid pMT1/pFra kodiert für verschiedene

Virulenzfaktoren wie das Fraktion 1 (F1) Anigen oder Murintoxin, die der Phagozytose entgegenwirken bzw. für das Überleben in Flöhen essentiell sind. Das zweite *Y. pestis* spezifisch Virulenzplasmid, pPCP1/pPst, mit einer Größe von 9.6 Kb kodiert das Gen für den Plasminogenaktivator Pla, der für die Verbreitung des Bakteriums im Wirtsgewebe notwendig ist (Huang et al., 2006).

1.5 Chemotaxonomische Methoden

Bakterielle Systematik basierte vor der Einführung von molekularen Methoden hauptsächlich auf physiologischen und morphologischen Untersuchungen von Bakterien, obwohl bereits auch einige chemotaxonomische Methoden angewendet wurden. Die Verwendung von 16S rRNA zur Bestimmung des evolutionären Verwandtschaftsgrades ergab neue phylogenetische Kenntnisse, die aber oft gegensätzlich zu den bestehenden taxonomischen Einteilungen waren (Woese et al., 1990). Es zeigte sich, dass die Analyse von chemotaxonomischen Markern die phylogenetischen Beziehungen basierend auf 16S rRNA von Prokaryonten unterstützt. Die Chemotaxonomie beinhaltet die Analyse von Fettsäuren, polaren Lipiden, Mykolsäuren, Polyaminen, Chinonen, Zuckern, Lipopolysacchariden, Diaminosäure- und Aminosäurezusammensetzung der Zellwand sowie von Gesamtzellproteinen (Busse et al., 1996).

1.5.1 Chinone

Isoprenoide Chinone, Bestandteile der bakteriellen Plasmamembranen – sowohl der cytoplasmatischen wie auch der mitochondrialen Membran -, sind Komponenten der Elektronentransportkette und daher für die oxidative Phosphorylierung von großer Wichtigkeit (Collins and Jones, 1981). Die Bedeutung von Chinonen als chemotaxonomischer Marker für die mikrobielle Taxonomie konnte mehrfach bewiesen werden (Collins et al., 1979; Shah and Collins, 1980). Die Unterscheidungsmerkmale beruhen dabei auf den verschiedenen Chinontypen, der Länge der isoprenoiden Seitenkette und der Anzahl der gesättigten Isoprenoideinheiten.

Isoprenoide Chinone sind in die zwei große Gruppen Naphthochinone und Benzochinone eingeteilt, wobei erstere weiter in Phyllochinone sowie Menachinone und zweitere in Plastochinone und Ubichinone unterteilt werden können. Die für die

Charakterisierung von Bakterien wichtigsten Chinone sind Ubichinon, Menachinon und die Derivate Dihydromenachinon sowie Demethylmenachinon und Rhodochinon (Fig. 1.2) (Collins and Jones, 1981).

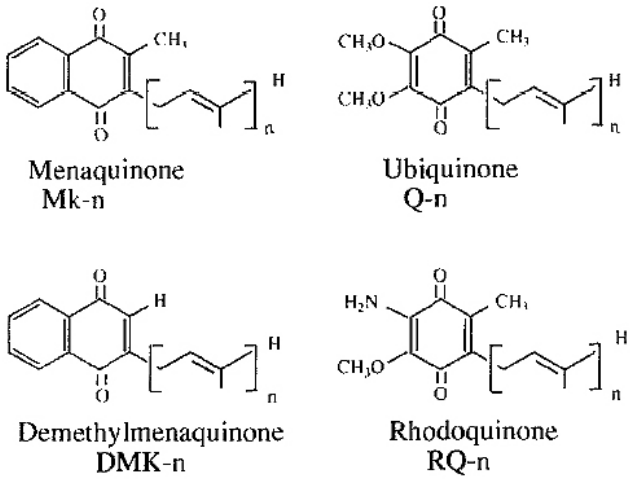


Fig. 1.2 Struktur von häufig in Bakterien vorkommenden Chinonen (Busse et al., 1996).

Ubichinone werden ausschließlich in Bakterien der *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaproteobacteria* wie auch in Fungi und Hefen gefunden. Die Anzahl der Isoprenoidseitenketten ist dabei oft charakteristisch für die Klassen der *Proteobacteria*. Menachinone kommen ebenfalls in einigen Gruppen der erwähnten Klassen der *Proteobacteria* vor, in *Delta-* und *Epsilonproteobacteria* sowie in Mitgliedern der *Archaea* sind aber ausschließlich diese zu finden. Gram-positive Bakterien besitzen ebenso ausschließlich Menachinone, die sich neben der Anzahl der Isoprenoidseitenketten auch in der Anzahl der gesättigten Isoprenoideinheiten unterscheiden (Busse et al., 1996).

1.5.2 Polyamine

Polyamine sind polykationische Verbindungen, die Bestandteil aller prokaryotischen und eukaryotischen Zellen sind und mit vielen biologischen Reaktionen wie DNA-, RNA- und Proteinsynthese in Verbindung gebracht werden (Tabor and Tabor, 1985). Weiters tragen sie zur Stabilisierung von Membranen und Nukleinsäuren bei (Scherer and Kneifel, 1983). Polyamine sind als chemotaxonomischer Marker zur Klassifizierung von Bakterien geeignet (Busse and Auling, 1988; Hamana and Matsuzaki, 1992; Scherer and Kneifel, 1983), unter anderem ist dadurch die

Unterscheidung der *Enterobacteriaceae* von anderen Taxa der *Gammaproteobacteria* möglich (Hamana, 1996).

Einige der natürlich vorkommenden Polyamine sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst, wobei Putrescin und Spermidin die häufigsten Vertreter darstellen (Tabor and Tabor, 1985).

Tabelle 1.1 Natürlich auftretende Polyamine. Tabelle wurde modifiziert nach Busse und Auling (1998).

Struktur	Bezeichnung	Abkürzung
H_2N-$(CH_2)_3$-NH_2	1,3-Diaminopropan	DAP
H_2N-$(CH_2)_4$-NH_2	Putrescin	PUT
H_2N-CH_2-CHOH-$(CH_2)_2$-NH_2	2-Hydroxyputrescin	HPUT
H_2N-$(CH_2)_5$-NH_2	Cadaverin	CAD
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	*sym*-Norspermidin	NSPD
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH_2	Spermidin	SPD
H_2N-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	*sym*-Homospermidin	HSPD
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	*sym*-Norspermin	NSPM
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	Spermin	SPM
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH_2	Thermospermin	TSPM
H_2N-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH_2	Canavalmin	CANV
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH_2	Caldopentamin	CLPA
H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH_2	Homocaldopentamin	HCPA

1.5.3 Polare Lipide

Lipide sind aus einer polaren Gruppe, die über Glycerin mit zwei Fettsäuren verbunden ist, aufgebaut. Diese amphipathischen Moleküle können dabei zusätzliche Komponenten wie z. B. Zucker, Ethanolamin oder Cholin enthalten. Phospholipide bilden die Hauptkomponente der bakteriellen Membran (Madigan et al., 2000).

Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol und andere Phosphatidylglycolipide stellen die Phospholipide dar, die am häufigsten in Bakterien detektiert werden. Auch Ornithin- und Serin-enthaltende polare Lipide sowie phosphorfreie Glykolipide sind in Bakterien zu finden (Busse et al., 1996).

Da nur wenige Substanzen zum Vergleich erhältlich sind und ungewöhnliche Lipide oft nur durch die gleichzeitige Analyse mit einem Referenzstamm identifiziert werden können, gestaltet sich die Interpretation von Lipidmustern oft schwierig (Busse et al., 1996).

1.6 Genomisches Fingerprinting

Zur Erstellung von genomischen Fingerprints sind verschiedene Methoden anwendbar wie z. B. RAPD-PCR oder rep-PCR. Diese Methoden basieren auf der Verwendung von unspezifischen Primer bzw. von Primern, die auf repetitive Sequenzen des bakteriellen Genoms gerichtet sind. Die dadurch erhaltenen PCR-Produkte ergeben ein spezifisches Bandenmuster, mit dem sowohl der genetische Verwandtschaftsgrad von Bakterienisolaten untersucht werden kann als auch epidemiologische Studien durchgeführt werden können (Szczuka and Kaznowski, 2004).

1.6.1 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Die Amplifizierung von zufälligen DNA-Abschnitten – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - mittels sequenzunspezifischen Primern wurde 1990 erstmals beschrieben (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass unter wenig stringenten Bedingungen, d. h. bei niedriger Annealingtemperatur, Primer auch an Sequenzen binden, die einige Mismatches enthalten. Mit dieser Methode werden Polymorphismen im Genom entdeckt, die bei Amplifizierung mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ein spezifisches Bandenmuster ergeben. Durch Vergleich dieser RAPD-Fingerprints ist oft eine Unterscheidung von nah verwandten Bakterienstämmen möglich (Welsh and McClelland, 1990). Die Fähigkeit der RAPD-PCR zur Differenzierung sowie Charakterisierung von Bakterienstämmen konnte auch für *Yersinia* Spezies bereits gezeigt werden (Makino et al., 1994; Odinot et al., 1995).

1.6.2 Repetitive Sequenzen

Prokaryontische Genome enthalten ebenso wie die Genome aller anderen Organismen Sequenzen, die mehrfach im Genom vorhanden sind. Eine Untergruppe bilden die so genannten „interspersed repetitive sequences“, bei denen es sich um nichtkodierende, intercistronische Abschnitte handelt, die meistens nicht länger als 200 Bp sowie über das prokaryontische Genom weit verstreut sind (Lupski and Weinstock, 1992).

Die REP (Repetitive Extragenic Palindromic) Sequenz bzw. PU (Palindromic Unit) Sequenz wurde erstmals im Genom von *Escherischia coli* sowie *Salmonella*

typhimurium identifiziert (Gilson et al., 1984; Higgins et al., 1982; Stern et al., 1984). Diese Sequenz besteht aus einer 38 Bp langen Consensussequenz mit einer 5 Bp langen variablen Schleife in der zentralen Region (Stern et al., 1984). Aufgrund der palindromischen Struktur ist in transkribierter RNA die Ausbildung einer stabilen Haarnadelschleife möglich (Higgins et al., 1982). Es wird angenommen, dass REP Sequenzen bei Genregulation, Struktur und Umgestaltung von Chromosomen eine Rolle spielen (Lupski and Weinstock, 1992). REP Elemente sind hauptsächlich in extragenischen, nichttranslatierten Bereichen lokalisiert und liegen meistens in mehreren Kopien vor. Zwischen 500 und 1000 Kopien dieser Sequenz sind schätzungsweise im Genom von *E. coli* verteilt, was bis zu 1 % des Gesamtgenoms entspricht (Stern et al., 1984).

Eine weitere Familie von repetitiven DNA Sequenzen sind ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) Sequenzen bzw. IRUs (Intergenic Repeat Units), die in den Genomen von *E. coli*, *S. typhimurium* sowie anderen Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae* entdeckt wurden (Hulton et al., 1991; Sharples and Lloyd, 1990). Das 124-127 Bp lange, palindromische ERIC Element (Fig. 1.3) enthält einen hochkonservierten Inverted Repeat und ist ebenso wie REP Elemente in der Lage Sekundärstrukturen auszubilden. Auch die Lokalisation der ERIC Elemente in intergenischen Regionen innerhalb sowie zwischen Operons und die mögliche Funktion bei Genexpression und Chromosomenorganisation entsprechen den REP Sequenzen. Im Gegensatz zu REP Elementen sind im Genom von *E. coli* nur 30-50 Kopien der ERIC Sequenz zu finden (Sharples and Lloyd, 1990). Obwohl sich ERIC- und REP-Sequenzen in vielerlei Hinsicht ähnlich sind, ist eine Verwandtschaft auszuschließen (Hulton et al., 1991).

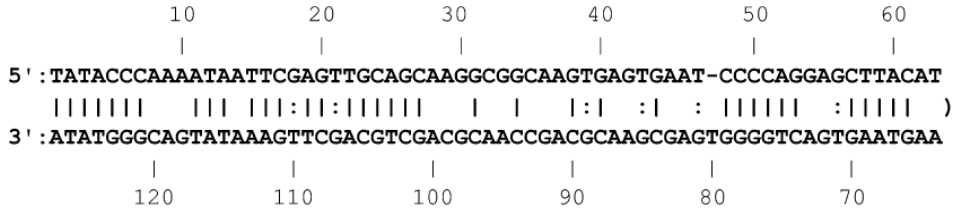


Fig. 1.3 ERIC Sequenz. Die 127 Bp lange Sequenz ist als Haarnadelstruktur dargestellt (Wilson and Sharp, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass REP- sowie ERIC-ähnliche Sequenzen in vielen verschiedenen Spezies der Eubacteria vorhanden sind, im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien (Versalovic et al., 1991).

Martin et al. beschrieben im Genom von *Streptococcus pneumoniae* erstmals eine repetitive DNA Sequenz bei Gram-positiven Bakterien (Martin et al., 1992). Das so genannte BOX Element besteht aus den drei Untereinheiten boxA, boxB und boxC, die zwischen 45 und 59 Nukleotide lang sind und in verschiedenen Kombinationen in einem BOX-Element auftreten können (Fig. 1.4 A). BOX Sequenzen sind in intergenischen Bereichen des Genoms lokalisiert und sind genauso wie die bereits beschriebenen repetitiven DNA Sequenzen in der Lage stabile Sekundärstrukturen auszubilden (Fig. 1.4 B). BOX Elemente besitzen möglicherweise eine regulatorische Funktion bei der Expression von Kompetenz- und Virulenzspezifischen Genen in *S. pneumoniae* (Martin et al., 1992).
Während die Untereinheiten boxB und boxC vorwiegend in *S. pneumoniae* vorkommen, scheinen boxA-ähnliche Sequenzen in einer Vielfalt von Bakterienarten konserviert zu sein (Koeuth et al., 1995).

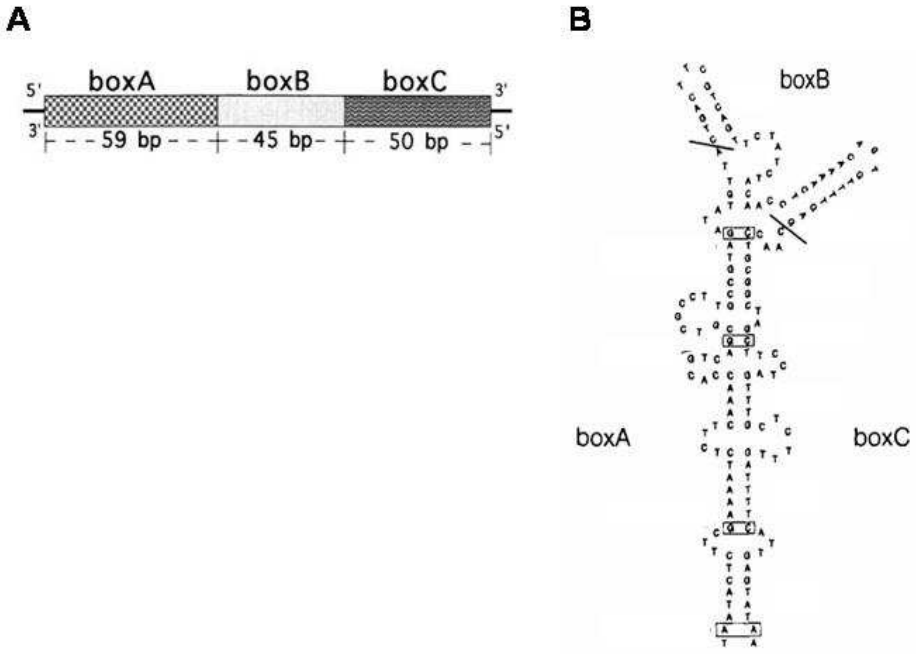


Fig. 1.4 Das BOX Element. **(A)** Die drei Untereinheiten boxA, boxB und boxC, die Größe ist unter der jeweiligen Untereinheiten angegeben. **(B)** Haarnadelstruktur der Consensussequenz, die Untereinheiten werden durch die geraden Linien getrennt (A aus Koeuth et al., 1995; B modifiziert aus Martin et al., 1992).

Bedingt durch die genomweite Verteilung sowie die hochkonservierte Struktur sind die beschriebenen repetitiven Sequenzen für verschiedenste Anwendungen wie Identifizierung und genetische Analysen von Mikroorganismen geeignet (Lupski and Weinstock, 1992). Versalovic et al. (1991) entwickelten die so genannte rep-PCR (Repetitive Sequence Element PCR), mit der eine klare Unterscheidung von Bakterienspezies möglich ist. Dabei binden auswärts gerichtete Primer an die repetitiven Sequenzen im Genom, durch PCR-Amplifizierung der dazwischen liegenden DNA Fragmente und anschließender Auftrennung durch Gelelektrophorese entstehen Spezies- und häufig sogar Stamm-spezifische genomische Fingerprints. Primern, die auf der boxA Untereinheit basieren, sind eine weitere Möglichkeit um Fingerprints von einer großen Anzahl von Mikroorganismen mittels rep-PCR zu erstellen (Koeuth et al., 1995).
Auch Oligonukleotide wie $(GTG)_5$, die polymorphe Loci erkennen, sind brauchbare Marker zur Differenzierung von Bakterienstämmen und können deshalb für die Erstellung von genomischen Fingerprints eingesetzt werden (Wiid et al., 1994). Die Anwendbarkeit des rep-PCR Fingerprinting mit $(GTG)_5$ Primern wurde an verschiedenen Genera, wie z. B. *Lactobacillus* (Gevers et al., 2001), *Enterococcus* (Svec et al., 2005) und *Salmonella* (Rasschaert et al., 2005) gezeigt.

Die beschriebenen Fingerprinting-Methoden wurde bereits zur Identifizierung und zur Bestimmung der genetischen Verwandtschaft von *Yersinia* Spezies angewendet (Kim et al., 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass mit rep-PCR – besonders mit ERIC- und REP- basierenden Primern - eine effektive Differenzierung von Mitgliedern des Genus *Yersinia* möglich ist. Sogar die nah verwandten Spezies *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* konnten mit dieser Methode unterschieden werden.

1.7 Das Ziel dieser Arbeit

Zur Identifizierung bzw. Differenzierung von *Y. pestis* von anderen *Yersinia* Spezies sollten spezifische Primer zur Anwendung in einer PCR entwickelt werden. Zur Suche nach spezifischen Sequenzen, die als Primersequenz geeignet sind, sollten genomische Fingerprints, die auf der Amplifizierung von repetitiven Sequenzen im bakteriellen Genom basieren, erstellt werden und basierend auf Unterschieden spezifische PCR-Systeme entwickelt werden.

Mittels chemotaxonomischer Untersuchungen sollten mögliche Merkmale zur Differenzierung der *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest" Stämme von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* gefunden werden. Weiters sollte mit Hilfe von DNA-Hybridisierung der Verwandtschaftsgrad dieser atypischen Isolate zu diesen zwei Spezies abgeklärt werden.

Verschiedene chemotaxonomische Untersuchungen sollten durchgeführt werden um festzustellen, ob die separate Position von *Y. ruckeri* im Genus *Yersinia* auch durch chemotaxonomische Charakteristika unterstützt wird und ob diese Spezies möglicherweise sogar ein eigenes Genus in der Familie der *Enterobacteriaceae* darstellt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme

Die in diesem Projekt verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 aufgelistet. Alle Stämme, mit Ausnahme der *Y. ruckeri* Stämme (ohne Typstamm), sowie *Y. pestis* DNAs wurden vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Dr. Holger Scholz) zur Verfügung gestellt. Die sechs *Y. ruckeri* Stämme wurden von der Universitätsklinik für Geflügel, Ziervögel, Reptilien und Fische der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt. Alle diese Stämme wurden aus Salmoniden mit typischen Symptomen der Rotmaulseuche (ERMD) isoliert. Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte auf 3.3x PYE Agarplatten bei Raumtemperatur, wobei alle drei Wochen auf neue Platten überimpft wurde.

Tabelle 2.1 Die für dieses Projekt verwendeten *Yersinia* Stämme. ^{T}, Typstamm; ATTC, American Type Culture Collection; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Bezeichnung	**Stamm**
Y11^{T}	*Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* DSM 13030^{T}
Y22	*Y. enterocolitica*
Y36	*Y. pseudotuberculosis*
Y81^{T}	*Y. ruckeri* ATCC 29473^{T}
Y102	*Y. enterocolitica*
Y110^{T}	*Y. kristensenii* ATCC 33638^{T}
Y111^{T}	*Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833^{T}
Y117	*Y. pseudotuberculosis*
Y159^{T}	*Y. aleksiciae* DSM 14987^{T}
Y216	*Y. aleksiciae*
Y221	*Y. aleksiciae*
Y228^{T}	*Y. „similis“*^{T}
Y233	*Y. „similis“*
Y239	*Y. „similis“*
Y252	*Y. „similis“*
Y262	*Y. pseudotuberculosis*
Y286	*Y. enterocolitica*
Y289	*Y. enterocolitica*
Y290	*Y. enterocolitica*
Y479	*Y. aleksiciae*
Y716	*Y. pseudotuberculosis* („pseudopest“)
Y718	*Y. pseudotuberculosis* („pseudopest“)
Y722	*Y. pseudotuberculosis* („pseudopest“)
SP5	*Y. ruckeri*
Bc74	*Y. ruckeri*
82/B	*Y. ruckeri*
0/1/99	*Y. ruckeri*
115/00	*Y. ruckeri*
129/86	*Y. ruckeri*

Tabelle 2.2 *Yersinia pestis* Stämme, von denen DNA vom Institut für Mikrobiologie, München, zur Verfügung gestellt wurde. NCTC, National Collection of Type Cultures; -, keine Angaben; ev., eventuell; [1], Informationen stammen von http://www.hpa.org.uk/nctc/default.htm.

Bezeichnung	Stamm	Alternative Stammbezeichnung	Biovar	weitere Informationen[1]
Y784	NCTC 570	Bombay 267	-	G. Liston in 1920 / fatal bubonic plague, Bombay
4	NCTC 570	Bombay 267	-	G. Liston in 1920 / fatal bubonic plague, Bombay
5	NCTC 2028	Java	Orientalis (ev.)	L. Otten, Java in 1925 / Plague, Java
6	NCTC 8775	139 L	-	M. T. Parker, PHLS Manchester in 1953 / Probably India
7	NCTC 8779	TS	-	M. T. Parker, PHLS Manchester in 1953 / Probably India
8	NCTC 10029	13925/58	Antiqua (ev.)	E. R. N. Cooke, Nairobi in 1958 / Bubonic plague
9	Kuma		Antiqua	-
10	Yokohama		Antiqua	-
11	M23		Orientalis	-
12	TS		Orientalis	-
13	G8786		Pestoides	-

2.2 Medien

Sämtliche Komponenten wurden in Millipore® Wasser (MPW) gelöst. Zur Sterilisation wurden alle Medien bei 121°C für 20 min autoklaviert.

3.3x PYE (Pepton Yeast Extract)

1 % Trypton/Pepton (ROTH)

1 % Hefeextrakt (MERCK)

pH 7.2 (mit 10 M NaOH)

3.3x PYE Agar

1.5 % Agar (Oxoid)

1 % Trypton/Pepton (ROTH)

1 % Hefeextrakt (MERCK)

pH 7.2 (mit 10 M NaOH)

LB (Lysogeny Broth)

1 % Trypton/Pepton (ROTH)

0.5 % Hefeextrakt (MERCK)

0.5 % NaCl (ROTH)

pH 7.0 (mit 10 M NaOH)

LB/Ampicillin Agar

1.5 % Agar (Oxoid)

1 % Trypton/Pepton (ROTH)

0.5 % Hefeextrakt (MERCK)

0.5 % NaCl (ROTH)

100 µg/ml Ampicillin (ROTH)

pH 7.0 (mit 10 M NaOH)

Zugabe von Amp Stocklösung (50 mg/ml) erst nach Abkühlen des Mediums auf 50°C. Lagerung der Platten bei 4°C.

SOC (Super Optimal Catabolite Repression)

2 % Trypton (ROTH)	2.0 g
0.5 % Hefeextrakt (MERCK)	0.5 g
10 mM NaCl (ROTH)	1 ml 1 M NaCl
2.5 mM KCl (ROTH)	0.25 ml 1 M KCl
20 mM $MgSO_4$	1 ml 2 M Mg^{2+} Stocklösung
20 mM Glucose (ROTH)	1 ml 2 M Glucose, sterilfiltriert (0.22 µm, ROTH)

Trypton, Hefeextrakt, NaCl und KCl wurden in 97 ml MPW gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 M Mg^{2+} Stocklösung und 2 M Glucose zugegeben (Endkonzentration je 20 mM) und mit sterilem MPW auf 100 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7.0 eingestellt.

2 M Mg^{2+} Stocklösung

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (MERCK)	20.33 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (MERCK)	24.65 g
	MPW ad 100 ml, sterilfiltriert (0.22 µm, ROTH)

GYT (Glucose Yeast Extract Trypton)

10 % Glycerin (ROTH)

0.25 % Trypton (ROTH)

0.125 % Hefeextrakt (MERCK)

2.3 Puffer und andere Lösungen

Blaumarker (BM)

25 % Saccharose (MERCK)	2.5 g
0.05 % Bromphenolblau (USB)	0.005 g
0.1 % SDS (ROTH)	100 µl 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
50 mM Tris/HCl	100 µl 5 M Tris/HCl, pH 8.2
	MPW ad 10 ml, autoklavieren.

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA)

2 M Tris (ROTH)

0.1 M EDTA (MERCK), pH 8.0

1 M Essigsäure (ROTH)

Zugabe von Tris und Essigsäure erst nach Fertigstellung von EDTA.

Molybdatophosphosäure

10 g Molybdatophosphosäure (MERCK) in 100 ml Ethanol p.A. (ROTH)

Molybdenum Blue

Molybdenum Blue Spray Reagent, 1.3 % (Sigma)

Ninhydrin

0.2 g Ninhydrin (Riedel-de Haën) in 100 ml Ethanol p.A. (ROTH)

α-Naphthol

Lösung A: 150 ml α-Naphthol (MERCK; 15 % in Ethanol p.A. (ROTH)) wurden mit 850 ml Chloroform:Methanol-Gemisch (25:30; v/v; beides ROTH) gemischt.

8.4 ml Lösung A
5.2 ml H_2SO_4 (MERCK)
32.2 ml Ethanol p.A. (ROTH)
3.2 ml MPW

4x Sample Buffer

6.25 mM Tris/HCl, pH 6.8
10 % Glycerin (v/v) (ROTH)
2 % SDS (w/v) (ROTH)
0.1 % Bromphenolblau (w/v) (USB)

10x LEB (Laemmli Elektrophoresepuffer)

250 mM Tris (ROTH)
1.92 M Glycin (ROTH)

1x LEB

0.1 % SDS (ROTH)
10x LEB

Coomassie Färbelösung

Coomassie Blue Stain (MERCK)	2.5 g
Essigsäure 100 % p.A. (ROTH)	100 ml
Methanol (ROTH)	500 ml
	MPW ad 1000 ml

Entfärbelösung

Essigsäure 100 % p.A. (ROTH)	100 ml
Methanol (ROTH)	300 ml
	MPW ad 1000 ml

TE Puffer (Tris-EDTA)

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA (MERCK)

pH 8.0 (mit 30 % HCl)

GES Puffer (Guanidin-EDTA-Sarkosyl)

Guanidiumthiocyanat (Sigma)	30 g
0.5 M EDTA (MERCK), pH 8.0	10 ml
MPW steril	10 ml

Im Wasserbad bei 65°C unter gelegentlichem Schütteln lösen, abkühlen lassen.

10 % Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin Natriumsalz; Fluka) 2.5 ml

MPW steril ad 50 ml, sterilfiltrieren (0.22 µm, ROTH). Lagerung bei Raumtemperatur.

2x SSC (Standard Saline Citrate)

300 mM NaCl (ROTH)

30 mM Na_3Citrat (ROTH)

Diphenylamin-Reagenz

Essigsäure 100 % p.A. (ROTH)

0.01 % Paraldehyd (Fluka)

4 % Diphenylamin (Sigma-Aldrich)

Vor Zugabe von Diphenylamin wurde Paraldehyd der Essigsäure zugefügt.

10x Tris

100 mM Tris (ROTH)

10 mM EDTA (MERCK)

pH 8.0 (mit 30 % HCl)

40 mM Na-Acetatpuffer

40 mM Na-Acetat (MERCK)

2 mM $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (MERCK)

pH 5.3 (mit Essigsäure)

Glycinpuffer

0.1 M Glycin (ROTH)

1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (MERCK)

pH 10.4 bei 37°C einstellen (mit 10 M NaOH)

1x PBS (Phosphate Buffered Saline)

0.13 M NaCl (ROTH)

0.005 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (MERCK)

0.0015 M KH_2PO_4 (ROTH)

Blocking Lösung

7.5 mM Na_2CO_3 (ROTH)

15.5 mM $NaHCO_3$ (MERCK)

1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

pH 9.6

1 M Phosphatpuffer (PB), pH 6.9

1 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_20$ (ROTH)

1 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (MERCK)

Mischung von Na_2HPO_4 zu NaH_2PO_4 bis gewünschter pH erreicht ist, autoklavieren.

2.4 Gewinnung von Biomasse

Am Abend wurde eine Vorkultur (25 ml 3.3 x PYE) mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. 15 ml der bewachsenen Vorkultur wurden am nächsten Tag in eine Hauptkultur (300 ml 3.3 x PYE) überführt und wiederum bei 28°C unter Schütteln über Nacht bzw. bis die Kultur dicht bewachsen war inkubiert.

Zum Ernten der Zellen wurde die Kultur mit 8’000 rpm bei 4°C für 30 min zentrifugiert (Sorvall Instruments RC5C, Rotortyp GS3). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 20 ml kaltem 0.875 % NaCl gewaschen (Rotortyp SS34, 12’000 rpm, 10 min, 4°C) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Nach

Bestätigung der Reinheit des gewonnenen Zellmaterials wurde dieses lyophilisiert (Telstar Cryodos).
Zur Überprüfung der Reinheit der geernteten Biomasse wurden Kontrollausstriche von sowohl Vorkultur als auch Hauptkultur auf 3.3 x PYE Agarplatten gemacht und bei 28°C inkubiert. Die Ausstriche wurden nach 14-24 h visuell auf Reinheit kontrolliert.

2.5 Erstellung einer Wachstumskurve

Am Abend wurde eine Vorkultur mit dem jeweiligen Stamm beimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur (100 ml 3.3 x PYE) mit ca. 20 ml der bewachsenen Vorkultur beimpft. Nach Schwenken zur Durchmischung wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Der Abgleich erfolgte mit sterilem 3.3x PYE. Die Messung der OD_{600} wurde in regelmäßigen Abständen (alle 1-2 h) wiederholt, bis keine Zunahme der OD mehr messbar war, d.h. die Kultur die stationäre Phase erreicht hatte. Zwischen den Messungen wurde die Bakterienkultur bei 28°C unter Schütteln inkubiert.
Um Kontaminationen auszuschließen wurden sowohl Vorkultur als auch - nach Beendigung der Messung - Hauptkultur wie beschrieben überprüft.

2.6 Physiologische Methoden

2.6.1 Temperaturtoleranz

Um den von Bakterien tolerierten Temperaturbereich zu bestimmen wurde der jeweilige Bakterienstamm auf 3.3x PYE Agar ausgestrichen. Das Wachstum wurde bei 4°C, 15°C, 22°C (Raumtemperatur), 28°C, 37°C sowie bei 43°C über den Zeitraum von drei Wochen beobachtet.

2.6.2 Salztoleranz

Die Bestimmung des vom jeweiligen Bakterienstamm tolerierten Salzgehalts erfolgte auf 3.3x PYE Agar mit folgenden NaCl-Konzentrationen: 1 %, 2.5 %, 5 %, 7.5 % und 10 % NaCl. Die Platten wurden bei Raumtemperatur inkubiert und das Wachstum über den Zeitraum von drei Wochen beobachtet.

2.7 Chemotaxonomische Methoden

2.7.1 Extraktion und Analyse von Chinonen und polaren Lipiden

Die hier angewandte Methode wurde wie beschrieben durchgeführt (Altenburger et al., 1996; Tindall, 1990a; Tindall, 1990b) und erlaubt sowohl die Extraktion von Chinonen als auch polaren Lipiden aus derselben Biomasse.

2.7.1.1 Extraktion und Analyse von Chinonen

100 mg lyophilisierte Biomasse wurden zusammen mit einem Rührfisch in ein Glasfläschchen überführt, mit 3 ml einer Mischung aus Hexan:Methanol (1:2; v/v; ROTH) versetzt und kurz mit Stickstoff begast. Die Probe wurde dann 30 min unter Vermeidung von Lichteinstrahlung gerührt. Anschließend wurde das Fläschchen auf Eis gestellt bis eine Phasentrennung von Methanol und Hexan beobachtet wurde. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Hexan (Hexan:Methanol 1:1; v/v) wurde die Probe zur Phasentrennung in einem Glaszentrifugenröhrchen für 5 min mit 3’000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Instruments RC5C, Rotortyp SS34). Die Hexanphase (obere Phase) wurde in ein Pyrexröhrchen überführt. Zur weiteren Extraktion wurden zur verbliebenen Methanolphase 2 ml kaltes Hexan und 2 ml 0.3 % NaCl zugegeben (Hexan:Methanol:0.3 % NaCl 1:1:1; v/v/v). Die Probe wurde gevortext und erneut zentrifugiert (3'000 rpm, 5 min, 4°C). Die Hexanphase wurde mit der ersten Hexanfraktion vereinigt und unter einem Stickstoffstrom vollständig reduziert. Die Chinonextraktion wurde bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Die Analyse der Chinone erfolgte mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ausgestattet mit einer Reversed-Phase Säule (RP18, 5 µm Partikel, 250 x 4.6 mm). Als Eluent diente Methanol:1-Chlorbutan (9:1; v/v) mit einer Flussrate

von 1 ml/min bei 30°C, zur Detektion der Chinone wurde ein UV-Detektor (269 nm) verwendet.
Zur Analyse wurden die Chinone in 150 µl Methanol:1-Chlorbutan (MERCK) (1:9; v/v) gelöst. 20 µl dieser Lösung wurden mit einer zuvor mit Methanol gespülten Hamiltonspritze in die HPLC injiziert.

2.7.1.2 Extraktion und Analyse von polaren Lipiden

Die Extraktion konnte mit zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt werden. Zum einen wurde zu der aus der Chinonextraktion erhaltenen Methanolphase inklusive dem Zellmaterial 5.5 ml einer Mischung Chloroform:Methanol (2.5:3.0; v/v) zugegeben, um eine Mischung Chloroform:Methanol:0.3 % NaCl (1:2:0.8; v/v/v) zu erhalten. Im Fall keiner zuvor durchgeführten Chinonextraktion wurden ca. 100 mg lyophilisierte Biomasse direkt mit 2.5 ml Chloroform, 5 ml Methanol und 2 ml 0.3 % NaCl versetzt.
Die Lösung wurde kurz mit Stickstoff begast und für 15 min auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur sollte sich eine homogene Mischung gebildet haben. Im Falle des Entstehens einer Phasentrennung wurde eine geringe Menge Methanol zugegeben. Durch Zentrifugation (Sorvall Instruments RC5C, Rotortyp SS34, 3'000 rpm, 10 min, 4°C) in Glaszentrifugenröhrchen wurden die Zellreste pelletiert. Der Überstand wurde in ein Glaszentrifugenröhrchen, in dem 5 ml Chloroform:0.3 % NaCl (1:1; v/v) vorgelegt waren, überführt, gevortext und erneut zentrifugiert (3'000 rpm, 5 min, 4°C). Die Chloroformphase (untere Phase) wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben, ohne dabei etwas von der Proteinschicht, der wässrigen Phase oder dem Zellmaterial aufzusaugen. Die Chloroformphase wurde unter einem Stickstoffstrom vollständig eingeengt, die polaren Lipide in 150 µl Chloroform:Methanol (2:1; v/v) gelöst und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Analyse des Lipidmusters erfolgte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie. Dazu wurde eine entsprechende Menge der Probe (4 – 30 µl) mit einer Hamiltonspritze in einem möglichst kleinen Punkt in die linke untere Ecke einer Dünnschichtplatte (Machery-Nagel, Art.-Nr. 818133; zuvor auf 10 x 10 cm zugeschnitten) aufgetragen (Fig. 2.1). Die Entwicklung der Platte erfolgte in der ersten Dimension in Chloroform:Methanol:Wasser (65:25:4; v/v/v). Nach Erreichen der 1 cm vom Rand der Platte gezogenen Linie, wurde die Platte für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platte wurde dann in der zweiten Dimension

(Chloroform:Methanol:Essigsäure:Wasser; 80:12:15:4; v/v/v/v) entwickelt und wiederum bei Raumtemperatur getrocknet.

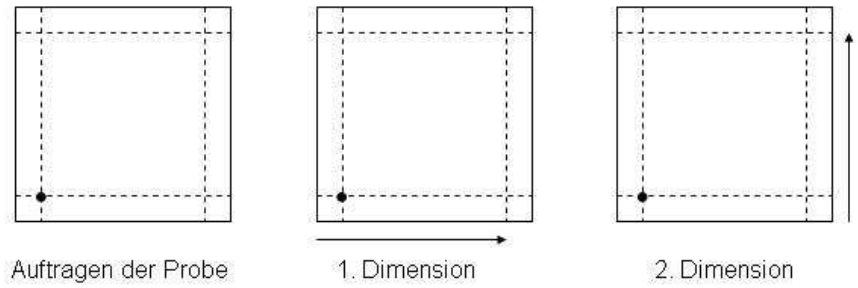


Fig. 2.1 Auftragen der Probe auf DC-Platte und Entwicklung.

Zur Detektion wurde die Platte mit verschiedenen Sprühreagenzien (Tabelle 2.3) besprüht, die spezifisch für die unterschiedlichen funktionellen Gruppen der polaren Lipide sind. Basierend auf Farbreaktionen und R_f-Werten erfolgte dann die Identifizierung. Gesprüht wurde ausschließlich unter einem Abzug aufgrund der Toxizität aller Sprühreagenzien, die Entwicklung fand – außer bei der Anwendung von Molybdenum Blue - in einem Heizofen (Heraeus) statt.

Tabelle 2.3 Für die Detektion der polaren Lipide verwendete Sprühreagenzien. [1], Molybdenum Blue und Ninhydrin können auf derselben Platte angewendet werden: nach der Detektion mit Ninhydrin kann mit Molybdenum Blue gesprüht werden.

Sprühreagenz	**Detektion von**	**Entwicklung bei**	**Farbreaktion**
Molybdatophosphosäure	Gesamtlipide	120 – 160°C	dunkelblau
Molybdenum Blue[1]	Phospholipide	Raumtemperatur	blau
Ninhydrin[1]	Aminogruppen	100 – 120°C	hellrot (rasch verblassend!)
α-Naphtol	Zuckerhältige Lipide	100°C	rot-violett

2.7.2 Extraktion und Analyse von Polyaminen

Die Methode zur Analyse der Polyamine wurde von Scherer und Kneifel 1983 erstmals beschrieben(Scherer and Kneifel, 1983).

Für die Polyaminextraktion wurde Biomasse verwendet, die bei ca. 70 % der maximal erreichbaren OD_{600} geerntet wurde. Die maximal erreichbare OD_{600} wurde zuvor mittels Wachstumskurve (siehe oben) ermittelt.

Lyophilisierte Biomasse (ca. 40 mg) wurden in ein Pyrexröhrchen eingewogen und mit 1 ml 0.2 M $HClO_4$ (MERCK) sowie 50 µl 1,8-Diaminooctan (Sigma; 20 µmol/ml; Endkonzentration 1 µmol) als interner Standard versetzt. Bei nicht exaktem Einwiegen von 40 mg wurde die beizugebende Menge 1,8-Diaminooctan angepasst. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Zellsuspension bei 100°C zur Hydrolyse der Zellen wurden die Zellreste in einem Eppi abzentrifugiert (HERMLE Z160M, 7'000 rpm, 10 min). 200 µl des Überstands wurden zusammen mit 300 µl Na_2CO_3-Lösung (100 mg/ml) und 800 µl Dansylchloridlösung (AppliChem; 7.5 g/ml Aceton, frisch hergestellt) in ein Pyrexröhrchen überführt. Die Dansylierung der Polyamine erfolgte nach festem Verschließen des Röhrchens bei 60°C für 20 min. Zur Bindung des freien Dansylchlorids wurden 100 µl Prolinlösung (AppliChem; 50 mg/ml) zugegeben und für weitere 10 min bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Gemisches auf 4°C, erfolgte die Extraktion der dansylierten Polyamine durch Zugabe von 100 µl Toluol p.A. (Applichem) und kurzem, kräftigen Schütteln. Die in der Toluolphase gelösten Polyamine konnten bei -20°C gelagert werden.

Die Analyse der Polyamine erfolgte mittels HPLC (RP18, Partikelgröße 5 µm, 250 x 4.6 mm) und einem Fluoreszenzdetektor (Anregungswellenlänge 360 nm, Messung der Fluoreszenz bei 520 nm). Als Eluent wurde ein linearer Gradient Acetonitril/H_2O (40/60 – 100/0 in 50 min) bei einer Flussrate von 1 ml/min und 40°C verwendet. 20 µl der die Polyamine enthaltende Toluolphase wurden mit einer Hamiltonspritze, die zuvor mit Toluol gespült wurde, injiziert.

Die Berechnung der Polyaminanteile erfolgte basierend auf den Area % -Werten. Der Wert für 1,8-Diaminopropan entspricht 25 µmol/g Trockengewicht. Unter Einbeziehung der Korrekturfaktoren (Tabelle 2.4) wurden die jeweiligen Anteile der Polyamine in µmol/g Trockengewicht in Relation zur Konzentration des internen Standards berechnet.

Tabelle 2.4 Korrekturfaktoren zur Berechnung der Polyamine.

Polyamin	**Korrekturfaktor**
Diaminopropan	1.8
Putrescin	1.4
Cadaverin	1.2
Spermidin	1.0
Spermin	0.8

2.7.3 Reduzierende SDS-PAGE (Gesamtzellprotein PAGE)

Zur Analyse der Gesamtproteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt.

Drei Impfösen Biomasse (von Agarplatte abgekratzt) wurden in 147.5 µl sterilem MPW mittels Vortexen suspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 4x Sample Buffer und 2.5 µl Mercaptoethanol (AppliChem) wurde die Probe bei 100°C für 10 min erhitzt. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation sedimentiert (Hermle Z233 MK-2, 10'000 rpm, 10 min, 4°C). Vom Überstand wurden 5 - 15 µl auf das zuvor vorbereitete Polyacrylamidgel (siehe Tabelle 2.5) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA für 2-3 h (Hoefer miniVE Vertical Electophoresis System, Amersham Biosciences) in 1x LEB als Laufpuffer. Nach Beendigung der Eletrophorese wurde das Gel für 30 min in Coomassie Färbelösung gefärbt und zur Entfernung von überschüssiger Färbelösung für weitere 30 min in Entfärbelösung gewaschen. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation (Universal Hood II, Bio-Rad) fotografiert.

Tabelle 2.5 Pipettierschema für SDS-PAGE. Angaben für zwei Gele. Während dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das Isopropanol durch Abschütten und Ausspülen mit MPW entfernt.

	Trenngel	**Sammelgel**
Acrylamid 4K-Lösung (40 %) Mix 19:1 (Applichem)	4.5 ml	750 µl
1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	3.8 ml	-
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8	-	750 µl
10 % SDS	150 µl	60 µl
10 % APS	150 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl
MPW	4.9 ml	4.4 ml

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Säurebildung aus Kohlenstoffquellen

4.5 ml Phenolrot-Bouillon (MERCK) wurden in Glaseprouvetten vorgelegt, autoklaviert und unter aseptischen Bedingungen mit je 225 µl Stocklösung (sterilfiltriert) der entsprechenden Kohlenhydratquellen (Tabelle 2.6) versetzt. Durch Überführen von Bakterienkolonien mit einem Wattestab in 10 ml steriles 0.875 % NaCl wurden Bakteriensuspensionen hergestellt. Die Reinheit der Bakteriensuspensionen wurde wie

beschrieben kontrolliert. Die vorbereiteten Glasröhrchen wurden mit jeweils 250 µl bzw. 150 µl Suspension beimpft und bei 18°C bzw. 28°C inkubiert. Alle 12 h wurden die Röhrchen auf eine etwaige Farbreaktion überprüft. Als Vergleich diente eine Nullkontrolle, d.h. nur Phenolrot-Bouillon ohne Kohlenhydratquelle, beimpft mit dem jeweiligen Bakterienstamm. Ein Farbumschlag von rot zu gelb / orange wurde als positiv bewertet.

Tabelle 2.6 Verwendete Kohlenstoffquellen und Konzentrationen der Stocklösungen.

Kohlenstoffquelle	Konzentration Stocklösung
L-Ornithin Monohydrochlorid (MERCK)	50 mM
(S)-(+) Lysin Monohydrochlorid (MERCK)	50 mM
D(+) Glucose Monohydrat (MERCK)	25 mM
D(+) Maltose Monohydrat (ROTH)	25 mM
D(-) Mannitol (Calbiochem)	25 mM
D(+) Mannose (MERCK)	25 mM
D(-) Sorbit (MERCK)	25 mM
D(+) Trehalose Dihydrat (Fluka)	25 mM
Glycerin (ROTH)	50 mM

2.8.2 Hämolysetest

Die Fähigkeit von Bakterien zur Hämolyse wurde auf Blutagar überprüft. Bei Bildung eines klaren Hofs um Kolonien wurde der jeweilige Bakterienstamm als hämolysierend bezeichnet. Keine sichtbare Veränderung des die Bakterienkolonie umgebenden Agars wurde als negativ gewertet. Inkubation erfolgte bei 18°C bzw. 28°C.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 DNA-Isolierung

2.9.1.1 Extraktion genomischer DNA für PCR-Anwendungen

Die Gewinnung genomischer DNA aus Bakterienzellen für PCR-Anwendungen erfolgte mittels der „freeze-thaw“-Methode.

Dafür wurden drei mit Zellmaterial, das von Agarplatten gewonnen wurde, gefüllte Impfösen in 100 µl sterilem H_2O (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) resuspendiert. Das Aufschließen der Zellen wurde durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und darauf folgendem Erhitzen bei 60°C für 5 min erreicht. Das

Zelllysat wurde anschließend bei 10’000 rpm für 5 min zentrifugiert (Hermle Z160M) und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Zur Überprüfung der Extraktion wurden 5 µl der gewonnenen DNA (+ 5 µl BM) auf ein 0.8 % Agarosegel aufgetragen. Die genomische DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.9.1.2 Extraktion genomischer DNA für DNA-DNA Hybridisierung

Die Isolierung hochreiner DNA für die Anwendung in DNA-DNA Hybridisierungen erfolgte nach Pitcher et al. (Pitcher et al., 1989) in modifizierter Form.

Als Ausgangsmaterial wurde lyophilisierte Biomasse eingesetzt. Dafür wurde 1/9 der aus einer 300 ml Hauptkultur gewonnenen Biomasse in 2 ml 1x PBS resuspendiert, bei 12'000 rpm für 1 min zentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

Die nachstehend beschriebene Extraktion wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen durchgeführt.

Zur DNA-Extraktion wurde das Pellet in 1 ml Lysozym-Lösung (MERCK; 50 mg/ml in TE-Puffer, pH 8.0) gründlich resuspendiert und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml GES Puffer wurde die Zellsuspension erneut bei 37°C bis zur Lyse der Zellen inkubiert (< 5 min). Dann wurden 750 µl 25 % SDS (leicht schütteln nach Zugabe) und 200 µl RNase A (Sigma; 25 mg/ml) zugegeben und gevortext. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden 200 µl Proteinase K (ROTH; 20 mg/ml) zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis erfolgte die Zugabe von 2.5 ml eiskaltem Ammoniumacetat (7.5 M). Die Suspension wurde dann für 10 min auf Eis belassen, 5 ml Chloroform:2-Pentanol (24:1; v/v; ROTH bzw. Fluka) wurden zugegeben, gut gevortext und 25 min bei 4'000 rpm und 4°C zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus). Die obere Phase wurde mit einer 10 ml Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und der letzte Schritt zur Proteinfällung wurde mit 0.5 Volumenteilen Chloroform:2-Pentanol wiederholt. Zu der abgehobenen Phase wurden zur Präzipitation der DNA 0.54 Volumenteile (ca. 4 ml) 2-Propanol (MERCK; -20°C) zugegeben, die Lösung für 1 min gevortext und die DNA durch Zentrifugation (4'000 rpm, 20 min, 4°C) sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die DNA nach Überführen in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß dreimal mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (Hermle Z233MK-2, 14'000 rpm, 10 min, 4°C) und im Vakuum (Univapo 100H) getrocknet. Die DNA wurde dann in 500 µl H_2O (Eppendorf) über Nacht bei 4°C gelöst. Dabei wurden so große DNA-Mengen gewonnen, dass ein vollständiges Resuspendieren des Pellets nicht

möglich war. Daher wurde das nicht gelöste Pellet abzentrifugiert (Hermle Z233MK-2, 14'000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand mit der gelösten DNA weiterverwendet. DNA-Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

Die Konzentration und Qualität der DNA wurde durch photometrische Messung (BioPhotometer, Eppendorf) sowie auf einem 1.7 % Agarosegel überprüft.

Bei Stämmen, von denen nur wenig Biomasse zur Verfügung stand (*Y. pestis* Stämme), wurde die DNA-Extraktion in einem kleinen Ansatz durchgeführt. Dafür wurden von allen Lösungen jeweils nur 1/6 der angegebenen Menge eingesetzt (150 µl Lysozym-Lösung, 750 µl GES Puffer, 112.5 µl 25 % SDS, 30 µlRNase A bzw. Proteinase K, 375 µl 7.5 M Ammoniumacetat, 750 µl Chloroform:2-Pentanol), die Extraktion wurde in 2 ml Tubes bzw. 15 ml Röhrchen durchgeführt.

2.9.2 Bestimmung der DNA - Konzentration

2.9.2.1 Photometrische Messung

Die DNA-Konzentration und -Qualität wurde in Plastikküvetten (UVette®, Eppendorf) in einem BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt. Als Blank sowie zur Verdünnung der DNA wurde H_2O (Eppendorf) verwendet. Abhängig von der Konzentration der zu messenden DNA wurde 1:10, 1:50 bzw. 1:100 verdünnt.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, wobei der Wert 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA) entspricht. Durch Messung der Absorption bei 230 nm bzw. 280 nm wurde die Reinheit der DNA-Lösung überprüft. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte über 1.8 liegen, Werte darunter weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine hin. Kontaminationen durch Kohlenhydrate, Salze oder organische Lösungsmittel wurden durch das Verhältnis A_{260}/A_{230} bestimmt, hier sollte der Wert über 2.0 liegen.

2.9.2.2 Chemische DNA - Konzentrationsbestimmung

Diese Methode wurde mit Modifikationen nach Richards (Richards, 1974)durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen der photometrischen Messung wurden 1 bzw. 2 µg DNA eingesetzt. Diese wurden mit 125 µl 2x SSC, 40.8 µl 9.2 M $HClO_4$ (Endkonzentration 1.5 M) und H_2O (Eppendorf) auf ein Endvolumen von 250 µl gebracht. Nach der Zugabe von 150 µl Diphenylamin-Reagenz wurde für 16 – 24 h bei Raumtemperatur

inkubiert. Die in der Lösung enthaltene DNA-Menge wurde durch Messung der Absorption bei 600 nm (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Die Messung wurde zehnmal wiederholt und daraus der Mittelwert berechnet.

2.9.3 Genomisches Fingerprinting

Um genomische Fingerprints der Bakterienstämme zu erstellen, wurde einerseits eine Methode zur Amplifizierung von zufälligen Abschnitten im Genom (RAPD-PCR), andererseits wurden PCR-Methoden zur Amplifizierung von repetitiven Sequenzen des bakteriellen Genoms (BOX-, ERIC-, $(GTG)_5$-, REP-PCR) angewandt.

Alle PCR-Reaktionen wurden in 0.2 ml PCR-Tubes (nerbe plus) in folgenden Thermocyclern durchgeführt: Primus 25 (MWG Biotech), Mastercycler (Eppendorf), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). 5µl PCR-Produkt (+ 5 µl BM) wurden zusammen mit einem Marker (100bp + 1.5kb DNA Ladder; Bioron) auf ein 1.7 % Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für ca. 2 h aufgetrennt. Das Gel wurde in Ethidiumbromid (0.25 µg/ml) für 15 min gefärbt, kurz in Wasser gelegt und fotografisch dokumentiert (Universal Hood II, Bio-Rad).

2.9.3.1 RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA)

Die 10-11 Nukleotide langen Primer für die RAPD-PCR (Primersequenzen siehe Tabelle 2.8) wurden von VBC-Biotech, Wien, synthetisiert. PCR-Ansatz und -Bedingungen sind in Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Tabelle 2.7 Pipettierschema für RAPD-PCR.

Komponenten	**Volumen / Ansatz**	**Endkonzentration**
5x green GoTaq® Flexi buffer (Promega)	5 µl	1x
$MgCl_2$ (25 mM, Promega)	3 µl	3 mM
dNTP Mix (10 mM pro dNTP; Bioron)	0.5 µl	0.2 mM pro dNTP
Primer (100 µM)	2 µl	8 µM
GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/µl, Promega)	0.16 µl	0.8 U
DNA template	0.5 - 2 µl	-
H_2O (Eppendorf)	x µl	ad 25 µl
Endvolumen	**25 µl**	**-**

Tabelle 2.8 Primer, die für genomisches Fingerprinting verwendet wurden. Tm, Schmelztemperatur; I, Inositol.

Name	Sequenz (5' → 3')	T_M (°C)
RAPD1a	GTG CCG ACG G	43,6
RAPD1b	GTG CCG ACG GC	51,4
RAPD2a	ATA GCC GAC G	33,3
RAPD2b	ATA GCC GAC GC	41,9
RAPD3a	TCT GAC CAC C	25,0
RAPD3b	TCT GAC CAC CG	37,9
RAPD4	CAG GCT TCC C	36,3
RAPD5	CGG CAA CGG G	48,6
RAPD6	GAC TGC GCA C	33,5
RAPD7	GCG TCA GGA G	32,1
RAPD8	CCC TTA TGC G	34,5
RAPD9	AAC AGG GCG G	41,9
RAPD10	GGA CGC GGT GC	51,4
RAPD11	GCA CGC ATT GG	44,6
RAPD12(2)	GTT CGT GCG GT	42,2
RAPD13	CCA CCT CGC A	39,5
RAPD14	AAA GGA TCG GG	39,9
RAPD15	TGT GGA GCC C	37,3
(GTG)5	GTG GTG GTG GTG GTG	
BOXA1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	
ERIC2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	
ERIC1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	
REP2-I	ICG ICT TAT CIG GCC TAC	
REP1R-I	III ICG ICG ICA TCI GGC	

2.9.3.2 rep-PCR (repetitive sequence-based)

Die Primersequenzen für ERIC- und REP-PCR (Versalovic et al., 1991), BOX-PCR (Koeuth et al., 1995), bzw. $(GTG)_5$-PCR (Ali et al., 1986) sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Ansätze sowie die Bedingungen für die PCRs sind in Tabelle 2.9, Tabelle 2.10, Tabelle 2.11 und Tabelle 2.12 zusammenfasst.

Tabelle 2.9 Pipettierschema für PCR mit BOXA1R sowie $(GTG)_5$.

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
5x green GoTaq® Flexi buffer (Promega)	5 µl	1x
$MgCl_2$ (25 mM, Promega)	2 µl	2 mM
dNTP Mix (10 mM pro dNTP; Bioron)	0.5 µl	0.2 mM pro dNTP
Primer (100 µM)	2 µl	8 µM
GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/µl, Promega)	0.12 µl	0.6 U
DNA template	0.5 - 2 µl	-
H_2O (Eppendorf)	x µl	ad 25 µl
Endvolumen	**25 µl**	**-**

Tabelle 2.10 Pipettierschema für ERIC-PCR.

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
5x green GoTaq® Flexi buffer (Promega)	5 µl	1x
$MgCl_2$ (25 mM, Promega)	2 µl	2 mM
dNTP Mix (10 mM pro dNTP; Bioron)	0.5 µl	0.2 mM pro dNTP
Primer ERIC2 (100 µM)	0.25 µl	1 µM
Primer ERIC1R (100 µM)	0.25 µl	1 µM
GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/µl, Promega)	0.12 µl	0.6 U
DNA template	0.5 - 2 µl	-
H_2O (Eppendorf)	x µl	ad 25 µl
Endvolumen	**25 µl**	**-**

Tabelle 2.11 Pipettierschema für REP-PCR.

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
5x green GoTaq® Flexi buffer (Promega)	5 µl	1x
$MgCl_2$ (25 mM, Promega)	2.5 µl	2.5 mM
dNTP Mix (10 mM pro dNTP; Bioron)	0.5 µl	0.2 mM pro dNTP
Primer REP2-I (100 µM)	0.5 µl	2 µM
Primer REP1R-I (100 µM)	0.5 µl	2 µM
GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/µl, Promega)	0.16 µl	0.8 U
DNA template	0.5 - 2 µl	-
H_2O (Eppendorf)	x µl	ad 25 µl
Endvolumen	**25 µl**	**-**

Tabelle 2.12 PCR-Bedingungen für rep-PCRs sowie RAPC-PCR.

	BOX	**ERIC / $(GTG)_5$**	**REP**	**RAPD**
Temperatur des Deckels	*110°C*	*110°C*	*110°C*	*110°C*
	95°C / 7 min	95°C / 7 min	95°C / 7 min	95°C / 5 min
	Zyklus 30x	Zyklus 30x	Zyklus 30x	Zyklus (45x)
Denaturierung	94°C / 1 min	94°C / 1 min	94°C / 1 min	95°C / 1 min
Annealing	53°C / 1 min	52°C / 1 min	44°C / 1 min	36°C / 1 min
Elongation	65°C / 8 min	65°C / 8 min	65°C / 8 min	72°C / 2 min
	65°C / 16 min	65°C / 15 min	65°C / 16 min	72°C / 2 min
Temperatur des Deckels	*aus*	*aus*	*aus*	*aus*
	4°C / ∞	4°C / ∞	4°C / ∞	4°C / ∞

2.9.3.3 Auswertung der genomischen Fingerprints

Die Fingerprints der verschiedenen Bakterienstämme wurden visuell miteinander verglichen um Unterschiede im Bandenmuster zu finden. Spezifische Banden wurden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen bzw. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega; Elution immer in 30 µl). Die eluierte DNA wurde in den pGEM®-T Easy Vector kloniert und sequenziert (VBC-

Biotech, Wien). Vergleich von dieser Sequenz mit bereits in Nukleotid-Datenbanken vorhandenen Sequenzen von Bakteriengenomen wurden mit Hilfe des FASTA Programms (Pearson, 1990; Pearson and Lipman, 1988) des European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI; http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html) sowie des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; (Altschul et al., 1990)) des National Center for Biotechnology Information (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on) durchgeführt.

2.9.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR wurde in einem 25 µl Ansatz durchgeführt, der sich aus 5 µl 5x green GoTaq® Flexi buffer, 2 µl $MgCl_2$ (beides Promega), 0.5 µl dNTPs (Bioron), je 0.25 µl Primer, 0.25 µl GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 1 µl DNA Template sowie H_20 (Eppendorf) zusammensetzte. Die PCR Bedingungen wurden folgendermaßen gewählt: nach einer Erst-Denaturierung bei 95°C für 5 min. folgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C und Elongation bei 72°C. Die Dauer dieser Schritte und die Annealingtemperatur waren abhängig von der Größe des zu erwartenden PCR-Produkts bzw. von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer. Abschließend erfolgte eine zusätzliche Elongationsphase bei 72°C für 5 min. Die genauen PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primerpaare sind in Tabelle 2.13 zusammengefasst. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben.

Tabelle 2.13 PCR-Bedingungen für die aufgelisteten Primerpaare.

Primerpaar	Denaturierung	Annealing	Elongation
Y_pseudo_spec f/r	95°C / 1 min	56°C / 1 min	72°C / 30 sek
Y_pestis_spec f/r	95°C / 1 min	62°C / 1 min	72°C / 1 min
Y_pest_pseudo f/r	95°C / 30 sek	62°C / 30 sek	72°C / 30 sek
Y_pseudo	95°C / 1 min	65°C / 1 min	72°C / 40 sek
Y_pestoides_spec f/r	95°C / 1 min	60°C / 1 min	72°C / 30 sek

2.9.5 Klonierung

2.9.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Klonierungsexperimente wurden Bakterien des Stammes *Escherichia coli* DH10 verwendet.

1000 ml LB Medium wurden mit 10 ml einer Übernachtkultur (20 ml LB) beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0.6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und danach in eisgekühlten, sterilen Zentrifugenbechern geerntet (GS3, 6'000 rpm, 15 min, 4°C). Das Zellpellet wurde zweimal in 500 ml eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen und in 2.5 ml eiskaltem GYT Medium resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden in Aliquots à 50 µl bei -80°C aufbewahrt.

2.9.5.2 Ligation

DNA-Ligation erfolgte mit dem pGEM®-T Easy Vector System (Promega) laut Anweisung des Herstellers. Für die Ligation wurden 3 µl zu klonierende DNA eingesetzt, die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.9.5.3 Transformation

5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl kompetenten *E. coli* vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Elektroporation (Gene Pulser, Biorad), die in vorgekühlten Küvetten durchgeführt wurde, erfolge die sofortige Zugabe von 1 ml kaltem SOC Medium. Die Zellen wurden für 1-2 h bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert (4'000 rpm, 5 min) und 800 µl des Überstands verworfen. Das Zellpellet wurde in den restlichen 200 µl resuspendiert und je 100 µl auf LB/Amp/X-Gal/IPTG (vor Verwendung wurden 100 µl 100 mM IPTG und 20 µl 50 mg/ml X-Gal pro LB/Amp Platte verteilt) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Am nächsten Tag wurden transformierte Kolonien (weiß bis durchsichtig) auf eine Masterplate (LB/Amp/X-Gal/IPTG) überimpft, bevor sie am Abend in 5 ml LB/Amp (100 µg/ml; 10 µl 50 mg/ml Ampicillin in 5 ml LB) überimpft und bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert wurden.

2.9.5.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden der E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie GmbH) laut Protokoll des Herstellers verwendet. Die Kontrolle der Purifikation erfolgte auf einem 1.7 % Agarosegel.

2.9.5.5 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut. Der pGEM®-T Easy Vector besitzt an der multiple cloning site verschiedene Restriktionsschnittstellen zur Entfernung des DNA - Inserts, darunter auf beiden Seiten des Inserts Schnittstellen für EcoRI.
8.3 µl Plasmid-DNA, 1 µl 10x Buffer EcoRI und 0.7 µl EcoRI (beides Fermentas) wurden gemischt, für 2 h bei 37°C verdaut und mit 7 µl BM auf ein 1.7 % Agarosegel aufgetragen.

2.9.5.6 Glycerinkultur

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Klonierungen wurden von den transformierten Bakterien Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 700 µl Bakteriensuspension (LB/Amp) und 700 µl 50 % Glycerin gemischt, für ca. 15 min auf Eis belassen und bei -80°C eingefroren.

2.9.6 Präzipitation von DNA

Zu einer DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 7.5) und 2 Vol. Ethanol p.A. (-20°C) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20°C für mind. 2 h oder über Nacht. Nach dem Sedimentieren der gefällten DNA durch Zentrifugation (Hermle Z233MK-2, 13'000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Pellet in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation s. o.). Nach Abschütten des Überstandes wurde die DNA bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet und anschließend in 50µl sterilem H_2O (Eppendorf) gelöst.

2.9.7 Bestimmung des G+C Verhältnis

Die Bestimmung des G+C Verhältnisses mittels HPLC erfolgte nach einer bereits beschriebenen Methode ((Mesbah et al., 1989)) in modifizierter Form.

Die in Wasser gelöste DNA wurde mit 10x Trispuffer versetzt um eine Endkonzentration von 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1mM EDTA zu erreichen.12 µl dieser DNA-Lösung (ungefähr 0.5 µg/µl) wurden für 5 min bei 100°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Als Referenz wurde Phage Lambda DNA (Segenetic; 0.5 µg/µl 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) eingesetzt. Nach Zugabe von 12 µl Nuclease P1 (Sigma; 10 µg/ml 40 mM Na-Acetat, 2mM $ZnSO_4$, pH 5.3) wurde für 1 h bei 50°C inkubiert. Danach wurden 12 µl Glycinpuffer sowie 12 µl alkalische Phosphatase (Sigma; 0.5 Units/µl 0.05 M Tris/HCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 8.5) zur Dephosphorylierung der DNA zugegeben und 3 h bei 37°C inkubiert. 10 - 15 µl dieses Hydrosylats wurden mittels HPLC analysiert. Die stationäre Phase bestand aus einer RP-18 Säule (30°C), als Eluent diente 0.6 M $(NH_4)H_2PO_4$/Acetonitril (80:4; v/v) bei einer Durchflussrate von 1 ml/min. Die Detektion der Nucleoside erfolgte bei 270 nm.

Die Berechnung des G+C Gehalts in mol% wurde anhand folgender Formel durchgeführt:

$$M = \left[\frac{G}{(G+T)} \right]$$

$$M \times 100 = G + C\ Gehalt\ (mol\%)$$

2.9.8 DNA-DNA Hybridisierung

DNA-DNA Hybridisierungen wurden mit Modifikationen nach der Methode, die erstmals von Ziemke (Ziemke et al., 1998)beschrieben wurde, durchgeführt.

2.9.8.1 DNA Markierung

Für die Markierung der DNA wurde der Nick Translation Kit (Roche) nach Anleitung des Herstellers verwendet. 2 µg DNA wurden mit Digoxygenin-11-dUTP (DIG-11-dUTP) und Biotin-16-dUTP doppelmarkiert.

Dafür wurden die verschiedenen Komponenten laut Pipettierschema (Tabelle 2.14) in einem Eppendorf Tube auf Eis vermischt und für 90 min bei 15°C inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch Inkubation auf Eis wurde die markierte DNA durch Zugabe von 380 µl H_2O (Eppendorf), 45 µl 3 M Na-Acetat, pH 7.0 (MERCK) und 890 µl Ethanol p.A., mehrmaligem Invertieren und Einfrieren bei -20°C für 30 min präzipitiert. Die DNA wurde abzentrifugiert (Hermle Z233 MK-2, 16'000 x g, 15 min), 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl H_2O (Eppendorf) gelöst. Die markierte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2.14 Pipettierschema für DNA-Markierung. [1], Zusammensetzung dNTP Mix 3 Vol. dGTP, 3 Vol. dCTP, 3 Vol. dATP, 2 Vol.dTTP, 1 Vol. DIG-11-dUTP:Biotin-16-dUTP (0.75:0.25)

Reagenz	Menge
dNTP Mix[1]	10 µl
10x Nick Translation Buffer	2 µl
2 µg DNA	x µl
H_2O (Eppendorf) ad 18 µl	x µl
Enzymmix (DNA Polymerase I, DNase I)	2 µl

2.9.8.2 Bewertung der Markierung

Die markierte DNA wurde für 5 min bei 100°C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt und 2 µl zu 800 µl 1x PBS, 0.1 % BSA gegeben. 400 µl dieser Lösung wurden mit 400 µl 1x PBS, 0.1 % BSA vermischt um eine 1:2 Verdünnung zu erhalten. Je 200 µl wurden in einer Streptavidin-beschichteten Microtiterplatte (Streptawell High Bind, Roche) für 30 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle dienten 200 µl 1x PBS, 0.1 % BSA. Nach dreimaligem Waschen der Wells mit 1x PBS folgte eine 30 minütige Inkubation (Raumtemperatur, Schütteln) in 200µl 1x PBS, 0.1 % BSA und Anti-Digoxygenin Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Roche, 5000:1). Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurden die Wells erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Detektion wurden 250 µl *p*-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml; 1 Tablette 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (Sigma) in 5 ml Blocking Lösung) zugegeben und bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde in regelmäßigen Abständen bei 405 nm gemessen (ELx800™ Absorbance Microplate Reader, BIO-TEK®).

Die Markierung wurde bei einem möglichst raschen Ansteigen der Absorptionswerte und einem sichtbaren Unterschied zwischen den Verdünnungen als positiv bewertet. Markierte DNA desselben Stammes wurde gepoolt um bei allen Hybridisierungen die gleichen Bedingungen zu schaffen.

2.9.8.3 DNA-DNA Hybridisierung

15 µl markierte DNA und 15 µg unmarkierter DNA wurden mit H_2O (Eppendorf) auf ein Volumen von 57 µl gebracht, für 5 min bei 100°C denaturiert und danach für 4 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 28 µl 1 M PB, pH 6.9 wurde eine Endkonzentration von 0.28 M PB erreicht. Diese Mischung wurde mit 3 Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 16 h bei Tm – 30°C (64.2°C) zur Hybridisierung inkubiert, wobei die Schmelztemperatur (Tm) mit folgender Formel berechnet wurde:

$$Tm = \frac{\%(G+C)+182.2}{2.44}$$

Zur Berechnung der Tm wurde der G+C Gehalt des einzigen, zum Zeitpunkt des Experiments vollständig sequenzierten Genoms eines *Yersinia pseudotuberculosis* Stammes herangezogen (*Y. pseudotuberculosis* IP32953, G+C Gehalt von 47.55 mol %; http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=ntyp05).

Falls das Experiment nach der 16 stündigen Inkubation nicht direkt fortgesetzt wurde, konnte der Ansatz bei -20°C aufbewahrt werden.
Die Hybridisierung wurde in 200 µl PCR Caps durchgeführt. Pro Hybridisierung wurden fünf heterologe Ansätze sowie ein homologer Ansatz zur Kontrolle durchgeführt. Hyridisierungen wurden immer in Duplikaten durchgeführt.

Die Trennung von Einzel- und Doppelstrang DNA erfolgte über Elution auf Hydroxyapatit in Duplikaten. Dafür wurden 100 µl H_2O zu jedem Hybridisierungsansatz pipettiert (Endkonzentration PB 0.14 M) und je 50 µl in ein Cap mit Hydroxyapatit überführt. Dabei wurde vorher das Mineralöl von der Pipettenspitze mit Hilfe eines Papierhandtuchs abgewischt. Nach kräftigem Vortexen folgte eine 15 minütige Inkubation bei Tm – 35°C (59.2°C). 450 µl 0.14 M PB, 0.2 % SDS wurden

zugegeben, kräftig gevortext und bei 59.2°C für 5 min inkubiert. Das Hydroxyapatit wurde abzentrifugiert (Hermle Z233 MK-2, 16'000 x g, 1 min), der Überstand mit der einzelsträngigen DNA (ssDNA) in ein neues Cap überführt. Die Elution der ssDNA wurde mit 500 µl 0.14 M PB, 0.2 % SDS wiederholt. Die dsDNA wurde zweimal in 200 µl 0.4 M PB mit fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur eluiert.

2.9.8.4 Hydroxyapatit Präparation

1 g Hydroxyapatit (DNA Grade Bio-Gel® HTP Gel, Bio-Rad) wurde mit 10 ml 0.14 M PB gemischt und je 200 µl in sterile Eppendorf Tubes aufgeteilt (die Hydroxyapatitlösung wurde währenddessen ständig mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt). Das HA wurde bei 16'000 x g für 1 min abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes bei 4°C gelagert.

2.9.8.5 Detektion

Die Eluate wurden mit 0.1 % BSA versetzt (Zugabe von 10µl BSA (10 %; w/v)) zu ssDNA bzw. 4 µl zu dsDNA) und je 200 µl in einer Streptavidin-beschichteten Microtiterplatte für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Wells wurde dreimal mit 1x PBS gewaschen, worauf eine einstündige Inkubation (Raumtemperatur, Schütteln) mit 200 µl Antidigoxygenin Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (5000:1 in 1x PBS, 0.1 % BSA) folgte. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden 250 µl *p*-Nitrophenylphosphat zugegeben und die Microtiterplatte bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Die Detektion der Farbentwicklung erfolgte bei 405 nm (ELx800™ Absorbance Microplate Reader, BIO-TEK®).

2.9.8.6 Berechnung

Der Prozentsatz der markierten DNA, die mit 0.4 M PB eluiert wurde (dsDNA Eluate), im Vergleich zu der markierten DNA, die vollständig eluiert wurde (ssDNA Eluate) wurde als Grad der Reassoziierung ausgedrückt (Bindungsverhältnis, binding ratio). Das relative Bindungsverhältnis (relative binding ratio) der heterologen DNA wurde als Prozentsatz des homologen Bindungsverhältnisses ausgedrückt (Formel 1).

$$BR = \frac{(DS \times 2)}{(SS \times 5 + DS \times 2)} \times 100$$

$$RBR = \frac{BR \text{ Heteroduplex}}{BR \text{ Homoduplex}} \times 100$$

$$\text{Standardabweichung} = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X)^2}{n}}$$

Formel 1 Berechnung des Bindungsverhältnisses (BR) und des relativen Bindungsverhältnisses (RBR).

Zur Berechnung wurde für beide Duplikate der Mittelwert der heterologen Bindungsverhältnisse sowie der Mittelwert der homologen Bindungsverhältnisse verwendet. Der endgültige Wert für das relative Bindungsverhältnis ergab sich aus dem Mittelwert der für die Duplikate errechneten relativen Bindungsverhältnisse.

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung von PCR-Methoden zur Identifizierung von *Yersinia* Spezies

Um *Y. pestis* spezifische Sequenzabschnitte zu finden wurden verschiedene Ansätze, basierend auf PCR, zur Erstellung genomischer Fingerprints durchgeführt. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung von spezifischen Sequenzen zur Differenzierung der *Y. pestis* Biovare Antiqua, Medievalis und Orientalis von atypischen Pestoides Stämmen. Einzigartige Banden wurden nach der Klonierung sequenziert und mit bekannten *Yersinia* Genomsequenzen verglichen um etwaige Sequenzunterschiede zu identifizieren. Basierend auf den gefundenen Sequenzunterschieden wurden dann in weiterer Folge Primer für die Anwendung in einer PCR (Polymerase Kettenreaktion) entwickelt.

Nach BOX-PCR wurde in genomischen Fingerprints von *Y. pestis* Y784 eine Bande bei ungefähr 800 Bp identifiziert, die bei den *Y. pseudotuberculosis*, inklusive „pseudopest“, Stämmen fehlte (Fig. 3.1 A). Die Sequenzanalyse nach Klonierung dieses Produkts und Vergleich mit Sequenzen in Datenbanken mit Hilfe des FASTA Programms zeigte eine 15 Bp lange Deletion im Genom von *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (Chain et al., 2004), EMBL Accession Number BX936398) rund um Position 4'224'840 auf. Basierend auf dieser Deletion wurden die zwei Primerpaare Y_pestis_spec f/r und Y_pseudo_spec f/r zum Nachweis von *Y. pestis* bzw. *Y. pseudotuberculosis* entwickelt (Tabelle 3.1). Die Primer wurden dabei so gewählt, dass der Forwardprimer des Primerpaares Y_pestis_spec f/r über den Sequenzabschnitt verlief, der in *Y. pseudotuberculosis* deletiert war, und der Primer somit nur im Genom von *Y. pestis* binden konnte. Für das Primerpaar Y_pseudo_spec f/r wurde analog vorgegangen: hier verlief der Reverseprimer über den die Deletion enthaltenden Genomabschnitt, wodurch der Primer nur im Genom von *Y. pseudotuberculosis* binden konnte, nicht aber im Genom von *Y. pestis*. Die jeweiligen Forward- bzw. Reverseprimer der zwei Primerpaare wurden in Genomabschnitte upstream bzw. downstream der Deletion gelegt.

Das Primerpaar Y_pseudo_spec f/r ergab nur bei *Y. pseudotuberculosis* Stämmen ein 490 Bp langes Produkt (Fig. 3.1 C und B). Interessanterweise wurde bei allen *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämmen ein größeres PCR Produkt erhalten, wodurch eine Unterscheidung dieser Stämme von den restlichen *Y. pseudotuberculosis* möglich war (Fig. 3.1 C). Zusätzlich konnten bei den zwei Referenzstämmen *Y. aleksiciae* und *Y. kristensenii* ebenfalls Banden nachgewiesen werden, die sich aber in ihrer Größe von den PCR-Produkten unterschieden, die für *Y. pseudotuberculosis* und „pseudopest“ erwartet wurden, und deshalb die spezifische Detektion der *Y. pseudotuberculosis* sowie „pseudopest“ Stämme nicht beeinträchtigten.

Um die Ursache für die Größenvariation der PCR-Produkte von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ zu eruieren wurden diese kloniert und sequenziert. Die 490 bzw. 1479 Bp langen Sequenzen wurden mit dem FASTA Programm analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die zwei Sequenzen an verschiedenen Stellen des *Y. pseudotuberculosis* IP32953 Genoms lokalisiert sind (4'224'357-4'224'846 bzw. 2'245'668-2'247'129). Dies führte zu dem Schluss, dass die unterschiedliche Größe der PCR-Produkte auf das Binden der Primer an verschiedenen Stellen im jeweiligen Genom zurückzuführen ist. Möglicherweise fehlt im Genom von *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ das 490 Bp Fragment oder ist so mutiert, dass der Primer nicht binden kann.

Die PCR mit dem Primerpaar Y_pestis_spec f/r zum Nachweis von *Y. pestis* erbrachte ein ca. 850 Bp langes PCR-Produkt. Mit Hilfe dieser Primer war die Detektion aller in dieser Arbeit verwendeten *Y. pestis* Stämme inklusive eines atypischen Pestoides Stammes (*Y. pestis* 13) möglich (Fig. 3.1 E). Bei den Typstämmen der anderen *Yersinia* Spezies sowie den *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Isolaten war dagegen kein PCR-Produkt zu beobachten (Fig. 3.1 D).

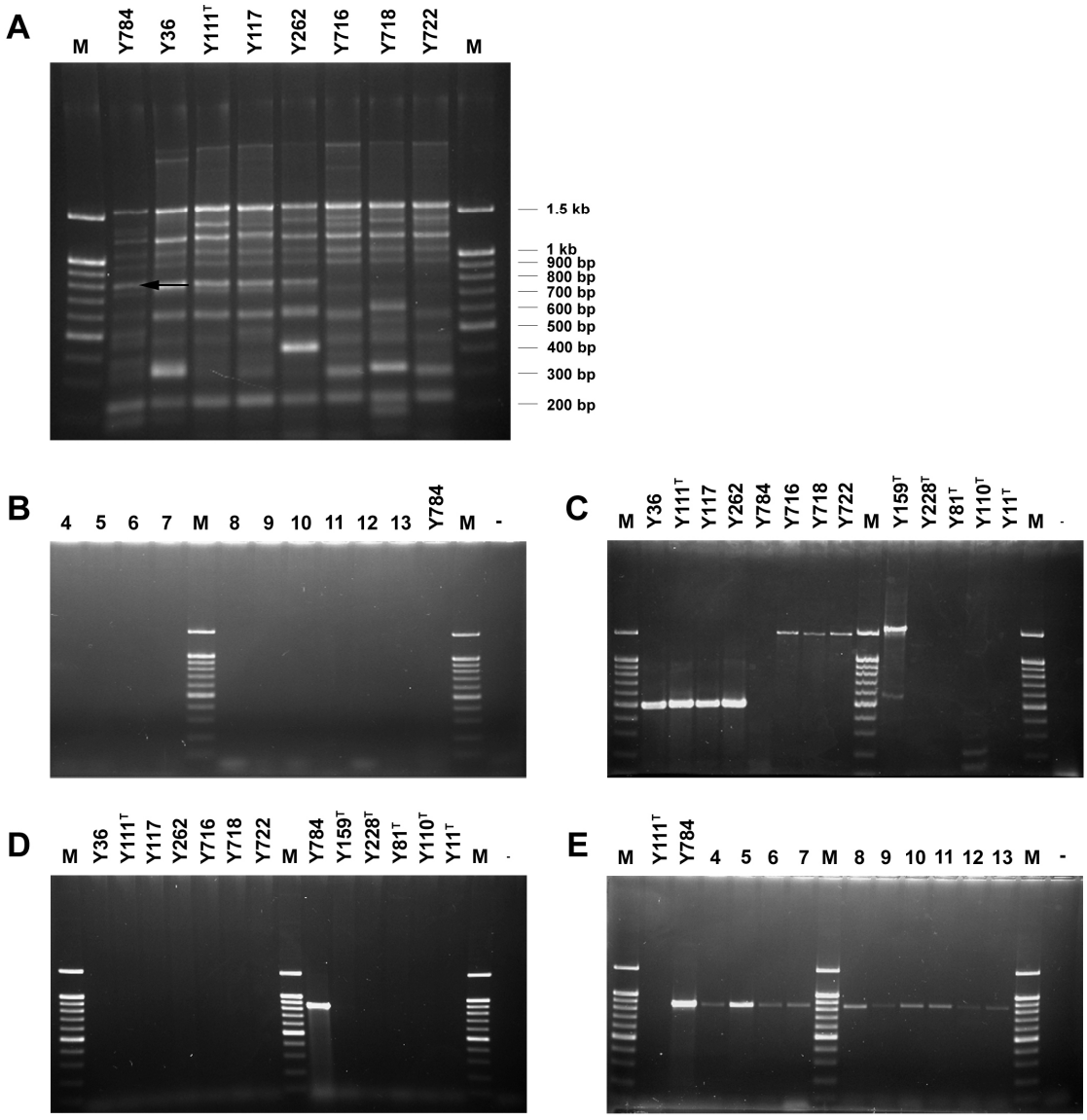


Fig. 3.1 (A) Genomische Fingerprints nach Box-PCR. Stämme: *Y. pestis* (Y784), *Y. pseudotuberculosis* (Y36, Y111^{T}, Y117) und *Y. pseudotuberculosis „pseudopest“* (Y716, Y718, Y722). Die mit Pfeil markierte Bande wurde ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Produkte auf 1.7 % Agarosegel nach PCR mit dem Y_pseudo_spec f/r Primerpaar **(B)** und **(C)** bzw. Y_pestis_spec f/r Primerpaar **(D)** und **(E)**. Stämme: *Y. pseudotuberculosis* (Y36, Y111^{T}, Y117, Y262), *Y. pseudotuberculosis „pseudopest“* (Y716, Y718, Y722), *Y. pestis* (Y784, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), *Y. aleksiciae* Y159^{T}, *Y. „ similis“* Y228^{T}, *Y. ruckeri* Y81^{T}, *Y. kristensenii* Y110^{T} und *Y. enterocolitica* Y11^{T}. M, Größenmarker (100 Bp + 1,5 Kb DNA Ladder); ^{T}, Typstamm; -, Negativkontrolle.

Die genomischen Fingerprints, die durch PCR mit RAPD5 als Primer generiert wurden, zeigten eine für *Y. „similis“* spezifische Bande (Fig. 3.2 A). Beim Alignment dieser Sequenz mit Hilfe des FASTA Programmes wurden in den Genomen von *Y. pestis* Nepal516 ((Chain et al., 2006), CP000305), Antiqua ((Chain et al., 2004), CP000308), CO92 ((Parkhill et al., 2001), AL590842), KIM ((Deng et al., 2002), AE009952), Biovar Microtus ((Song et al., 2004), AE017042) und *Y. pseudotuberculosis* IP32953

ein Tandem Repeat mit der Sequenz 5'- TGC AGG TTA A - 3' entdeckt. Die Häufigkeit dieses Repeats sowie die Länge der DNA-Abschnitte zwischen den einzelnen Repeats wurde in den Genomen von *Y. pestis* CO92 und *Y. pseudotuberculosis* IP32953 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass einer dieser Genomabschnitte in *Y. pseudotuberculosis* IP32953 mit 7006 Bp (2'024'755-2'031'760) deutlich länger war im Vergleich zu 6742 Bp in *Y. pestis* CO92 (2'043'393-2'050'135). Durch Vergleich dieser zwei Sequenzen mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor wurde in Bezug zu *Y. pseudotuberculosis* eine 255 Bp lange Deletion im Genom von *Y. pestis* CO92 entdeckt. Basierend auf dieser Deletion wurden zum Nachweis von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* in einer PCR bzw. zum Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* die Primerpaare Y_pest_pseudo f/r und Y_pseudo f/r entwickelt (Tabelle 3.1). Die Forward- bzw. Reverseprimer des Primerpaares Y_pest_pseudo f/r wurden dafür vor bzw. nach der Deletion im Genom von *Y. pestis* CO92 positioniert, wodurch bei PCR mit diesem Primerpaar bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* unterschiedlich große Produkte zu erwarten waren. Beim Primerpaar Y_pseudo f/r wurde der Forwardprimer so gelegt, dass er in dem in *Y. pestis* deletierten Sequenzbereich lag, wodurch eine Bindung dieses Primers nur in *Y. pseudotuberculosis* Genomen möglich war. Der Reverseprimer wurde in einem downstream gelegenen Genomabschnitt von *Y. pseudotuberculosis* IP32953 positioniert.

PCR mit dem Primerpaar Y_pest_pseudo f/r ermöglichte den Nachweis und gleichzeitig eine Differenzierung von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* durch Erhalt von 488 Bp bzw. 214 Bp großen PCR-Produkten. Es waren bei allen *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* Stämmen die entsprechenden Banden nachweisbar (Fig. 3.2 B und C). Allerdings zeigten die Typstämme von *Y. aleksiciae* und *Y. „similis“* ebenfalls die nur für *Y. pseudotuberculosis* erwartete Bande bei 488 Bp sowie der Typstamm von *Y. kristensenii* beide Banden. Die PCR mit den Typstämmen von *Y. ruckeri* und *Y. enterocolitica* lieferte dagegen ein negatives Ergebnis. Trotz dieser unerwarteten Resultate für die Referenzstämme war mit diesem Primerpaar die Identifizierung von *Y. pestis* sowie die Differenzierung von anderen *Yersinia* Spezies möglich, da das *Y. pestis* spezifische PCR-Produkt bei den Referenzstämmen nicht nachweisbar war oder zumindest nur in Kombination mit dem für *Y. pseudotuberculosis* spezifischen PCR-Produkt.

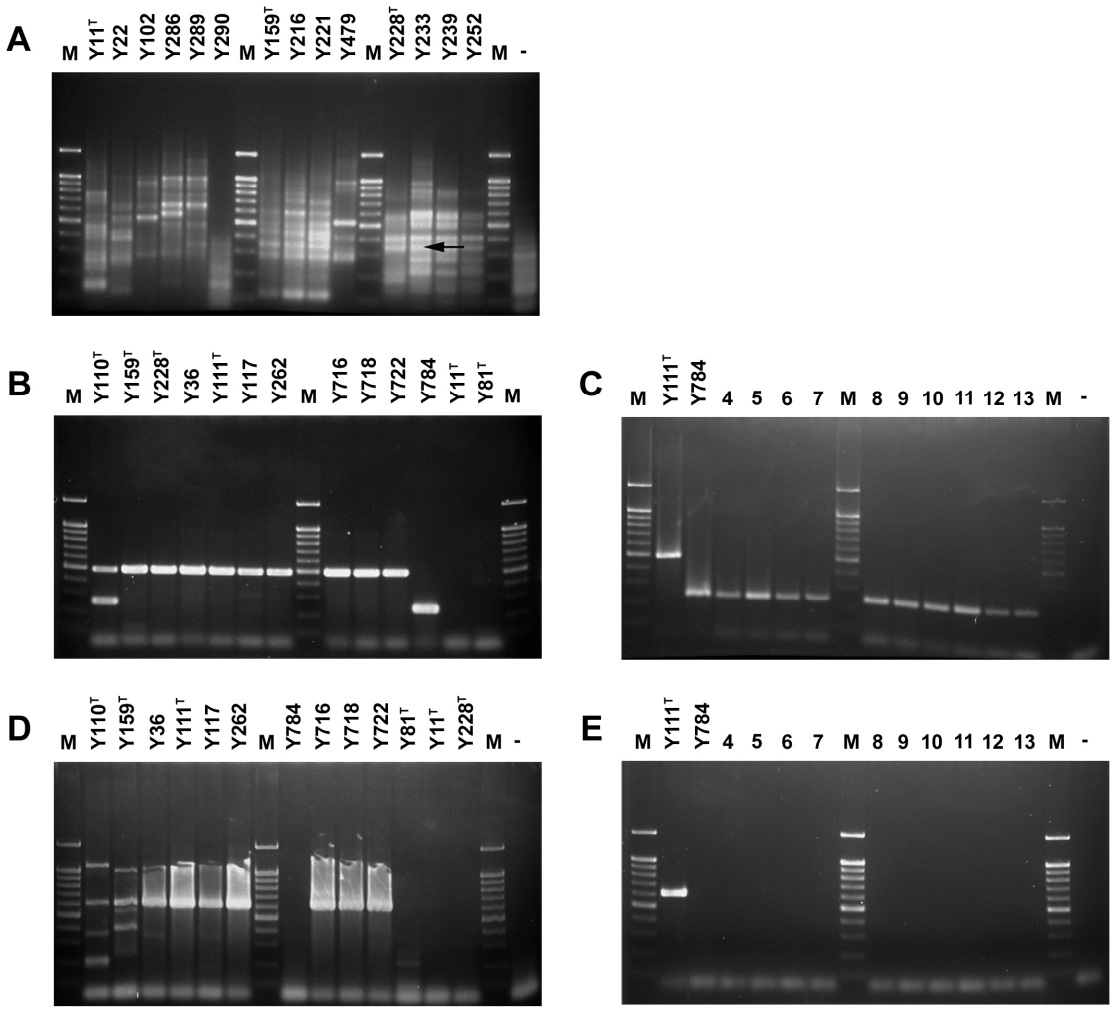


Fig. 3.2 (A) Genomische Fingerprints nach PCR mit RAPD5 Primer. Stämme : *Y. enterocolitia* (Y11^T, Y22, Y102, Y286, Y289, Y290), *Y. aleksiciae* (Y159^T, Y216, Y221, Y479), *Y. „similis“* (Y228^T, Y233, Y239, Y252). Die mit Pfeil markierte Bande wurde ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Produkte auf 1.7 % Agarosegel nach PCR mit dem Y_pest_pseudo f/r Primerpaar **(B)** und **(C)** bzw. Y_pseudo f/r Primerpaar **(D)** und **(E)**. Stämme: *Y. pseudotuberculosis* (Y36, Y111^T, Y117, Y262), *Y. pseudotuberculosis „pseudopest“* (Y716, Y718, Y722), *Y. pestis* (Y784, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), *Y. aleksiciae* Y159^T, *Y.“similis“* Y228^T, *Y. ruckeri* Y81^T, *Y. kristensenii* Y110^T und *Y. enterocolitica* Y11^T. M, Größenmarker (100 Bp + 1,5 Kb DNA Ladder); ^{T}, Typstamm; -, Negativkontrolle.

Mit dem Primerpaar Y_pseudo f/r konnten alle *Y. pseudotuberculosis* Stämme durch das 597 Bp lange PCR-Produkt identifiziert werden (Fig. 3.2 D). Auch hier wurde bei den Typstämmen von *Y. kristensenii* und *Y. aleksiciae* unerwartet ein PCR-Produkt erhalten. Im Gegensatz dazu erbrachte diese PCR bei den Typstämmen von *Y. enterocolitica*, *Y. ruckeri* und *Y. similis* sowie bei allen *Y. pestis* Stämmen mit diesem Primerpaar keine Produkte (Fig. 3.2 D und E).

Beim Vergleich der genomischen Fingerprints, die durch PCR mit RAPD2b Primer generiert wurden, wurde bei *Y. pestis* 13, bei dem es sich um einen Stamm des atypischen Biovars Pestoides handelt, eine spezifische Bande in der Größe von ca. 330 Bp entdeckt (Fig. 3.3 A). Ausschneiden, Klonieren und Sequenzvergleich dieses PCR-Produkts ergab mit keinem verfügbaren *Yersinia* Genom eine Überstimmung, weshalb angenommen wurde, dass es sich um eine Pestoides-spezifische Sequenz handeln könnte. PCR mit dem auf dieser Sequenz basierenden Primerpaar Y_pestoides_spec for/rev (Tabelle 3.1) ergab sowohl bei allen *Y. pestis* Stämmen als auch bei den Typstämmen der restlichen *Yersinia* Arten das 181 Bp große PCR-Produkt (Fig. 3.3 B). Somit war eine Differenzierung des Pestoides Stammes von den anderen *Y. pestis* Biovaren nicht möglich.

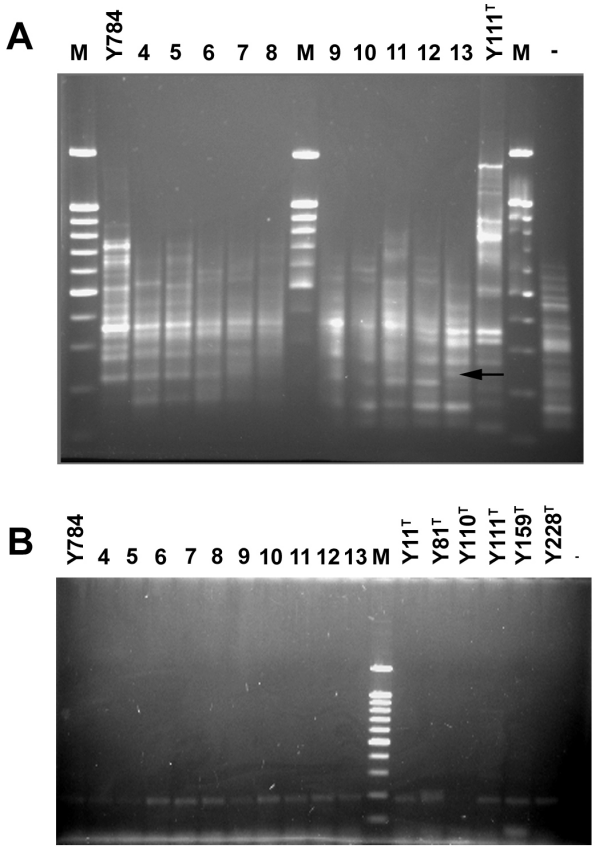


Fig. 3.3 (A) Genomische Fingerprints mit RAPD2b Primer. Stämme: *Y. pestis* (Y784, 4 – 13) und *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$. Die mit Pfeil markierte Bande wurde ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. **(B)** Produkte auf 1.7 % Agarosegel nach PCR mit den Y_pestoides_spec f/r Primern. Stämme: *Y. pestis* (Y784, 4 – 13), *Y. enterocolitica* $Y11^T$, *Y. ruckeri* $Y81^T$, *Y. kristensenii* $Y110^T$, *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$, *Y. aleksiciae* $Y159^T$ sowie *Y. similis* $Y228^T$. M, Größenmarker (100 Bp + 1,5 Kb DNA Ladder); ^{T}, Typstamm; -, Negativkontrolle.

Tabelle 3.1 Alle Primerpaare, die zur Detektion von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* entwickelt wurden. Tm, Schmelztemperatur; Bp, Basenpaare; -, keine Angabe.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]	PCR Produkt [Bp]	Position im Genom	Genom
Y_pseudo_spec_f	CAC GCT AAG TTA CAG TAG CG	56,7	490 bzw. 1479 [1]	4 224 357 – 4 224 376	*Y. pseudotuberculosis*
Y_pseudo_spec_r	CTC AGA TTC GTC AAT ATC C	53,1		4 224 828 – 4 224 846	IP32953
Y_pseudo_f	GAA CAG AGC GCG AAC CAA C	64,7	597	2 029 472 – 2 029 490	*Y. pseudotuberculosis*
Y_pseudo_r	CCA CTG TTG TTG ATG AAG GTG G	65,3		2 030 059 – 2 030 080	IP32953
Y_pest_pseud_f	TGA TTC ACC AAA CAC CAT TGC	64,4	214 bzw. 488 [2]	2 047 860 – 2 047 880 bzw. 2 029 198 – 2 029 218	*Y. pestis* CO92 bzw. *Y. pseudotuberculosis* IP32953
Y_pest_pseud_r	GTT GAC GCA GGG TTT GGT AC	63,1		2 048 074 – 2 048 093 bzw. 2 029 667 – 2 029 686	
Y_pestis_spec_f	GCA TTG ATG AGC CTA GTA TTT ATA AGG	61,8	859	193 687 – 193 713	*Y. pestis* KIM
Y_pestis_spec_r	GGT AGA TAA CGG GAT GAA TTG G	61,9		194 525 – 194 546	
Y_pestoides_spec_for	TGG CCA GTG TGG TAA AGT TG	62,3	181	-	-
Y_pestoides_spec_rev	AAC GGT GGT AAC GTT GTC TTG	62,5		-	-

[1], PCR-Produkt mit 490 Bp bei *Y. pseudotuberculosis* Stämmen, mit 1479 Bp bei *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest" Isolaten.

[2], PCR-Produkt mit 214 Bp bei *Y. pestis* Stämmen, mit 488 Bp bei *Y. pseudotuberculosis* Stämmen.

3.1.1 Entwicklung einer Multiplex-PCR

Zur Entwicklung eines PCR-Assays zur raschen Identifizierung von *Yersinia* Arten wurde versucht die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Primer zu kombinieren. Am sinnvollsten erwies sich dafür die Kombination der Primerpaare Y_pseudo_spec f/r und Y_pestis_spec f/r, wodurch die Identifizierung von *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ sowie *Y. pestis* in einem PCR-Ansatz möglich sein sollte. Bei Anwendung dieser Multiplex-PCR wurden sowohl für alle *Y. pseudotuberculosis* als auch für alle *Y. pestis* Stämme die erwarteten PCR-Produkte bei 490 Bp bzw. ca. 850 Bp erhalten (Fig. 3.4 B). Im Gegensatz dazu war bei den *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämmen Y716, Y718 und Y722 keine Bande nachweisbar. Interessanterweise wurde das ca. 1.5 Kb lange PCR-Produkt aber bei alleiniger Anwendung des Primerpaares Y_pseudo_spec f/r in einer PCR, die bei identischen Bedingungen wie die Multiplex-PCR durchgeführt wurde, synthetisiert (Fig. 3.4 B). Dieses Phänomen war auch bei einer Multiplex-PCR bestehend aus den Primerpaaren Y_pseudo_spec f/r und Y_pest_pseudo f/r zu beobachten. Auch hier wurde kein PCR-Produkt in der Größe von ca. 1.5 Kb erhalten, das für *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ zu erwarten gewesen wäre (Fig. 3.5).

Um die Ursache der limitierenden Wirkung auf die Synthese des *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ PCR-Produktes zu finden, wurde die Multiplex-PCR mit verschiedenen Modifikationen wiederholt. Dazu gehörten das Absenken der Annealingtemperatur von 62°C auf 58°C, der Einsatz von weniger DNA-Template (0.5 µl an Stelle von 1 µl) sowie die Verwendung von geringeren Primerkonzentrationen (je 0.25µl, 0.1 µl, 0.05 µl pro Ansatz). Doch all diese Maßnahmen führten zu keiner Veränderung des bereits bekannten Ergebnisses. Unter der Annahme, dass das Primerpaar Y_pestis_spec f/r inhibierend auf die Synthese des „pseudopest“ PCR-Produkts wirkte, wurde die eingesetzte Menge dieser Primer deutlich reduziert (je 0.03 µl pro Ansatz), während vom Primerpaar Y_pseudo_spec f/r weiterhin je 0.25 µl verwendet wurden. Auch hiermit konnte keine Verbesserung beobachtet werden. Erst bei Durchführung der PCR unter weniger stringenten Bedingungen erzeugt durch Reduzierung der $MgCl_2$ - Konzentration (Endkonzentration 1 mM) sowie in Kombination mit einer Annealingtemperatur von 58°C waren die PCR-Produkte in *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ in der Größe von ca. 1.5 Kb schwach nachweisbar (Fig. 3.4 C). Durch die Verringerung der Stringenz wurde zusätzlich aber auch die Amplifizierung von unspezifischen PCR-Produkten begünstigt.

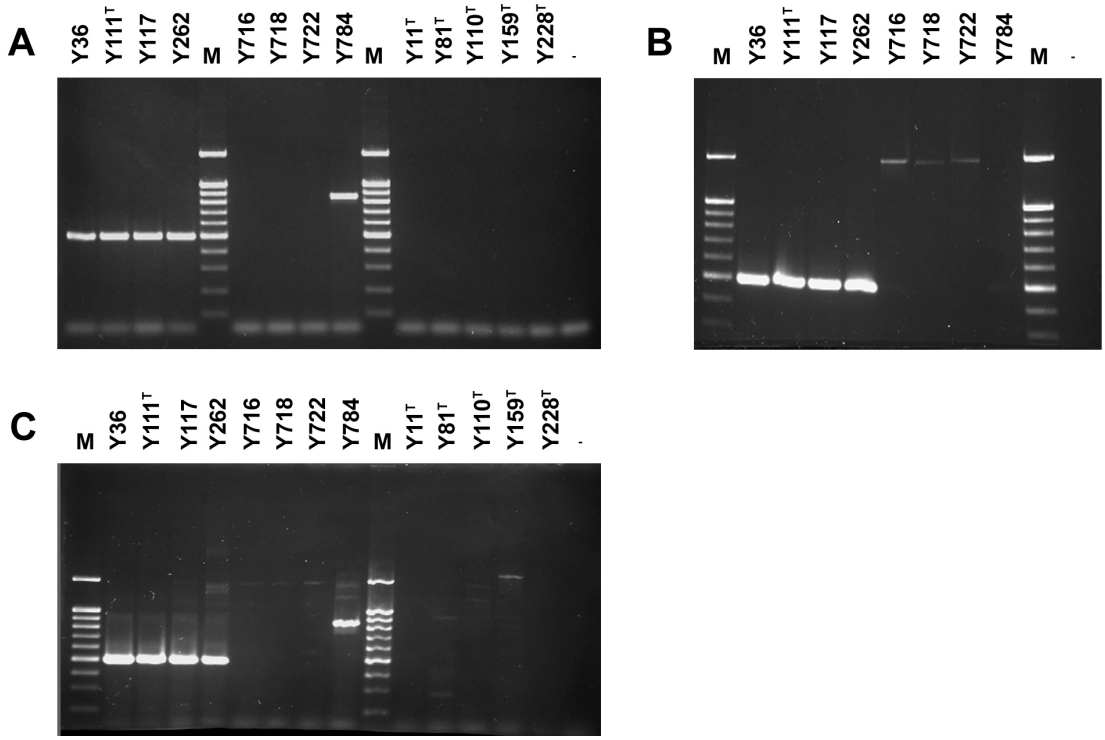


Fig. 3.4 (A) Multiplex-PCR mit den Primerpaaren Y_pseudo_spec f/r und Y_pestis_spec f/r. **(B)** Produkte auf 1.7 % Agarosegel nach PCR mit dem Primerpaar Y_pseudo_spec f/r. **(C)** Multiplex-PCR unter weniger stringenten Bedingungen. Die PCR-Produkte wurden auf 1.7 % Agarosegele aufgetragen. Stämme: *Y. pseudotuberculosis* (Y36, Y111^{T}, Y117, Y262), *Y. pseudotuberculosis* „pseudopestis“ (Y716, Y718, Y722), *Y. pestis* Y784, *Y. enterocolitica* Y11^{T}, *Y. ruckeri* Y81^{T}, *Y. kristensenii* Y110^{T}, *Y. aleksiciae* Y159^{T} sowie *Y. „similis“* Y228^{T}. M, Größenmarker (100 Bp + 1,5 Kb DNA Ladder); ^{T}, Typstamm; -, Negativkontrolle.

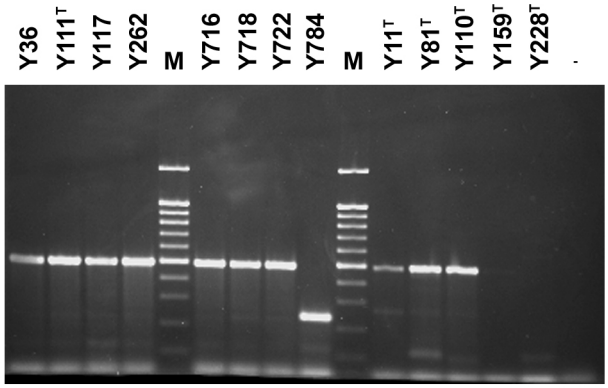


Fig. 3.5 Multiplex-PCR mit den Primerpaaren Y_pseudo_spec f/r und Y_pest_pseudo f/r. Stämme: *Y. pseudotuberculosis* (Y36, Y111^{T}, Y117, Y262), *Y. pseudotuberculosis* „pseudopestis“ (Y716, Y718, Y722), *Y. pestis* Y784, *Y. enterocolitica* Y11^{T}, *Y. ruckeri* Y81^{T}, *Y. kristensenii* Y110^{T}, *Y. aleksiciae* Y159^{T} sowie *Y. „similis“* Y228^{T}. M, Größenmarker (100 Bp + 1,5 Kb DNA Ladder); ^{T}, Typstamm; -, Negativkontrolle.

3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung von *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“

3.2.1 Chemotaxonomische Untersuchungen

Um mögliche Differenzierungsmerkmale zu *Y. pseudotuberculosis* zu finden, wurden die *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämme chemotaxonomisch charakterisiert. Dabei erfolgte sowohl eine Analyse des Chinonsystems als auch der polaren Lipide.

Das Chinonsystem enthielt als Hauptkomponente Ubichinon Q-8 und zusätzlich geringe Anteile von Ubichinon Q-9 sowie Menachinon MK-8. Zu *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* gab es keine relevanten Unterscheidungen, ebenso wenig zu den Typstämmen der Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. ruckeri* (Tabelle 3.2). *Y. kristensenii*, *Y. aleksiciae* und *Y. „similis“* zeigten höhere Anteile an MK-8, was aber für *Yersinia* nicht untypisch ist.

Tabelle 3.2 Chinonanalyse aller *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämme sowie aller in dieser Studie untersuchten *Yersinia* Typstämme. Angabe der Werte in Prozent. Q, Ubichinon; MK, Menachinon.

	Q-8	**Q-9**	**MK-8**
Y. pseudotuberculosis („pseudopest“) (Y716)	90	1	9
Y. pseudotuberculosis („pseudopest“) (Y718)	90	1	9
Y. pseudotuberculosis („pseudopest“) (Y722)	91	1	8
Y. pseudotuberculosis ($Y111^T$)	93	1	6
Y. pestis Y784	98	1	1
Y. enterocolitica ($Y11^T$)	95	1	4
Y. ruckeri ($Y81^T$)	91	3	6
Y. kristensenii ($Y110^T$)	73	3	24
Y. aleksiciae ($Y159^T$)	68	5	27
Y.“ similis“ ($Y228^T$)	89	1	10

Die polaren Lipide der *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Isolate (Fig. 3.6 B) enthielten so wie alle analysierten *Yersinia* Stämme Phosphatidylethanolamin als Hauptkomponente, Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin in moderaten Anteilen sowie geringe Anteile des unbekannten Aminophospholipids APL1. Zusätzlich waren zwei unbekannte Aminolipide (AL1, AL2) vorhanden, die auch bei *Y. pseudotuberculosis* Y36, $Y111^T$, und Y117 nachgewiesen werden konnten (Tabelle 3.3).

Das unbekannte Aminolipid AL2 war zudem ausschließlich bei allen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen inklusive den „pseudopest“ Isolaten nachweisbar. Eine Unterscheidung der „pseudopest“ Isolate von *Y. pseudotuberculosis* war durch das Vorhandensein eines unbekannten Aminolipids (AL3) möglich (Fig. 3.6), das sowohl bei keinem der analysierten *Y. pseudotuberculosis* Stämme wie auch bei keinem anderen der untersuchten *Yersinia* Typstämme detektiert werden konnte. In einigen *Y. ruckeri* Stämmen wurde dieses Lipid bei einer späteren Analyse detektiert (siehe 3.3.2). Auf die Unterscheidung der „pseudopest“ Isolate von *Y. pseudotuberculosis* hatte dies aber keinen Einfluss.

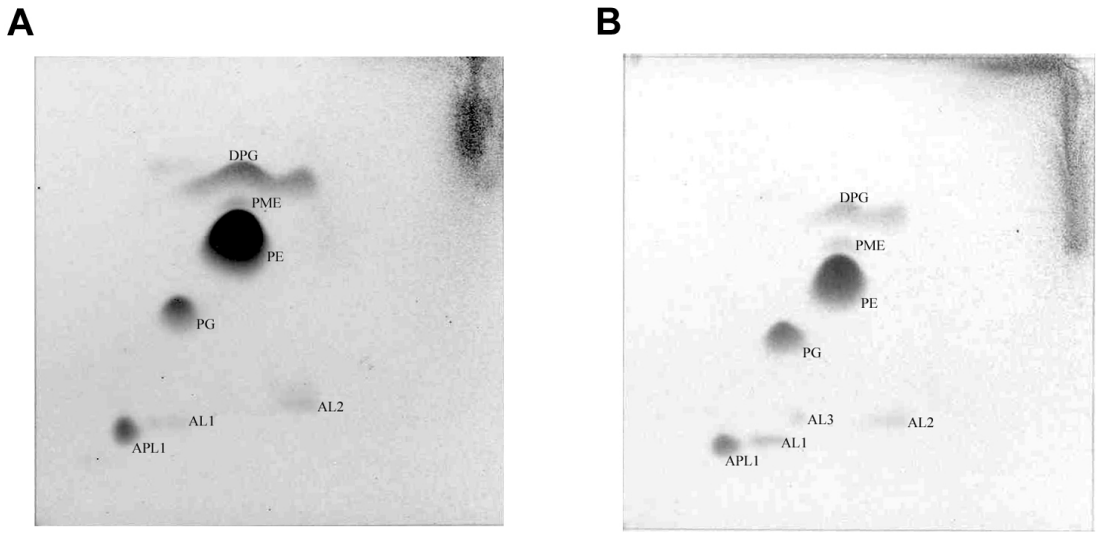


Fig. 3.6 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide der Stämme **(A)** *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$ und **(B)** *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Y722. Abkürzungen siehe Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3 Profil der polaren Lipide von allen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen (außer Y262) inklusive „pseudopest“ Stämme, aller *Y. ruckeri* Isolate sowie aller *Yersinia* Typstämme und *Y. pestis* Y784. PG, Phosphatidylglycerin; DPG, Diphosphatidylglycerin; PME, Phosphatidylmonomethylethanolamin; PE, Phosphatidylethanolamin; PL, unbekanntes Phospholipid; APL, unbekanntes Aminophospholipid; AL, unbekanntes Aminolipid; L, unbekanntes polares Lipid; +++, Hauptkomponente; ++, in moderaten Anteilen vorhanden; +, in geringen Anteilen vorhanden; -, negativ.

Stämme		**PG**	**DPG**	**PME**	**PE**	**PL1**	**APL1**	**APL2**	**AL1**	**AL2**	**AL3**	**L1**
Y. pseudotuberculosis „pseudopest“ Y716		++	++	+	+++	-	+	-	+	+	+	-
Y. pseudotuberculosis „pseudopest“ Y718		++	++	+	+++	-	+	-	+	+	+	-
Y. pseudotuberculosis „pseudopest“ Y722		++	++	+	+++	-	+	-	+	+	+	-
Y. pseudotuberculosis Y111^{T}		++	++	+	+++	-	+	-	+	+	-	-
Y. pseudotuberculosis Y36		++	++	+	+++	-	+	-	+	+	-	-
Y. pseudotuberculosis Y117		++	++	+	+++	-	+	-	+	+	-	-
Y. pestis Y784		++	++	+	+++	-	+	-	+	-	-	-
Y. enterocolitica Y11^{T}		++	++	-	+++	-	+	-	-	-	-	-
Y. kristensenii Y110^{T}		++	++	-	+++	-	+	-	-	-	-	+
Y. aleksiciae Y159^{T}		++	++	+	+++	-	+	-	-	-	-	+
“Y. similis” Y228^{T}		++	++	-	+++	-	+	-	-	-	-	-
Y. ruckeri Y81^{T}		++	++	-	+++	+	+	+	-	-	-	+
Y. ruckeri SP5		++	++	-	+++	+	+	+	-	-	-	+
Y. ruckeri Bc74		++	++	-	+++	-	+	-	+	-	-	+
Y. ruckeri 82/B		++	++	-	+++	-	+	-	+	-	-	+
Y. ruckeri 0/1/99		++	++	-	+++	+	+	+	-	-	-	+
Y. ruckeri 115/00		++	++	-	+++	+	+	+	-	-	-	+
Y. ruckeri 129/86		++	++	-	+++	+	+	+	-	-	-	+
Y. ruckeri Y81^{T}	Neue Extraktionen	++	++	-	+++	+	+	+	-	+	+	-
Y. ruckeri Bc74		++	++	-	+++	-	-	-	+	+	+	-
Y. ruckeri 82/B		++	++	-	+++	-	-	-	+	+	+	-

3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Zur Bestimmung des Verwandtschaftsverhältnisses von *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ zu *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* auf genomischer Ebene wurden DNA-DNA Hybridisierungen und eine Bestimmung des G+C Verhältnisses durchgeführt. Alle *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämme (Y716, Y718, Y722) wurden dabei mit dem *Y. pseudotuberculosis* Typstamm $Y111^T$ hybridisiert. Zur Kontrolle wurde auch eine reverse Hybridisierung durchgeführt, bei der Y718 mit dem Typstamm $Y111^T$ sowie den beiden anderen „pseudopest“ Isolaten hybridisiert wurde.

Die Extraktion der DNA für die molekularbiologischen Experimente erfolgte anfangs mit dem PrestoSpin D Bug Mini Spin Säulen DNA-Reinigungs Kit (Molzym). Da mit dieser Methode zu stark gescherte DNA gewonnen wurde, die damit für Hybridisierungen nicht zu verwenden war, wurde in weiterer Folge die DNA-Extraktion nach der Methode von Pitcher durchgeführt (Pitcher et al., 1989). Mit dieser DNA-Extraktionsmethode konnte sowohl hochmolekulare wie auch ausreichend saubere, d.h. frei von Verunreinigungen durch RNA und Proteine, DNA in großen Mengen gewonnen werden.

Da für die Berechnung der Schmelztemperatur (Tm) der G+C Gehalt der zu hybridisierenden Bakterienstämme benötigt wurde, sollte eine Bestimmung des G+C Verhältnisses der Stämme *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$, *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Y716, Y718 und Y722 sowie als Referenz von Phage Lambda DNA (Segenetic) durchgeführt werden.
Anfangs wurde für den Verdau, anders als im Methodenteil beschrieben, in Wasser gelöste DNA eingesetzt. Da von früheren Anwendungen dieser Methode bekannt war, dass der Verdau der DNA zu Nukleosiden nicht einwandfrei funktionierte, wurde das Protokoll verschieden modifiziert. Es wurde getestet die Dephosphorylierung der DNA durch Variation der Länge des Phosphataseverdaus (2, 3 bzw. 4 h), durch unterschiedliche DNA Mengen (ca. 1, 0.5 bzw. 0.06 µg/µl) bzw. durch Einsatz von erhöhten Mengen des Glycinpuffers bzw. des Enzyms alkalische Phosphatase zu verbessern. Keiner dieser Ansätze führte bei den *Yersinia* Stämmen zu einem zufrieden stellenden Ergebnis. Der Verdau mit alkalischer Phosphatase funktionierte nur teilweise, sodass hauptsächlich Nukleotide und nur geringe Anteile der Nukleoside detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte die Phage Lambda DNA vollständig

dephosphoryliert werden. Phage Lambda DNA war anders wie die *Yersinia* DNA in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 gelöst, was möglicherweise begünstigend auf den Verdau wirkte. Aber trotz der Anpassung der Bedingungen der *Yersinia* DNAs, war keine Verbesserung des Verdaues feststellbar.
Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die alkalische Phosphatase beim Verdau der *Yersinia* DNAs inhibiert wurde. Die Ursache für die Hemmung der Enzymaktivität konnte nicht festgestellt werden.
Durch den unvollständigen Verdau der DNA war eine Bestimmung des G+C Verhältnisses der *Yersinia* Stämme nicht möglich. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der Schmelztemperatur der G+C Gehalt von *Y. pseudotuberculosis* IP32953, der 47.55 mol% beträgt, herangezogen. Bei diesem Stamm handelt es sich um das, zum Zeitpunkt der Durchführung des Experiments, einzig sequenzierte Genom von *Y. pseudotuberculosis*.

Für die ersten Hybridisierungen wurden die einzusetzenden DNA-Mengen basierend auf den Konzentrationen, die durch photometrische Messung erhalten wurden, berechnet. Dabei wurden bei Hybridisierung von $Y111^T$ (markierte DNA) mit den „pseudopest“ Isolaten Y716, Y718 und Y722 zu hohe Ähnlichkeitswerte (zwischen 125 und 170 %) ermittelt. Die reverse Hybridisierung von Y718 (markierter DNA) mit $Y111^T$ ergab dagegen einen weitaus niedrigeren Wert von 78 % (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch diese Ergebnisse kamen Zweifel an der Richtigkeit der auf den photometrischen Messungen basierenden eingesetzten DNA-Mengen auf.
Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einem Photometer. Um sicherzustellen ob möglicherweise die Messung mit dem Photometer ungenaue Ergebnisse lieferte, wurde eine chemische Konzentrationsbestimmung der DNA durchgeführt. Obwohl, basierend auf der photometrischen Messung, dieselben DNA-Mengen eingesetzt wurden, wichen die Absorptionswerte der DNA-Lösungen stark voneinander ab. So ergab beispielsweise die Messung für die DNA von *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$ eine OD_{600} von 0.025, im Gegensatz zu einer OD_{600} von 0.043 für die DNA von *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Y716. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels photometrischer Messung ungenaue bzw. falsche Werte lieferte. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass in der DNA-Lösung ein hoher Anteil von Nukleotiden vorhanden war, der bei der photometrischen Messung die Werte

verfälschte. Jedenfalls erklärt die um den Faktor 7 höhere DNA-Konzentration die Ähnlichkeitswerte, die über 100 % hinausgehen. Für die Berechnung der für die Hybridisierung einzusetzenden DNA-Menge wurde aus diesem Grund im weiteren Verlauf der Hybridisierungsexperimente das Ergebnis der chemischen Konzentrationsbestimmung zugrunde gelegt.

Dafür wurden die Absorptionswerte, die bei der chemischen Konzentrationsbestimmung erhalten wurden, sowie die für die chemische Bestimmung eingesetzte Menge (in µl) von zwei DNAs, die gegeneinander hybridisiert werden sollten, dividiert. Diese zwei Werte wurden ebenfalls dividiert (Absorption / Menge) um einen Korrekturfaktor zur Ausgleichung der unterschiedlich stark konzentrierten DNA-Lösungen zu berechnen. Bei einer Absorption bei 600 nm von 0.0312 für $Y111^T$ und 0.0533 für Y716 ergibt sich das Verhältnis 1.71, die eingesetzten Mengen von 1.02 µl bzw. 1.18 µl ergeben 1.157. Dividiert man nun den ersten Wert durch den zweiten erhält man den Korrekturfaktor 1.48, d. h. es muss 1.48 x mehr DNA von $Y111^T$ eingesetzt werden wie DNA von Y716.

DNA-DNA Hybridisierungen, die unter Berücksichtigung der chemischen DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt wurden, ergaben Ähnlichkeitswerte von 82, 93 und 83 % für *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$ (markierte DNA) und *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Y716, Y718 bzw. Y722 (Tabelle 3.4). Bei der reversen Hybridisierung von Y718 (markierte DNA) mit $Y111^T$ lag der Wert bei 76 %, die genomische Ähnlichkeit von Y718 mit den beiden anderen *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämmen war mit 101 bzw. 119 % etwas höher (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierungen von *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$ und den *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämmen Y716, Y718, Y722. Die Werte geben das relative Bindungsverhältnis („relative binding ratio“ RBR), d.h. die Ähnlichkeit der DNA der hybridisierten Stämme in Prozent an. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung der Duplikate an.

Stamm	**$Y111^T$**	**Y716**	**Y718**	**Y722**
Y. pseudotuberculosis $Y111^T$	-	82 (2,43)	93 (1,61)	83 (0,05)
Y. pseudotuberculosis „pseudopest“ Y718	76 (0,86)	101 (3,80)	-	119 (9,78)

Ursprünglich sollten die *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ Stämme zur Abklärung des Verwandtschaftsgrades auch gegen alle vorhandenen *Y. pestis* Stämme hybridisiert werden. Leider gelang es nicht aus den gelieferten, abgetöteten Biomassen der *Y. pestis* Isolate mit der angewendeten Methode DNA zu extrahieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich die Biomassen weder in PBS noch in der Lysozymlösung resuspendieren ließen. Aus einem Stamm, *Y. pestis* Y784, konnte zwar DNA extrahiert werden und auch durch photometrische Messung nachgewiesen werden, aber bei Überprüfung der DNA auf einem 1.7 % Agarosegel konnte keine Bande detektiert werden. Ebenso funktionierte die Markierung dieser DNA nicht. Das lässt darauf schließen, dass aus diesem Zellmaterial nur die Extraktion von niedermolekularer DNA möglich war.

3.3 Chemotaxonomische Charakterisierung von *Y. ruckeri*

Die sechs *Y. ruckeri* Isolate SP5, Bc74, 82/B, 0/1/99, 115/00 und 129/86 wurden im Vorfeld der Experimente mit dem Typstamm *Y. ruckeri* $Y81^T$ verglichen um die vorangegangene Identifizierung der Isolate zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene genomische Fingerprints erstellt sowie eine Analyse der Gesamtzellproteine durchgeführt.

Alle *Y. ruckeri* Stämme zeigten in allen angewendeten Fingerprinting-Methoden nahezu identische Bandenmuster (Fig. 3.7. A-D). Interessanterweise wiesen aber die beiden Isolate Bc74 und 82/B in allen genomischen Fingerprints zusätzliche oder von den anderen *Y. ruckeri* leicht abweichende Banden auf, die aber bei diesen zwei Stämmen immer vollständig übereinstimmten. Bei den durch ERIC-PCR generierten Fingerprints unterschied sich neben den Stämmen Bc74 und 82/B auch der Typstamm $Y81^T$ geringfügig von den vier restlichen *Y. ruckeri* Isolaten (Fig. 3.7 B). Ansonsten waren die genomischen Fingerprints des Typstammes und der vier Isolate SP5, 0/1/99, 115/00 sowie 129/86 identisch, was auf eine enge Verwandtschaft schließen lässt.

Ferner ergab die Analyse der Gesamtzellproteine für alle *Y. ruckeri* Stämme ein Bandenmuster, das keine qualitativen Unterschiede erkennen ließ (Fig. 3.8). In einigen Fällen erschien der relative Anteil bestimmter Banden variabel zu sein.

Durch die Ergebnisse der genomischen Fingerprints sowie der Gesamtzellproteine konnte die Identifizierung der Isolate SP5, Bc74, 82/B, 0/1/99, 115/00 und 129/86 als *Y. ruckeri* eindeutig bestätigt werden.

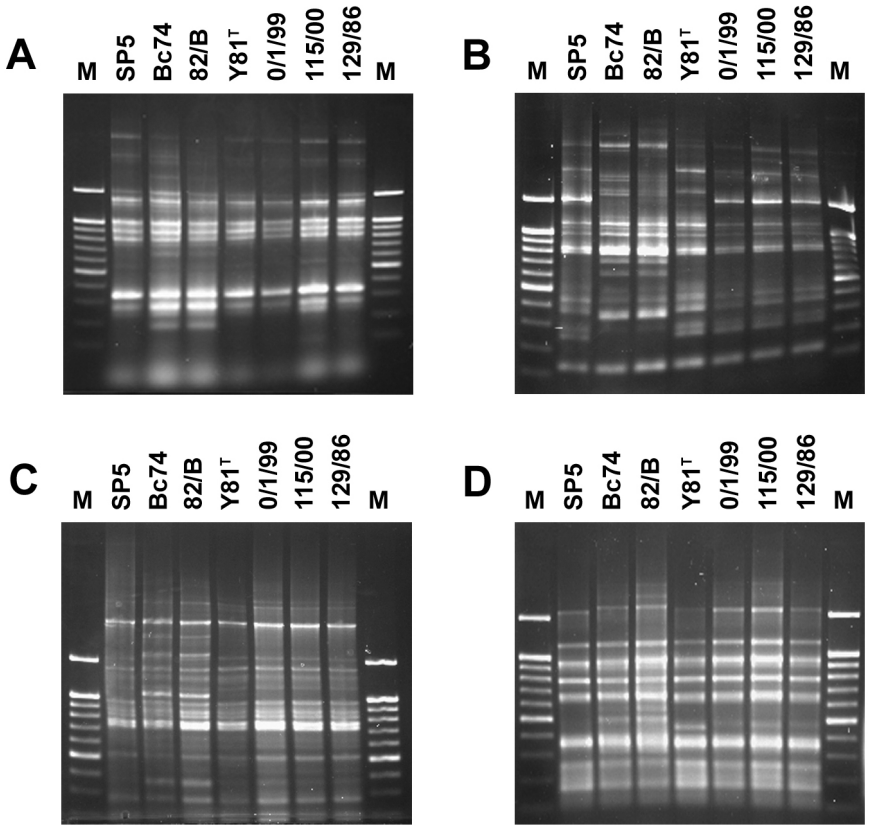


Fig. 3.7 Genomisches Fingerprinting der *Y. ruckeri* Stämme entstanden durch **(A)** BOX-PCR, **(B)** ERIC-PCR, **(C)** REP-PCR und **(D)** RAPD-PCR mit RAPD5. M, Marker (100 Bp + 1,5 Kb DNA Ladder).

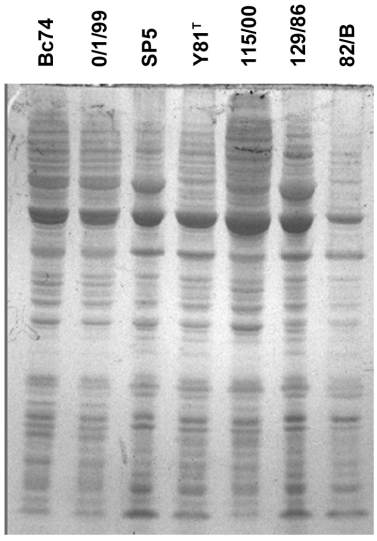


Fig. 3.8 Analyse der Gesamtzellproteine aller *Y. ruckeri* Isolate sowie des Typstamms $Y81^T$ mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung.

3.3.1 Physiologische und biochemische Untersuchungen

Zur physiologischen Charakterisierung wurden der tolerierte Temperaturbereich sowie die Toleranz der *Y. ruckeri* Stämme gegenüber Salinität (NaCl) bestimmt. Alle *Yersinia* Typstämme wuchsen auf 3.3x PYE bei Temperaturen von 4°C, 15°C, 22°C, 28°C und 37°C, bei 43°C konnte dagegen kein Wachstum festgestellt werden. Alle Spezies tolerierten weiters einen Salzgehalt von bis zu 2.5 %, *Y. enterocolitica* $Y11^T$ und *Y. aleksiciae* $Y159^T$ zeigten auch bei 5 % NaCl noch Wachstum. Bei einem Salzgehalt von 7.5 bzw. 10 % NaCl war bei keinem der Stämme Wachstum zu beobachten (Tabelle 3.5). Diese Ergebnisse stimmten überein mit den Charakteristiken von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* (Bottone et al., 2001).
Die Fähigkeit der *Y. ruckeri* Isolate zur Hämolyse auf Blutagar wurde bei sowohl 18°C als auch 28°C untersucht. In beiden Fällen wurde keine Hämolyse beobachtet.

Zur biochemischen Charakterisierung der *Y. ruckeri* Isolate wurde die Fähigkeit zur Säureproduktion aus verschiedenen Zuckern und Aminosäuren in Phenolrotbouillon bestimmt. Diese Kohlenstoffquellen wurden basierend auf Angaben zur biochemischen Charakteristik von *Y. ruckeri* ausgewählt (Bottone et al., 2001) und sowohl bei 18°C als auch 28°C untersucht. Es zeigten sich einheitlich positive Ergebnisse für die Säureproduktion aus Glycerin, L-Lysin, Ornithin, D-Glucose, Maltose, D-Mannitol, D-Mannose sowie Trehalose bei allen Stämmen. Dabei war zu beobachten, dass die Säureproduktion aus L-Lysin und Ornithin unter anaeroben Bedingungen stattfand. Das heißt ein Umschlag der Mediumfarbe nach gelb konnte nur im unteren Teil der Eprouvette festgestellt werden, während im aeroben Bereich alkalische Bedingungen, angezeigt durch eine intensiv rote Farbe des Mediums, herrschten. Die *Y. ruckeri* Isolate SP5, 0/1/99 und der Typstamm $Y81^T$ zeigten für D-Sorbitol keine Säurebildung. Eine Ausnahme dazu stellten allerdings die Isolate Bc74 und 82/B dar, die bei beiden Inkubationstemperaturen eine positive Reaktion zeigten, sowie die Isolate 115/00 und 129/86, die bei 28°C zur Fermentation von D-Sorbitol fähig waren (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.5 Wachstum aller *Yersinia* Typstämme bei verschiedenen Temperaturen und NaCl-Konzentrationen auf 3.3xPYE.

	Temperatur						NaCl				
Stamm	**4°C**	**15°C**	**22°C**	**28°C**	**37°C**	**43°C**	**1%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**
Y. enterocolitica (Y11^T)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Y. ruckeri (Y81^T)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Y. kristensenii (Y110^T)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Y. pseudotuberculosis (Y111^T)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Y. aleksiciae (Y159^T)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
„*Y. similis*“ (Y228^T)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Tabelle 3.6 Biochemische Charakteristika aller untersuchten *Y. ruckeri* Stämme bei 18°C bzw. 28°C.

Stamm	**Glycerin**	**L-Lysin**	**Ornithin**	**D-Glucose**	**Maltose**	**D-Mannitol**	**D-Mannose**	**D-Sorbitol**	**Trehalose**
Y81^T	+ / +	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	+ / +
SP5	+ /+	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	+ / +
Bc74	+ / +	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
82/B	+ / +	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
0/1/99	+ / +	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	+ / +
115/00	+ / +	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / +	+ / +
129/86	+ /+	+[1] / +[1]	+[1] / +[1]	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / +[1]	+ / +

[1], unter anaeroben Bedingungen.

3.3.2 Chemotaxonomische Untersuchungen

Die Chinonanalyse von *Y. ruckeri* Y81^T ergab keinen Unterschied zu den anderen *Yersinia* Spezies. Alle untersuchten *Yersinia* Stämme enthielten Ubichinon Q-8 als Hauptkomponente und geringe Anteile von Ubichinon Q-9 und Menachinon MK-8 (Tabelle 3.2).

Bei der Analyse der polaren Lipide wurde in allen Stämmen Phosphatidylethanolamin als Hauptkomponente detektiert. Ebenso waren in allen *Yersinia* Spezies moderate Anteile von Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin sowie geringe Anteile des unbekannten Aminolipids APL1 zu finden (Tabelle 3.3). Die vier *Y. ruckeri* Isolate SP5, 0/1/99, 115/00, 129/86 unterschieden sich gemeinsam mit dem Typstamm Y81^T durch das Vorkommen des unbekannten Phospholipids PL1 sowie des unbekannten Aminophospholipids APL2 von den restlichen *Yersinia* Typstämmen (Fig. 3.9 A und B). Interessanterweise konnten diese Lipide bei den Isolaten Bc74 und 82/B nicht nachgewiesen werden, stattdessen war der Nachweis des unbekannten Aminolipids AL1 möglich (Fig. 3.9 C). Durch das Fehlen von PL1 und APL2 sowie die Anwesenheit von AL1 konnten diese zwei Isolate somit von den restlichen *Y. ruckeri* differenziert werden. Zusätzlich wiesen alle *Y. ruckeri* Stämme das unbekannte Lipid L1 auf, das aber ebenso bei den Typstämmen von *Y. aleksiciae* und *Y. kristensenii* detektiert werden konnte.
Um die Unterschiede zu reproduzieren, die innerhalb der *Y. ruckeri* Stämme beobachtbar waren, wurden von den Stämmen Y81^T, Bc74 und 82/B neue Lipidextraktionen und -analysen durchgeführt. Dabei konnte das bereits beschriebene Lipidmuster in allen Stämmen erneut beobachtet werden, zusätzlich wurden aber noch zwei neue unbekannte Aminolipide nachgewiesen, die bereits auch bei allen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen (AL2) und den „pseudopest“ Isolaten (AL3) nachgewiesen wurden (Tabelle 3.3). Weiters konnte APL1 nur schwach detektiert werden, bei den Isolaten Bc74 und 82/B fehlte es vollständig. Genauso war das unbekannte Lipid L1 in keinem der Stämme vorhanden (Fig. 3.9 D und E). Eine Differenzierung der *Y. ruckeri* Stämme Bc74 und 82/B von den restlichen *Y. ruckeri* Stämmen war aber wiederum durch das Fehlen von PL1 und APL2 sowie durch den Nachweis von AL1 möglich.

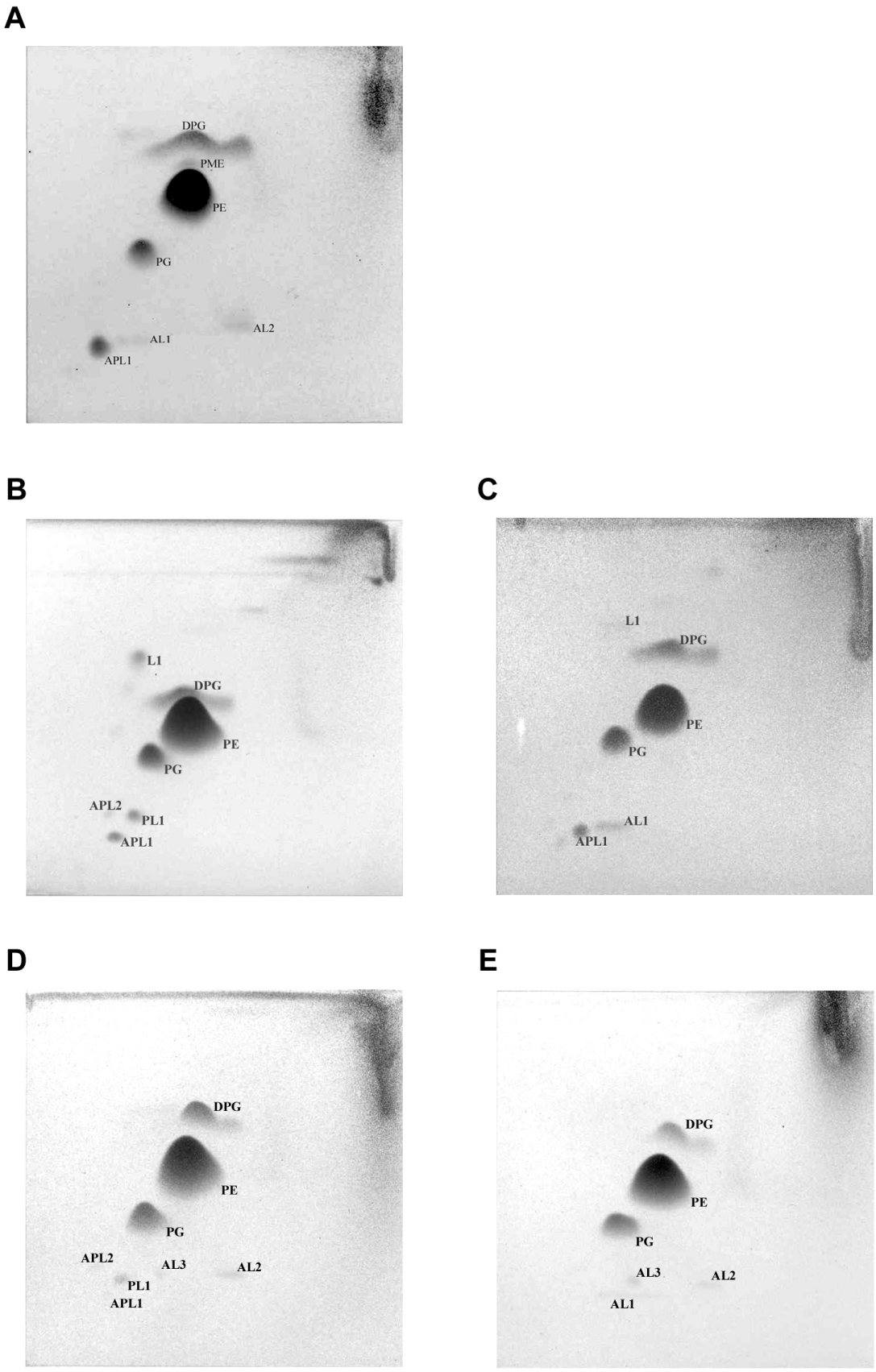


Fig. 3.9 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide der Stämme **(A)** *Y. pseudotuberculosis* Y111^{T}, **(B)** *Y. ruckeri* 129/86, **(C)** *Y. ruckeri* 82/B, **(D)** *Y. ruckeri* Y81^{T} neue Extraktion und **(E)** *Y. ruckeri* 82/B neue Extraktion. Abkürzungen siehe Tabelle 3.3.

Das Polyaminmuster der *Y. ruckeri* Isolate enthielt Putrescin und Cadaverin als Hauptkomponenten sowie moderate Anteile von 1,3-Diaminopropan und geringe Anteile von Spermidin und Spermin. Im Gegensatz dazu wiesen die anderen *Yersinia* Spezies Putrescin als dominierende Hauptkomponente auf, mit geringen Anteilen von Cadaverin, Spermidin und Spermin. 1,3-Diaminopropan konnte nur in Spuren detektiert werden (Tabelle 3.7). *Y. pestis* Y784 enthielt ebenso Putrescin als Hauptkomponente und moderate Anteile von Spermidin. Die Extraktion und Analyse der Polyamine von *Y. pestis* Y784 erfolgte aus Aceton-abgetöteter Biomasse, die von Hr. Dr. Scholz zur Verfügung gestellt worden war und die im Gegensatz zu den anderen Stämmen nicht bei 70 % der maximalen OD_{600} geerntet worden war. Daher war eine Bestimmung des Trockenmassegewichtes nicht möglich, wodurch nur die Angabe der relativen Anteile erfolgen konnte.

Tabelle 3.7 Verteilung der Polyamine in allen *Y. ruckeri* Isolaten sowie allen untersuchten *Yersinia* Typstämmen und *Y. pestis* Y784. Die Extraktion erfolgte aus Biomasse, die bei ca. 70 % der maximal erreichbaren OD_{600} geerntet wurde. Werte sind in µmol/g Trockengewicht angegeben, die Werte in Klammern entsprechen den Anteilen in Prozent. DAP, 1,3-Diaminopropan; PUT, Putrescin; CAD, Cadaverin; SPD, Spermidin; SPM, Spermin, t, in Spuren vorhanden.

Stämme	**DAP**	**PUT**	**CAD**	**SPD**	**SPM**
Y. ruckeri Y81^T	11,4 (15,3)	28,5 (38,1)	32,8 (43,9)	0,5 (0,7)	1,5 (2,0)
Y. ruckeri SP5	8,7 (9,3)	46,5 (49,3)	35,1 (37,2)	2,0 (2,1)	2,1 (2,2)
Y. ruckeri Bc74	12,6 (15,8)	35,8 (44,8)	29,5 (36,9)	1,7 (2,2)	0,3 (0,4)
Y. ruckeri 82/B	6,7 (7,8)	38,6 (45,2)	38,7 (45,3)	1,1 (1,2)	0,4 (0,4)
Y. ruckeri 0/1/99	8,3 (8,8)	50,2 (53,5)	31,3 (33,3)	2,2 (2,3)	1,9 (2,0)
Y. ruckeri 115/00	6,4 (7,7)	47,5 (56,8)	26,3 (31,4)	1,8 (2,2)	1,7 (2,0)
Y. ruckeri 129/86	12,4 (14,6)	37,8 (44,5)	30,6 (36,0)	2,2 (2,6)	2,0 (2,3)
Y. enterocolitica Y11^T	t	61,0 (94,5)	2,1 (3,3)	1,2 (1,9)	0,2 (0,3)
Y. kristensenii Y110^T	t	104,8 (84,3)	1,4 (1,1)	11,9 (9,6)	6,2 (5,0)
Y. pseudotuberculosis Y111^T	t	79,7 (87,1)	-	11,6 (12,6)	0,3 (0,3)
Y. aleksiciae Y159^T	t	62,5 (92,5)	2,7 (3,9)	2,0 (2,9)	0,5 (0,7)
„Y. similis“ Y228^T	t	61,8 (90,8)	-	5,3 (7,7)	1,0 (1,4)
Y. pestis Y784	-	(82,1)	-	(17.6)	-

Zur Beurteilung der Abhängigkeit des Polyaminmusters vom Zeitpunkt der Biomasseernte wurden Polyaminextraktionen aus Biomassen der Stämme *Y. enterocolitica* Y11^T und *Y. ruckeri* Y81^T durchgeführt, die in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet wurden. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich bei *Y. ruckeri* die relativen Anteile der verschiedenen Polyamine in Abhängigkeit von der Wachstumsphase signifikant änderten (Tabelle 3.8). Während Putrescin durchgehend in hohen Anteilen vorhanden war, wurden die Anteile an 1,3-Diaminopropan und Cadaverin während des Wachstums anscheinend ausgetauscht. Das in der frühstationären Phase in großen Mengen vorhandene 1,3-Diaminopropan reduzierte sich bei später genommenen Proben, während die Anteile von Cadaverin im Verlauf der Wachstumsphase zunahmen (Fig. 3.10 A). Bei *Y. enterocolitica* Y11^T zeigten sich solch dramatische Veränderungen nicht, obwohl auch hier eine geringe Abnahme der Putrescin-Anteile sowie ein Anstieg der Cadaverin-Anteile von ungefähr 3 auf knapp 14 % zu beobachten waren (Fig. 3.10 B).

Tabelle 3.8 Verteilung der Polyamine in *Y. enterocolitica* Y11^T und *Y. ruckeri* Y81^T in verschiedenen Phasen des Wachstums. Wachstum erfolgte bei 28°C. Abkürzungen siehe Tabelle 3.7.

Stamm	OD_{600}	DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
Y. enterocolitica Y11^T	*1,0*	-	72,5 (94,3)	2,4 (3,1)	1,9 (2,4)	0,2 (0,3)
	2,0	-	61,0 (94,5)	2,1 (3,3)	1,2 (1,9)	0,2 (0,3)
	3,0	-	77,9 (88,7)	8,6 (9,8)	1,1 (1,2)	0,3 (0,3)
	3,2	0,5 (0,7)	64,0 (85,4)	8,2 (11,0)	1,8 (2,4)	0,5 (0,6)
	*stat.**	-	57,5 (83,9)	9,5 (13,9)	1,3 (1,9)	0,3 (0,4)
Y. ruckeri Y81^T	*1,3*	54,8 (47,9)	48,8 (42,6)	7,3 (6,4)	1,1 (1,0)	2,4 (2,1)
	1,5	38,2 (41,2)	38,6 (41,6)	13,4 (14,5)	0,5 (0,6)	2,0 (2,1)
	2,0	27,7 (35,6)	28,8 (37,1)	18,1 (23,3)	0,9 (1,2)	2,2 (2,9)
	3,0	11,4 (15,3)	28,5 (38,1)	32,8 (43,9)	0,5 (0,7)	1,5 (2,0)
	3,4	7,7 (10,2)	28,3 (37,4)	37,9 (50,1)	0,3 (0,4)	1,4 (1,9)
	3,7	3,6 (4,0)	38,9 (44,0)	43,3 (49,0)	1,0 (1,1)	1,6 (1,8)
	4,5	3,0 (2,7)	46,9 (42,1)	57,9 (52,0)	1,9 (1,7)	1,7 (1,5)

*, Biomasse wurde in stationärer Phase geerntet.

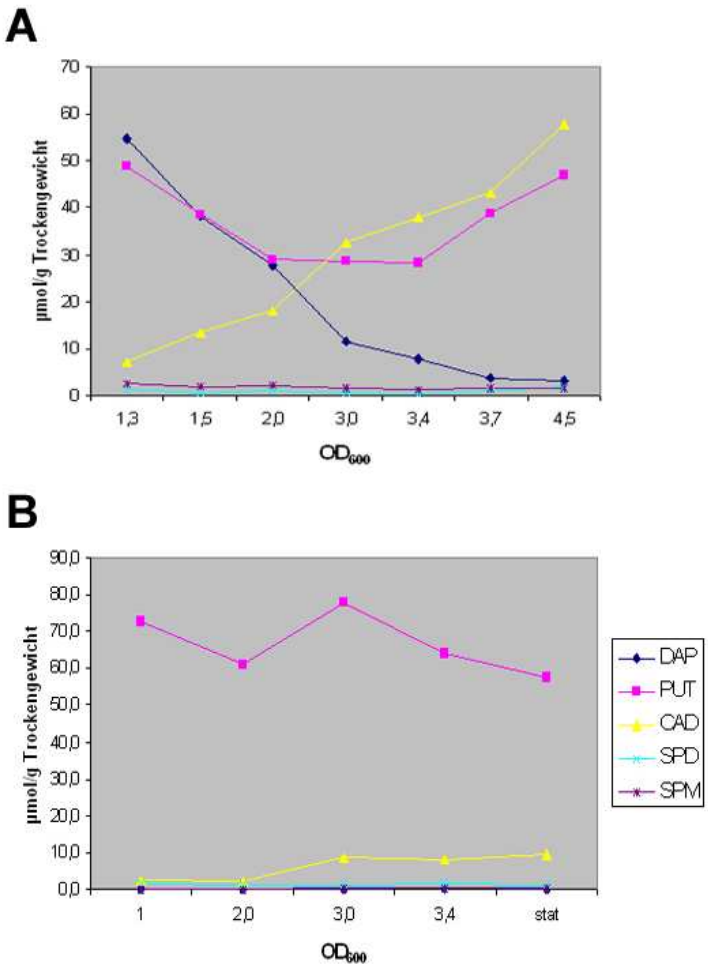


Fig. 3.10 Anteile der verschiedenen Polyamine im Verlauf der Wachstumsphase von **(A)** *Y. ruckeri* Y81^T und **(B)** *Y. enterocolitica* Y11^T. Abkürzungen siehe Tabelle 3.7.

Durch Vergleich der Gesamtzellproteine der beiden Stämme wurde versucht festzustellen, ob diese Unterschiede auch in der Proteinexpression sichtbar sind. Dafür wurden aus Biomasse, die in der früh- bzw. spätstationären Wachstumsphase geerntet wurde, Proteine extrahiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Es waren bei beiden *Yersinia* Spezies geringe Unterschiede der Proteinexpression in den verschiedenen Wachstumsphasen zu beobachten (Fig. 3.11). Ob diese aber in direkter Beziehung zur Veränderung der Polyaminanteile stehen bleibt offen.

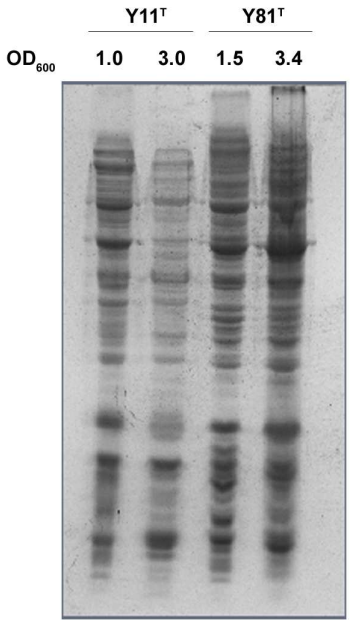


Fig. 3.11 Analyse der Gesamtzellproteine von *Y. enterocolitica* $Y11^T$ und *Y. ruckeri* $Y81^T$. Die Proteinextraktion erfolgte aus Biomasse, die in der frühlogarithmischen bzw. spätlogarithmischen Wachstumsphase bei der angegebenen OD_{600} geerntet wurde.

3.4 Mitwirkung an der Beschreibung von *Y. similis* sp. nov.

Sprague et al. untersuchten einige Isolate, die aufgrund von phänotypischen Merkmalen der Spezies *Y. pseudotuberculosis* zugeordnet waren, in der 16S rRNA Sequenz aber Unterschiede zu anderen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen zeigten. Um festzustellen ob es sich dabei um eine neue Spezies handelt, wurde mit diesen Isolaten eine Analyse der 16S rRNA Sequenz, DNA-DNA Hybridisierung, Bestimmung der DNA Zusammensetzung sowie weitere phänotypische Charakterisierungen durchgeführt. Die chemotaxonomische Analyse der Polyamine, Chinone und polaren Lipide des Typstamms *Y. „similis“* Y228^{T} wurde dabei im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt. Das Polyaminmuster mit Putrescin als Hauptkomponente und moderaten Anteilen von 1,3-Diaminopropan und Spermin sowie das Chinonsystem, das überwiegend aus Ubichinon Q-8, geringen Anteilen von Ubichinon Q-9 und Menachinon MK-8 besteht, bestätigten die Zugehörigkeit zum Genus *Yersinia*. Y228^{T} zeigte im Profil der polaren Lipide die gleichen Charakteristika wie die anderen *Yersinia* Spezies (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin), unterschied sich aber von *Y. pseudotuberculosis* Y111^{T} durch das Fehlen von Phosphatidylmonomethylethanolamin und zwei unbekannten Aminolipiden.

Aufgrund der Summe aller Ergebnisse, die in einem Manuskript zusammengefasst wurden (s. Anhang), wird die neue Art *Yersinia similis* vorgeschlagen. Dieses Manuskript wurde inzwischen nach Vorgabe der Gutachter überarbeitet und wird nach endgültiger Akzeptierung in „International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology“ unter dem Titel „*Yersinia similis* sp. nov.“ veröffentlicht werden.

4 DISKUSSION

4.1 Identifizierung und Differenzierung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* mittels PCR

Eine schnelle und hochspezifische Identifizierung von Pathogenen im Falle eines Krankheitsausbruchs ist notwendig um eine adäquate Behandlung zu gewährleisten. Vor allem im Falle eines bioterroristischen Angriffs ist eine zuverlässige und möglichst rasch durchzuführende Bestimmung des Erregers unerlässlich, auch um eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Zur Erreichung dieser Anforderungen erscheinen spezifische PCR-Methoden besonders viel versprechend zu sein.

Mehrere PCR-Techniken zur schnellen und zuverlässigen Detektion von *Y. pestis* wurden bereits entwickelt. Es wurden PCRs zum Nachweis des Gens für den Plasminogenaktivator (*pla*) beschrieben (Campbell et al., 1993; Hinnebusch and Schwan, 1993), sowie eine Kombination von vier PCRs, die auf drei Plasmid-kodierten Genen (*caf1, pla, lcrV*) und dem chromosomalen 16S rRNA Gen basieren (Neubauer et al., 2000). Eine PCR, die ebenfalls das *caf1* Gens nachweist, zeigte eine zu geringe Sensitivität (Rahalison et al., 2000). Eine mit fluorogenen Sonden gekoppelte PCR, die gegen das auf einem Virulenzplasmid lokalisierte Pesticin Gen (*pst*) gerichtet ist, wurde 2000 beschrieben (Iqbal et al., 2000). Radnedge et al. (2001) entwickelten Primer basierend auf einem 41.7 Kb langen, *Y. pestis* spezifischen Genomabschnitt. Die Entdeckung von einzigartigen DNA-Abschnitten in chromosomalen Regionen von *Y. pestis*, so genannten Signaturgenen, bildet die Grundlage für drei Primerpaare zur spezifischen Identifikation des Erregers (Zhou et al., 2004a). Weiters wurden Multiplex-PCRs zur Identifizierung von Genen, die auf den drei Virulenzplasmiden wie auch auf der chromosomalen DNA codiert sind, beschrieben. Die Detektion von *Y. pestis* basiert dabei auf den Plasmid-kodierten Genen *caf1*, *yopM*, *pla* und dem chromosomalen Gen *inv* (Tsukano et al., 1996) bzw. auf *caf1*, *lcrV*, *pla* sowie *irp2*, das auf der chromosomalen Pathogenitätsinsel kodiert ist (Leal and Almeida, 1999). Neben den herkömmlichen PCR-Techniken wurden auch einige Real-time PCR (RT-PCR) Methoden zur Detektion des *pla* Gens entwickelt (Higgins et al., 1998; Loiez et al., 2003). Chase et al. (2005) entwickelten eine RT-PCR basierend auf einer 25 Bp Insertion im chromosomalen Gen *yp48* von *Y. pseudotuberculosis*, die in *Y. pestis* fehlt.

Die erste Beschreibung einer Multiplex RT-PCR zur spezifischen Identifizierung von *Y. pestis*, mit der gleichzeitig die Detektion der Plasmid-kodierten Gene *pla*, *caf1* und *ymt* sowie des chromosomalen 16S rRNA Gens möglich ist, erfolgte 2003 (Tomaso et al., 2003), wobei zwei Multiplex-Assays zum Nachweis von jeweils zwei der angeführten Gene kombiniert wurden. Eine „4-target multiplex RT-PCR", mit der die Detektion von drei auf den Virulenzplasmiden liegenden Genen (*pla, caf1*, eine Region auf pCD1) und eines chromosomalen Zielgens (*entF*) möglich ist, wurde vor kurzem beschrieben (Woron et al., 2006). Kürzlich wurde zudem eine RT-PCR Methoden veröffentlicht, mit der die gleichzeitige Detektion von *Bacillus anthracis, Francisella tularensis* und *Y. pestis* möglich ist (Skottman et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Vergleich von genomischen Fingerprints spezifische Sequenzabschnitte in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* identifiziert um basierend auf diesen PCR-Methoden zur Identifizierung von *Y. pestis* zu entwickeln.
Eine Deletion im Genom von *Y. pseudotuberculosis* wurde zur Entwicklung der zwei Primerpaaren Y_pseudo_spec f/r und Y_pestis_spec f/r verwendet, mit denen durch Nachweis spezifischer PCR-Produkte in der Größe von 490 Bp bzw. 850 Bp Stämme der Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* eindeutig detektiert werden konnten (Fig. 3.1). Zusätzlich ermöglichte das Primerpaar Y_pseudo_spec f/r die Differenzierung der „pseudopest" Isolate von den *Y. pseudotuberculosis* Stämme durch ein PCR-Produkt bei ca. 1.5 Kb (Fig. 3.1 C). Bei zwei der Referenzstämme, *Y. aleksiciae* und *Y. kristensenii*, wurden bei PCR mit diesem Primerpaar ebenfalls Banden detektiert, die aber aufgrund ihrer Größe die Identifizierung von *Y. pseudotuberculosis* und den „pseudopest" Isolaten nicht beeinträchtigten.
Die Differenzierung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* in nur einer PCR durch Banden bei 214 bzw. 488 Bp war mit dem Primerpaar Y_pest_pseudo f/r möglich, das basierend auf einer 255 Bp langen Deletion im Genom von *Y. pestis* CO92 entwickelt wurde (Fig. 3.2 B und C). Ein weiteres Primerpaar, Y_pseudo f/r, zum PCR-Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* durch ein Produkt bei ca. 600 Bp wurde ebenfalls aufgrund dieser Deletion entworfen (Fig. 3.2 D). Mit beiden Primerpaaren ergaben sich aber auch falsch positive Resultate durch Amplifizierung der PCR-Produkte bei Typstämmen anderer *Yersinia* Spezies.
PCR mit einem Primerpaar, das auf einer für das Biovar Pestoides spezifischen Sequenz basierte, ermöglichte nicht wie erwartet die Differenzierung des atypischen Pestoides

Stammes von den Stämmen der anderen *Y. pestis* Biovaren. Stattdessen wurde das PCR-Produkt sowohl in allen *Y. pestis* Stämmen als auch in den restlichen *Yersinia* Spezies amplifiziert und ergab zudem nur eine sehr schwach sichtbare Bande (Fig. 3.3). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es sich bei der vermeintlich Pestoides-spezifischen Sequenz um einen Genomabschnitt handeln muss, der in allen Spezies des Genus *Yersinia* verbreitet ist. Aus diesem Grund handelte es sich bei der anscheinend spezifischen Bande, die durch PCR mit RAPD2b Primer beim Pestoides Stamm gefunden wurde, wohl um ein Zufallsprodukt. Die Suche nach geeigneten Genomabschnitten zur Entwicklung einer Biovar Pestoides spezifischen Unterscheidung gestaltete sich generell sehr schwierig, da diese eine genetisch diverse Gruppe bilden, deren Stämme sowohl zum Biovar Antiqua als auch zum Biovar Medievalis zugeordnet werden können oder erst gar nicht typisierbar sind (Adair et al., 2000; Motin et al., 2002; Radnedge et al., 2002). Stämme dieser atypischen Gruppe wurden in Gebieten der früheren UdSSR gefunden und sind im Unterschied zu den klassischen Biovaren zur Fermentation von Rhamnose und Melibiose fähig (Achtman et al., 2004). Weiters besitzen Pestoides Stämme häufig einzigartige Plasmidprofile (Filippov et al., 1990). Bei der Untersuchung eines VNTR (Variable-Number Tandem Repeat), der im Genom von *Y. pestis* identifiziert worden war, wurde bei Pestoides Stämmen eine große Diversität basierend auf dem Nachweis von drei verschiedenen Allelen festgestellt (Adair et al., 2000). Basierend auf IS*100*-Genotyping zeigten Pestoides Stämme Ähnlichkeiten zu *Y. pestis* Stämmen der Biovare Medievalis und Aniqua, andere Pestoides Stämme bildeten dagegen ein separates Cluster (Motin et al., 2002). Auch bei Analyse von sechs Differenzregionen (difference regions, DFRs), die mittels subtraktiver Hybridisierung im Genom von *Y. pestis* identifiziert wurden, zeigten Pestoides Stämme unterschiedliche Profile, die entweder ebenfalls bei Stämmen der Biovare Antiqua und Medievalis nachgewiesen werden konnten oder nur bei Pestoides zu beobachten waren (Radnedge et al., 2002).

Durch die Kombination der Primerpaare Y_pseudo_spec f/r und Y_pestis_spec f/r in einer Multiplex-PCR sollte die gleichzeitige Identifizierung von Stämmen von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und der „pseudopest“ Isolate möglich sein. Interessanterweise fand aber die Amplifizierung des ca. 1.5 Kb großen PCR-Produkts der „pseudopest“ Isolate in der Multiplex-PCR nicht statt (Fig. 3.4 A). Auch durch Verringerung der Primerkonzentrationen sowie Durchführung der PCR unter weniger

stringenten Bedingungen konnte nur eine sehr schwache Bande detektiert werden. Gleichzeitig war durch die Verringerung der Stringenz die vermehrte Synthese von unspezifischen PCR-Produkten in allen *Yersinia* Spezies zu beobachten (Fig. 3.4 C). Wodurch diese Hemmung hervorgerufen wurde, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise entstanden zwischen den zwei Primerpaaren Wechselwirkungen, durch die die Bindung von Y_pseudo_spec f/r an das „pseudopest“ Genom und in weiterer Folge die Synthese des PCR-Produkts verhindert wurde. Für diese Theorie spricht, dass bei gleichen Bedingungen, aber in Abwesenheit des Primerpaares Y_pestis_spec f/r das erwartete PCR-Produkt bei 1.5 Kb in allen „pseudopest“ Isolaten amplifiziert werden konnte (Fig. 3.4 B).

Viele der eingangs beschriebenen PCR-Methoden basieren auf Plasmid-kodierten Genen. Da sowohl Plasmide während der Kultivierung verloren gehen können, als auch atypische *Y. pestis* Isolate existieren, die nicht alle drei Virulenzplasmide aufweisen (Anisimov et al., 2004; Zhou et al., 2004a), sind diese PCR-Methoden umstritten (Tomaso et al., 2003). Alle in dieser Studie entwickelten Primer basieren ausschließlich auf chromosomalen DNA-Sequenzen. Dadurch besteht nicht die Gefahr, dass Verlust oder Fehlen von Plasmiden zu falschnegativen Ergebnissen führen könnte, wie es im Fall von PCR-Systemen möglich wäre, die auf Plasmid-kodierten Genen basieren. Um diesem Umstand auszuweichen wurden in anderen Arbeiten PCR-Methoden entwickelt, die sowohl chromosomal als auch Plasmid-kodierte Zielgene kombinieren. Unter anderem wurde dabei das 16S rRNA Gen als chromosomales Zielgen verwendet (Neubauer et al., 2000; Tomaso et al., 2003). Aufgrund der klonalen Verwandtschaft von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* (Achtman et al., 1999) sowie der identischen Sequenz der 16S rRNA kodierenden Gene (Trebesius et al., 1998) ist die Verwendung dieses Gens zum spezifischen Nachweis von *Y. pestis* als problematisch zu betrachten. Zudem wurden in keiner der beschriebenen Arbeiten Stämme des Biovars Microtus berücksichtigt und Stämme der atypischen Gruppe Pestoides schienen nur in wenigen Arbeiten auf (Chase et al., 2005; Radnedge et al., 2001; Tomaso et al., 2003). Mit anderen auf chromosomalen Sequenzen beruhenden PCR-Methoden war der spezifische Nachweis von *Y. pestis* Stämmen zwar möglich, es wurden aber beispielsweise nur die klassischen Biovare Antiqua, Medievalis und Orientalis getestet (Zhou et al., 2004a) oder bei atypischen Pestoides Stämmen auch falschnegative Ergebnisse erhalten (Radnedge et al., 2001). Mit allen in der vorliegenden Arbeit entwickelten Primern zur

Identifizierung von *Y. pestis* konnten auch bei dem atypischen *Y. pestis* Stamm Pestoides G8786 PCR-Produkte amplifiziert werden, während in Ermangelung eines verfügbaren Stammes kein Vertreter des Biovars Microtus getestet werden konnte.

4.2 Untersuchungen an *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“

Die Spezies *Y. pseudotuberculosis* wird basierend auf verschiedenen molekularbiologischen Untersuchungen als genetisch homogene Gruppe betrachtet (Bercovier et al., 1980; Brenner et al., 1976; Kotetishvili et al., 2005). Einige Isolate, die *Y. pseudotuberculosis* zugeordnet sind, reagieren in biochemischen Untersuchungen allerdings wie *Y. pestis* (Dr. Holger Scholz, persönliche Mitteilung). Weiters zeigen diese Isolate in MLST (Multilocus Sequence Typing) und MLVA (Multiple Locus Variable-Number of Tandem Repeat Analysis) eine höhere Übereinstimmung mit *Y. pestis* als mit *Y. pseudotuberculosis*, die 16S rRNA Sequenz ist aber sowohl zu *Y. pestis* als auch *Y. pseudotuberculosis* identisch. Aufgrund all dieser Ergebnisse wurden diese Isolate, bei denen es sich möglicherweise um eine neue, mit *Y. pestis* bzw. *Y. pseudotuberculosis* nah verwandte Spezies handeln könnte, als *Y. pseudotuberculosis* „pseudopest“ bezeichnet (Dr. Holger Scholz, persönliche Mitteilung).

DNA-DNA Hybridisierungsexperimente der „pseudopest“ Isolate gegen den Typstamm von *Y. pseudotuberculosis* ergaben eine Ähnlichkeit der DNA zwischen 82 und 93 % (Tabelle 3.4). Bei der reversen Hybridisierung von *Y. pseudotuberculosis* gegen den „pseudopest“ Stamm Y718 wurde ein Wert von 76 % erhalten. Da durch eine DNA Ähnlichkeit von über 70 % eine Verwandtschaft auf Spezies-Level angezeigt wird (Wayne et al., 1987), bestätigten die Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierungen eine Zugehörigkeit der „pseudopest“ Isolate zur Spezies *Y. pseudotuberculosis*. Basierend auf dieser Technik wäre allerdings auch *Y. pestis* der Spezies *Y. pseudotuberculosis* zuzuordnen (Bercovier et al., 1980).
DNA-DNA Hybridisierungen der „pseudopest“ Isolate mit *Y. pestis* konnten nicht durchgeführt werden, da abgesehen von fragmentierter DNA eine Extraktion hoch molekularer DNA aus den zur Verfügung gestellten Biomassen nicht möglich war. Rückstände von Methanol bzw. Perchlorsäure, die zum Abtöten des Zellmaterials

verwendet wurden, könnten für die Schwierigkeiten bei der Extraktion verantwortlich sein. Allerdings wären hierbei auch keine neuen Erkenntnisse zu erwarten gewesen, da wie oben erwähnt *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* hohe DNA-Homologien aufweisen.

Das Ergebnis der Hybridisierungsexperimente konnte aufgrund der engen Verwandtschaft von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* (Achtman et al., 1999; Brenner et al., 1976; Kotetishvili et al., 2005; Paradis et al., 2005; Skurnik et al., 2000) und somit auch von den „pseudopest" Isolaten aufgrund der zu beiden Spezies identischen 16S rRNA erwartet werden (Dr. Holger Scholz, persönliche Mitteilung). Bercovier et al. (1980) schlugen aufgrund der hohen DNA Homologie zwischen diesen Spezies sogar die Umbenennung von *Y. pestis* in *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pestis* vor. Da eine etwaige Differenzierung der „pseudopest" Isolate von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* durch molekularbiologische Methoden bedingt durch die enge DNA-Verwandtschaft nicht möglich war, wurde untersucht ob dies mit Hilfe von chemotaxonomischen Markern möglich ist.

Eine Unterscheidung der „pseudopest" Isolate basierend auf dem Chinonsystem war nicht zu beobachten. Ubichinon Q-8 als Hauptkomponente und geringe Anteile von Ubichinon Q-9 und Menachinon MK-8 wurde in sowohl allen „pseudopest" Stämmen als auch in den restlichen *Yersinia* Spezies gefunden (Tabelle 3.2), erwartungsgemäß der für *Enterobacteriaceae* beschriebenen homogenen Chinonsysteme (Yokota et al., 1992).

Die Hauptkomponente der polaren Lipide war in allen *Yersinia* Spezies Phosphatidylethanolamin, neben höheren bzw. moderaten Anteilen an Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin und dem unbekannten Aminophospholipid APL1 (Tabelle 3.3). Zusätzlich wurde in *Y. aleksiciae*, *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* inklusive den „pseudopest" Isolaten Phosphatidylmonomethylethanolamin und, mit Ausnahme von *Y. aleksiciae*, das unbekannte Aminolipid AL1 detektiert. Bei *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Y. „similis"* und *Y. ruckeri* fehlten Phosphatidylmonomethylethanolamin und das unbekannte Aminolipid AL1. Das unbekannte Aminolipid AL2 konnte in allen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen nachgewiesen werden, ein weiteres unbekanntes Aminolipid (AL3) nur in den „pseudopest" Isolaten, wodurch sie von *Y.*

pseudotuberculosis differenziert werden konnten (Fig. 3.6). *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* besitzen bis auf das überraschende Fehlen von AL2 bei *Y. pestis* ein identisches Lipidprofil, was aufgrund ihrer klonalen Verwandtschaft zu erwarten war (Achtman et al., 1999). Die Extraktion der polaren Lipide erfolgte in der vorliegenden Studie bei *Y. pestis* aus mit Methanol abgetöteter Biomasse (zur Verfügung gestellt von Dr. Holger Scholz) im Vergleich zu lyophilisierter Biomasse bei den anderen Stämmen. Es erscheint nicht ausgeschlossen, dass das Aminolipid AL2 durch diese Vorbehandlung verloren gegangen ist. Eine Extraktion von polaren Lipiden aus Biomasse, die vorher mit Methanol abgetötet wird, könnte diese Vermutung klären.

In einer früheren Beschreibung der Lipidzusammensetzung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* konnten zusätzlich zu den oben genannten Lipiden auch Phosphatidylserin, Phosphatidsäure sowie Glycolipide und Phosphatidylinositol in *Y. pseudotuberculosis* bzw. Phosphatidyldimethylethanolamin in *Y. pestis* nachgewiesen werden (Tornabene, 1973). Diese Lipide konnten in dieser Arbeit interessanterweise nicht detektiert werden, wobei die Lokalisation der Phosphatidsäure nach Auftrennung mittels 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie nicht bekannt ist und deshalb eine Identifizierung nicht möglich war. Phosphatidylinositol als Bestandteil der polaren Lipide in *Yersinia* wie von Tornabene (1973) beschrieben, ist äußerst zweifelhaft, da dieses Lipid bisher ausschließlich bei Gram-positiven Bakterien nachgewiesen wurde (Amadi and Alderson, 1992; Collins and Jones, 1982; Collins et al., 1981; Collins and Kroppenstedt, 1983; Lechevalier et al., 1977; Minnikin et al., 1977). Die Beschreibung des Vorkommens von Phosphatidylinositol bei *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* könnte möglicherweise auf eine Fehlinterpretation der Ergebnisse oder auch auf Verwendung von kontaminierter Biomasse zur Analyse zurückzuführen sein. Das Fehlen von Phosphatidylserin in der vorliegenden Arbeit war dagegen sehr überraschend, da mit der hier angewandten Extraktionsmethode üblicherweise auch dieses Lipid nachgewiesen wird. Dass es sich bei dem unbekannten Aminophospholipid APL1, das in allen *Yersinia* Stämmen detektiert werden konnte, nicht um Phosphatidylserin handelte, wurde durch Bestimmung des Rf-Wertes dieser Referenzsubstanz nachgewiesen, der sich eindeutig vom Rf-Wert von APL1 unterschied (Ergebnisse nicht gezeigt). Möglicherweise handelte es sich bei APL1 aber um ein mit Phosphatidylserin verwandtes Lipid oder ein Derivat desselben, das einen vom Phosphatidylserin abweichenden Rf-Wert aufweist.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierung und der Chinonanalyse war eine Differenzierung der „pseudopest“ Isolate von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* nicht möglich. Bezüglich der polaren Lipide scheint eine Unterscheidung der „pseudopest“ Isolate zu *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* basierend auf AL3, das in diesen zwei Spezies fehlt, möglich.

4.3 Untersuchungen zur chemotaxonomischen Differenzierung von *Y. ruckeri*

Der taxonomische Status von *Y. ruckeri*, dem Erreger der Rotmaulseuche, wird seit der Beschreibung als Art des Genus *Yersinia* durch Ewing diskutiert (Ewing et al., 1978). Obwohl *Y. ruckeri* sowohl zu *Serratia* als auch *Yersinia* Spezies eine DNA Verwandtschaft von 30 % zeigte, wurde *Y. ruckeri* aufgrund größerer Ähnlichkeit des G+C Gehalts und biochemischer Reaktionen dem Genus *Yersinia* zugeteilt. Der kontroverse genetische Status von *Y. ruckeri* wurde seither in mehreren Untersuchungen bestätigt. Eine phylogenetische Studie des Genus *Yersinia* basierend auf Sequenzierung der 16S rRNA zeigte, dass *Y. ruckeri* eine separate Subline innerhalb dieses Genus bildet (Ibrahim et al., 1993). Die separate Stellung von *Y. ruckeri* innerhalb des Genus wurde auch bei der Untersuchung der Verwandtschaft von Spezies des Genus *Yersinia* mittels MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) festgestellt (Dolina and Peduzzi, 1993). Kürzlich konnte durch MLST (Multilocus Sequence Typing) von 16S rRNA und vier „Housekeeping“ Genen (*glnA*, *gyr*B, *recA*, Y-HSP60) die phylogenetisch separate Stellung von *Y. ruckeri* von den restlichen *Yersinia* Spezies deutlich gezeigt werden (Kotetishvili et al., 2005).

Obwohl durch Analyse der Plasmidprofile und Ribotyping sowie MLEE gezeigt wurde, dass *Y. rucker* eine klonale genetische Struktur besitzt (Garcia et al., 1998; Schill et al., 1984), konnten bei zwei der hier untersuchten *Y. ruckeri* Stämme deutliche Unterschiede beobachtet werden. So wiesen die Stämme Bc74 und 82/B, die bereits bei Vergleich der genomischen Fingerprints deutliche Unterschiede zu den restlichen *Y. ruckeri* Isolaten inklusive dem Typstamm dieser Spezies zeigten (Fig. 3.7), ein einzigartiges Lipidprofil auf, das sie von den restlichen *Y. ruckeri* Stämmen trennte.

Weiters konnten diese Stämme durch die Fähigkeit zur Säureproduktion aus Sorbitol bei 18°C und 28°C differenziert werden. Durch phänotypische Charakterisierung von *Yersinia* Spezies wurde aber gezeigt, dass sich *Y. ruckeri* Stämme in der Fähigkeit zur Sorbitolfermentation unterscheiden können (Bottone et al., 2001), weshalb dieser Eigenschaft der beiden Stämme nicht so viel Bedeutung zugemessen wurde. Ob die besonderen Charakteristika der Stämme Bc74 und 82/B, die bei den polaren Lipiden und genomischen Fingerprints nachgewiesen wurden, von taxonomischer Relevanz sind, könnte durch DNA-DNA Hybridisierung geklärt werden.

Das Chinonsystem mit Ubichinon Q-8 als Hauptkomponente und geringen Anteilen von Q-9 und Menachinon MK-8 unterschied sich nicht von den Chinonsystemen der anderen *Yersinia* Spezies (Tabelle 3.2). Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da alle Spezies der *Enterobacteriaceae* hinsichtlich des Chinonsystems ähnlich charakterisiert sind (Yokota et al., 1992).

Die Ergebnisse der Lipidanalyse mit Phosphatidylethanolamin als Hauptkomponente sowie Anteilen von Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin in allen untersuchten Stämmen sowie zusätzlich Anteilen von Phosphatidylmonomethylethanolamin in einigen Stämmen stimmen großteils wie bereits diskutiert mit früheren Untersuchungen der Lipidzusammensetzung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* überein (Tornabene, 1973). Das Profil der polaren Lipide der analysierten *Y. ruckeri* Stämme unterschied sich innerhalb dieser Spezies voneinander, wodurch eine Differenzierung von den anderen *Yersinia* Spezies nicht eindeutig möglich war. Vier *Y. ruckeri* Stämme, die auch identische genomische Fingerprints zeigten (Fig. 3.7), und der Typstamm dieser Spezies konnten aber durch das Vorhandensein des unbekannten Phospholipids PL1 sowie des unbekannten Aminophospholipids APL2 klar von den restlichen *Y. ruckeri* Isolaten und *Yersinia* Spezies getrennt werden (Tabelle 3.3). Eine Unterscheidunge der *Y. ruckeri* Stämme Bc74 und 82/B von den übrigen *Y. ruckeri* Stämmen war durch das Fehlen dieser zwei Lipide und dem Nachweis des unbekannten Aminolipids AL1 möglich (Fig. 3.9 C).
Bei einer zweiten Extraktion und Analyse der polaren Lipide der Stämme Bc74, 82/B sowie des Typstamms Y81^T konnten neben den bereits beschriebenen Lipiden in allen drei Stämmen zwei weitere unbekannten Aminolipide detektiert werden (Fig. 3.9 D und E). Dabei handelte es sich um die auch in *Y. pseudotuberculosis* und den

„pseudopest“ Isolaten detektierten Aminolipide AL2 und AL3 (Fig. 3.6 B). Im Gegensatz zur ersten Analyse war das unbekannte Aminolipid APL1 nur schwach nachweisbar bzw. fehlte bei den Stämmen Bc74 und 82/B vollständig. Bei einer Wiederholung der Analyse dieser Lipidextrakte mittels Dünnschichtchromatographie war das APL1 interessanterweise wieder deutlich detektierbar, während die unbekannten Aminolipide AL2 und AL3 nicht mehr nachweisbar waren. Möglicherweise sind die beobachteten Unterschiede in den Profilen der polaren Lipide der gleichen Stämme auf die Qualität der Extraktion bzw. der dünnschichtchromatographischen Auftrennung zurückzuführen oder aber auf das Alter der Lipidextrakte.

Eine eindeutige Differenzierung der *Y. ruckeri* Stämme von den restlichen Yersinien war durch das Polyaminmuster möglich. Dieses setzte sich im Vergleich zu den anderen untersuchten *Yersinia* Spezies, die Putrescin als alleinige Hauptkomponente aufwiesen, aus Putrescin und Cadaverin als Hauptkomponenten sowie Anteilen von 1,3-Diaminopropan, Spermidin und Spermin zusammen (Tabelle 3.7). Zusätzlich waren in den restlichen *Yersinia* Spezies Cadaverin und 1,3-Diaminopropan nur in geringen Anteilen vorhanden bzw. fehlten in den Typstämmen von *Y. „similis“*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* vollständig.
Untersuchungen der Polyaminmuster zeigten, dass Putrescin, Spermidin, Cadaverin und Diaminopropan in vielen Arten der *Enterobacteriaceae* vorkommen (Hamana, 1996; Hamana and Matsuzaki, 1992; Zherebilo et al., 2001). Eine Analyse der Polyamine einiger *Yersinia* Spezies, darunter auch *Y. ruckeri*, wurde bereits von Hamana durchgeführt (1996). Dabei unterschied sich die Polyaminverteilung mit hohen Anteilen von Cadaverin, der Präsenz von Acetylspermidin sowie dem Fehlen von Spermin deutlich von den hier beschriebenen Ergebnissen. Das Polyaminmuster von *Y. ruckeri* wurde gegensätzlich zu der vorliegenden Analyse mit Spermidin als Hauptkomponente, gleichen Anteilen an Putrescin und Cadaverin sowie Spuren von Acetylspermidin beschrieben. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode zur Polyaminanalyse war eine Detektion von Acetylspermidin nicht möglich, da bei der sauren Hydrolyse der Zellen die Acetylgruppe abgespalten wird und somit nur noch Spermidin nachweisbar ist (Dr. Busse, persönliche Mitteilung). Die Extraktion der Polyamine erfolgte in der Studie von Hamana aus Biomasse, die in der späten stationären Phase geerntet wurde. Die Anzucht der Biomasse erfolgte dabei in synthetischem 199 Medium bzw.

Nährbouillon (nutrient broth, NB) im Gegensatz zu 3.3x PYE in der vorliegenden Arbeit. Während das synthetische 199 Medium weder Ornithin, Diaminobuttersäure noch andere Polyamine enthielt, waren in NB Putrescin, Cadaverin, Agmatin, Spermidin und Spermin zu finden (Hamana, 1996). 3.3x PYE enthielt Spuren von Spermidin und Spermin (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentrationen der Polyamine im Verlauf des Wachstums verändern, weshalb die Verwendung von Biomasse bei ca. 70 % der maximal zu erreichenden Ausbeute empfohlen wird (Busse and Auling, 1988). Weiters ist bekannt, dass die Konzentrationen der einzelnen Polyamine durch Kulturbedingungen wie die Art des Mediums – v. a. den darin vorhandenen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin, pH-Wert sowie Sauerstoffsättigung stark beeinflusst werden könnten (Tabor and Tabor, 1985). Diese Faktoren könnten für die Differenzen zwischen den von Hamana und den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen verantwortlich sein.

Eine weitere Besonderheit von *Y. ruckeri* wurde bei der Analyse der Polyamine in verschiedenen Phasen des Wachstums entdeckt. Im Verlauf des Wachstums nahm der Anteil an 1,3-Diaminopropan, das zu Beginn gemeinsam mit Putrescin die Hauptkomponente darstellte, ab, während die Konzentration von Cadaverin bei etwa gleich bleibenden Anteilen von Putrescin zunahm (Fig. 3.10 A). Damit stimmte das hier analysierte Polyaminmuster von *Y. ruckeri* bezüglich der Anteile von Cadaverin und Putrescin in der spätlogarithmischen bzw. stationären Phase ausgezeichnet mit den Ergebnissen von Hamana (1996) überein, während es sich in früheren Wachstumsphasen signifikant unterschied. Durch die hohen Anteile an Spermidin und den Nachweis von Acetylspermidin in dem von Hamana beschriebenen Polyaminmuster besteht aber trotzdem ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit.

Bei *Y. enterocolitica*, dessen Polyaminmuster ebenfalls in unterschiedlichen Wachstumsphasen analysiert wurde, war dieses Phänomen nicht in solch drastischer Weise wie bei *Y. ruckeri* zu beobachten (Fig. 3.10 B). Hier konnte nur eine im Vergleich zu *Y. ruckeri* geringe Veränderung der Putrescin- bzw. Cadaverin-Anteile nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass sich Polyaminkonzentrationen bei Zellen, die in der stationären bzw. logarithmischen Phase geerntet wurden, unterscheiden (Busse and Auling, 1988; Tabor and Tabor, 1985). Busse und Auling (1988) konnten bei verschiedenen Vertretern der *Proteobacteria* eine Veränderung der Polyaminkonzentration im Verlauf des Wachstums feststellen. Möglicherweise verändert sich in *Y. ruckeri* im Verlauf des Wachstums die Aktivität der für die

Synthese von Cadaverin bzw. 1,3-Diaminopropan zuständigen Enzyme. Bei Analyse der Gesamtzellproteine wurden geringe Unterschiede in den verschiedenen Wachstumsphasen festgestellt, die auf Veränderung der Proteinexpression und somit der Enzymaktivität schließen lassen könnten (Fig. 3.11). In *E. coli* wird beispielsweise die Biosynthese von Putrescin durch Ornithindecarboxylase bzw. Arginindecarboxylase durch die intrazelluläre Konzentration der Ausgangsstoffe sowie die in der Zelle vorhandenen Polyaminmengen reguliert (Tabor and Tabor, 1985).

Die erhaltenen Daten, dabei vor allem die Ergebnisse der Polyaminanalyse, unterstützen die separate Position von *Y. ruckeri* innerhalb des Genus *Yersinia* und deuten darauf hin, dass *Y. ruckeri* ein neues Genus innerhalb der *Enterobacteriaceae* darstellen könnte.

5 Literaturverzeichnis

Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., Vogler, A. J., Wagner, D. M., Allender, C. J., Easterday, W. R. et al. (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17837-42.

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A. and Carniel, E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14043-8.

Adair, D. M., Worsham, P. L., Hill, K. K., Klevytska, A. M., Jackson, P. J., Friedlander, A. M. and Keim, P. (2000). Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* **38**, 1516-9.

Ali, S., Muller, C. R. and Epplen, J. T. (1986). DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum Genet* **74**, 239-43.

Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathisc, A., Lubitz, W. and Busse, H.-J. (1996). Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol* **47**, 39-52.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.

Amadi, E. N. and Alderson, G. (1992). Lipids of *Arthrobacter siderocapsulans*. *J Appl Bacteriol* **73**, 144-147.

Anisimov, A. P., Lindler, L. E. and Pier, G. B. (2004). Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Rev* **17**, 434-64.

Bercovier, H., Mollaret, H., Alonso, J., Brault, J., Fanning, G., Steigerwalt, A. and Brenner, D. (1980). Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Current Microbiology* **4**, 225-229.

Bottone, E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**, 257-76.

Bottone, E. J., Bercovier, H. and Mollaret, H. H. (2001). Genus XLI. *Yersinia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria*, (ed. G. M. Garrity), pp. 838-848: Williams & Wilkins.

Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Falcao, D. P., Weaver, R. E. and Fanning, G. R. (1976). Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. *Int J Syst Bacteriol* **26**, 180-194.

Brubaker, R. R. (1991). Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin Microbiol Rev* **4**, 309-24.

Bruneteau, M. and Minka, S. (2003). Lipopolysaccharides of bacterial pathogens from the genus *Yersinia*: a mini-review. *Biochimie* **85**, 145-52.

Bubeck, S. S. and Dube, P. H. (2007). *Yersinia pestis* CO92{Delta}yopH is a potent live-attenuated plague vaccine. *Clin Vaccine Immunol*.

Busse, H. J., Denner, E. B. and Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* **47**, 3-38.

Busse, J. and Auling, G. (1988). Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* **11**, 1-8.

Campbell, J., Lowe, J., Walz, S. and Ezzell, J. (1993). Rapid and specific identification of *Yersinia pestis* by using a nested polymerase chain reaction procedure. *J Clin Microbiol* **31**, 758-9.

Chain, P. S., Carniel, E., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Stoutland, P. O., Regala, W. M., Georgescu, A. M., Vergez, L. M., Land, M. L., Motin, V. L. et al. (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13826-31.

Chain, P. S., Hu, P., Malfatti, S. A., Radnedge, L., Larimer, F., Vergez, L. M., Worsham, P., Chu, M. C. and Andersen, G. L. (2006). Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol* **188**, 4453-63.

Chase, C. J., Ulrich, M. P., Wasieloski, L. P., Jr., Kondig, J. P., Garrison, J., Lindler, L. E. and Kulesh, D. A. (2005). Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. *Clin Chem* **51**, 1778-85.

Collins, M. D. and Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* **45**, 316-54.

Collins, M. D. and Jones, D. (1982). Lipid composition of *Corynebacterium paurometabolum* (Steinhaus). *FEMS Microbiology Letters* **13**, 13-16.

Collins, M. D., Jones, D., Goodfellow, M. and Minnikin, D. E. (1979). Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of *Listeria*, *Brochothrix*, *Erysipelothrix* and *Caryophanon*. *J Gen Microbiol* **111**, 453-7.

Collins, M. D., Jones, D. and Kroppenstedt, R. M. (1981). Reclassification of *Corynebacterium ilicis* (Mandel, Guba and Litsky) in the genus *Arthrobacter*, as *Arthrobacter ilicis* comb.nov. . *Zentralbl. Bakteriol., Mikrobiol. Hyg., I Abt. C* **2**, 318-322.

Collins, M. D. and Kroppenstedt, R. M. (1983). Lipid composition as a guide to the classification of some coryneform bacteria-containing an A 4 alpha type peptidoglycan (Schleifer and Kandler). *Syst Appl Microbiol* **4**, 95-104.

Deng, W., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Boutin, A., Mayhew, G. F., Liss, P., Perna, N. T., Rose, D. J., Mau, B., Zhou, S. et al. (2002). Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol* **184**, 4601-11.

Devignat, R. (1951). [Varieties of *Pasteurella pestis*; new hypothesis.]. *Bull World Health Organ* **4**, 247-63.

Dolina, M. and Peduzzi, R. (1993). Population genetics of human, animal, and environmental *Yersinia* strains. *Appl Environ Microbiol* **59**, 442-50.

Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J. and Fanning, G. R. (1978). *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **28**, 37-44.

Filippov, A. A., Solodovnikov, N. S., Kookleva, L. M. and Protsenko, O. A. (1990). Plasmid content in Yersinia pestis strains of different origin. *FEMS Microbiol Lett* **55**, 45-8.

Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S., Carniel, E. and Courvalin, P. (1997). Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med* **337**, 677-80.

Garcia, J. A., Dominguez, L., Larsen, J. L. and Pedersen, K. (1998). Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. *J Appl Microbiol* **85**, 949-55.

Gevers, D., Huys, G. and Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 31-6.

Gilson, E., Clément, J.-M., Brutlag, D. and Hofnung, M. (1984). A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *The EMBO Journal* **3**, 1417-1421.

Guiyoule, A., Gerbaud, G., Buchrieser, C., Galimand, M., Rahalison, L., Chanteau, S., Courvalin, P. and Carniel, E. (2001). Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg Infect Dis* **7**, 43-8.

Guiyoule, A., Grimont, F., Iteman, I., Grimont, P. A., Lefevre, M. and Carniel, E. (1994). Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J Clin Microbiol* **32**, 634-41.

Hamana, K. (1996). Distribution of diaminopropane and acetylspermidine in *Enterobacteriaceae*. *Can J Microbiol* **42**, 107-14.

Hamana, K. and Matsuzaki, S. (1992). Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit Rev Microbiol* **18**, 261-83.

Higgins, C. F., Ames, G. F., Barnes, W. M., Clement, J. M. and Hofnung, M. (1982). A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**, 760-2.

Higgins, J. A., Ezzell, J., Hinnebusch, B. J., Shipley, M., Henchal, E. A. and Ibrahim, M. S. (1998). 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* **36**, 2284-8.

Hinchliffe, S. J., Isherwood, K. E., Stabler, R. A., Prentice, M. B., Rakin, A., Nichols, R. A., Oyston, P. C., Hinds, J., Titball, R. W. and Wren, B. W. (2003). Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res* **13**, 2018-29.

Hinnebusch, J. and Schwan, T. G. (1993). New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. *J Clin Microbiol* **31**, 1511-4.

Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Wenger, J. D., Moss, C. W. and Brenner, D. J. (1989). *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol* **27**, 1601-8.

Huang, X. Z., Nikolich, M. P. and Lindler, L. E. (2006). Current trends in plague research: from genomics to virulence. *Clin Med Res* **4**, 189-99.

Hulton, C. S., Higgins, C. F. and Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other *enterobacteria*. *Mol Microbiol* **5**, 825-34.

Ibrahim, A., Goebel, B. M., Liesack, W., Griffiths, M. and Stackebrandt, E. (1993). The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **114**, 173-7.

Iqbal, S. S., Chambers, J. P., Goode, M. T., Valdes, J. J. and Brubaker, R. R. (2000). Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR. *Mol Cell Probes* **14**, 109-14.

Kim, W., Song, M. O., Song, W., Kim, K. J., Chung, S. I., Choi, C. S. and Park, Y. H. (2003). Comparison of 16S rDNA analysis and rep-PCR genomic fingerprinting for molecular identification of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**, 125-33.

Klevytska, A. M., Price, L. B., Schupp, J. M., Worsham, P. L., Wong, J. and Keim, P. (2001). Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol* **39**, 3179-85.

Koeuth, T., Versalovic, J. and Lupski, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* **5**, 408-18.

Kotetishvili, M., Kreger, A., Wauters, G., Morris, J. G., Jr., Sulakvelidze, A. and Stine, O. C. (2005). Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* **43**, 2674-84.

Leal, N. C. and Almeida, A. M. (1999). Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **41**, 339-42.

Lechevalier, M. P., De Bievre, C. and Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic *actinomycetes*: phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol* **5**, 249-260.

Lehmann, K. B. and Neumann, R. (1896). In *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik,* (ed. J. F. Lehmann). München.

Loiez, C., Herwegh, S., Wallet, F., Armand, S., Guinet, F. and Courcol, R. J. (2003). Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **41**, 4873-5.

Lupski, J. R. and Weinstock, G. M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* **174**, 4525-9.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2000). Brock Biology of Microorganisms: Prentice-Hall.

Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., Kaneko, S. and Sasakawa, C. (1994). PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. *J Clin Microbiol* **32**, 65-9.

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R. et al. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **20**, 3479-83.

Martinevskii, I. L. (1969). Biology and genetic features of plague and plague-related microbes, (ed.: Meditsina Press, Moscow, USSR.

Mesbah, M., Premachandran, U. and Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+ C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.

Minnikin, D. E., Patel, P. V., Alshamaony, L. and Goodfellow, M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **27**, 104-117.

Mollaret, H. H. and Mollaret, C. (1965). [Melibiose fermentation in the genus *Yersinia* and its importance in the diagnosis of the varieties of *Y. pestis*]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **58**, 154-6.

Motin, V. L., Georgescu, A. M., Elliott, J. M., Hu, P., Worsham, P. L., Ott, L. L., Slezak, T. R., Sokhansanj, B. A., Regala, W. M., Brubaker, R. R. et al. (2002). Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J Bacteriol* **184**, 1019-27.

Neubauer, H., Meyer, H., Prior, J., Aleksic, S., Hensel, A. and Splettstosser, W. (2000). A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**, 573-80.

Odinot, P. T., Meis, J. F., Van den Hurk, P. J., Hoogkamp-Korstanje, J. A. and Melchers, W. J. (1995). PCR-based characterization of *Yersinia enterocolitica*: comparison with biotyping and serotyping. *Epidemiol Infect* **115**, 269-77.

Olsen, G. J. and Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Faseb J* **7**, 113-23.

Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Belanger, S. D., Martel, E. A., Boudreau, D. K., Picard, F. J., Ouellette, M., Roy, P. H. and Bergeron, M. G. (2005). Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2013-25.

Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T., Prentice, M. B., Sebaihia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L. et al. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523-7.

Pearson, W. R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63-98.

Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444-8.

Perry, R. D. and Fetherston, J. D. (1997). *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**, 35-66.

Pitcher, D. G., Saunders, N. A. and Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**, 151-156.

Pourcel, C., Andre-Mazeaud, F., Neubauer, H., Ramisse, F. and Vergnaud, G. (2004). Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* **4**, 22.

Pujol, C. and Bliska, J. B. (2005). Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* **114**, 216-26.

Radnedge, L., Agron, P. G., Worsham, P. L. and Andersen, G. L. (2002). Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology* **148**, 1687-98.

Radnedge, L., Gamez-Chin, S., McCready, P. M., Worsham, P. L. and Andersen, G. L. (2001). Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3759-62.

Rahalison, L., Vololonirina, E., Ratsitorahina, M. and Chanteau, S. (2000). Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J Clin Microbiol* **38**, 260-3.

Rakin, A. (2003). *Yersinia pestis*. Eine Bedrohung für die Menschheit. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **46**, 949-955.

Rasschaert, G., Houf, K., Imberechts, H., Grijspeerdt, K., De Zutter, L. and Heyndrickx, M. (2005). Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *J Clin Microbiol* **43**, 3615-23.

Richards, G. M. (1974). Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal Biochem* **57**, 369-76.

Scherer, P. and Kneifel, H. (1983). Distribution of polyamines in methanogenic bacteria. *J Bacteriol* **154**, 1315-22.

Schill, W. B., Phelps, S. R. and Pyle, S. W. (1984). Multilocus Electrophoretic Assessment of the Genetic Structure and Diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl Environ Microbiol* **48**, 975-979.

Shah, H. N. and Collins, M. D. (1980). Fatty acid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Bacteroides melaninogenicus* and related taxa. *J Appl Bacteriol* **48**, 75-87.

Sharples, G. J. and Lloyd, R. G. (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* **18**, 6503-8.

Skottman, T., Piiparinen, H., Hyytiainen, H., Myllys, V., Skurnik, M. and Nikkari, S. (2007). Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 207-11.

Skurnik, M., Peippo, A. and Ervela, E. (2000). Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* **37**, 316-30.

Song, Y., Tong, Z., Wang, J., Wang, L., Guo, Z., Han, Y., Zhang, J., Pei, D., Zhou, D., Qin, H. et al. (2004). Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res* **11**, 179-97.

Sprague, L. D. and Neubauer, H. (2005). *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 831-5.

Sprague, L. D., Scholz, H. C., Amann, S., Busse, H. J. and Neubauer, H. (eingereicht). *Yersinia smilis* sp. nov.

Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C. and Higgins, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015-26.

Sulakvelidze, A. (2000). Yersiniae other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect* **2**, 497-513.

Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlacek, I. and Swings, J. (2005). Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* **247**, 59-63.

Szczuka, E. and Kaznowski, A. (2004). Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J Clin Microbiol* **42**, 220-8.

Tabor, C. W. and Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* **49**, 81-99.

Tindall, B. J. (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* **13**, 128-130.

Tindall, B. J. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters* **66**, 199-202.

Titball, R. W. and Williamson, E. D. (2001). Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine* **19**, 4175-84.

Tomaso, H., Reisinger, E. C., Al Dahouk, S., Frangoulidis, D., Rakin, A., Landt, O. and Neubauer, H. (2003). Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**, 117-26.

Tornabene, T. G. (1973). Lipid composition of selected strains of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* **306**, 173-85.

Trebesius, K., Harmsen, D., Rakin, A., Schmelz, J. and Heesemann, J. (1998). Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* **36**, 2557-64.

Tsukano, H., Itoh, K., Suzuki, S. and Watanabe, H. (1996). Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers. *Microbiol Immunol* **40**, 773-5.

Van Loghem, J. J. (1944). The classification of plague-bacillus. *Ant Van Leeuw J Serol Microbiol* **10**, 15-16.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823-31.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. and Stackebrandt, E. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213-8.

Wiid, I. J., Werely, C., Beyers, N., Donald, P. and van Helden, P. D. (1994). Oligonucleotide (GTG)5 as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol* **32**, 1318-21.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**, 6531-5.

Wilson, L. A. and Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol* **23**, 1156-1168.

Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-9.

World Health Organization. (2004). Human plague in 2002 and 2003. *Weekly Epidemiological Record* **79**, 301-308.

Woron, A. M., Nazarian, E. J., Egan, C., McDonough, K. A., Cirino, N. M., Limberger, R. J. and Musser, K. A. (2006). Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of *Yersinia pestis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **56**, 261-8.

Wren, B. W. (2003). The *yersiniae*--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**, 55-64.

Yersin, A. (1894). La peste bubonique à Hong Kong. *Ann Inst Pasteur* **8**, 662-667.

Yokota, A., Akagawa-Matsushita, M., Hiraishi, A., Katayama, Y., Urakami, T. and Yamasato, K. (1992). Distribution of quinone systems in microorganisms: gram-negative eubacteria. *Bull Jpn Fed Cult Coll* **8**, 136–171.

Zherebilo, O. E., Kucheryava, N., Gvozdyak, R. I., Ziegler, D., Scheibner, M. and Auling, G. (2001). Diversity of polyamine patterns in soft rot pathogens and other plant-associated members of the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol* **24**, 54-62.

Zhou, D., Han, Y., Dai, E., Pei, D., Song, Y., Zhai, J., Du, Z., Wang, J., Guo, Z. and Yang, R. (2004a). Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis*. *Microbiol Immunol* **48**, 263-9.

Zhou, D., Han, Y., Song, Y., Huang, P. and Yang, R. (2004b). Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. *Microbes Infect* **6**, 1226-34.

Zhou, D., Tong, Z., Song, Y., Han, Y., Pei, D., Pang, X., Zhai, J., Li, M., Cui, B., Qi, Z. et al. (2004c). Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *J Bacteriol* **186**, 5147-52.

Ziemke, F., Hofle, M. G., Lalucat, J. and Rossello-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**, 179-86.

ANHANG

Title: *Yersinia similis* sp. nov.

Lisa D. Sprague[1], Holger C. Scholz[2], Sabine Amann[3], H.-Jürgen Busse[3] and Heinrich Neubauer[1]

1: Friedrich-Loeffler-Institut, Naumburgerstr. 96a, D-07743 Jena; Germany (present address)

2: Bundeswehr Institut für Mikrobiologie, Abteilung für Bakteriologie, Neuherbergstr.11,

D-80937 München, Germany

3. Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Austria

Correspondence:

Lisa D. Sprague

Tel: + 49-3641-804 462

Fax: + 49-3641-804 228

E-Mail: natter13@gmx.de

The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of the strains Y36, Y111^T (ATCC 29833^T), Y117, Y228^T (CCUG 52882^T; LMG 23763^T), Y233, and Y252 are: AM182400, AM182401, AM182402, AM182404, AM182405, and AM182406, respectively.

Strains originally phenotypically identified as members of the species *Y. pseudotuberculosis* were subjected to a more detailed classification employing 16S rRNA gene sequence analysis, DNA-DNA hybridisation, determination of the DNA base composition and phenotypic characterization. The quinone system consisting of the predominant compound ubiquinone Q-8 and minor amounts of menquinone MK-8, major components in the polar lipid profile as well as the polyamine pattern with putrescine as the major compound supported their assignment to the genus *Yersinia*. Based on the DNA-DNA similarity, a specific 16S rRNA gene sequence type, absence of melibiose fermentation and a polar lipid profile lacking phosphatidylmonomethyl-ethanolamine and two aminolipids the strains were identified as members of a novel species for which the name Y*ersinia similis* sp. nov. is proposed. The type strain of *Yersinia similis* sp. nov. is strain Y228^T (CCUG 52882^T; LMG 23763^T).

On the basis of DNA-DNA hybridisation, *Y. pseudotuberculosis* was considered to be a molecularly homogenous species (Brenner *et al*., 1976; Bercovier *et al*., 1980). Phenotypic characterisation of *Y. pseudotuberculosis* strains by means of a sophisticated serotyping scheme (Tsubokura & Aleksic, 1995; Nagano *et al*., 1997) and endonuclease analysis of virulence plasmids (REAP) discriminated pathogenic and apathogenic clones (Fukushima *et al*., 1998). Apart from European O:3 melibiose negative strains melibiose non-fermenters are only rarely found in other serogroups (< 0.5 %) (Fukushima *et al*., 2001). A PCR assay targeting the 16S rRNA gene of *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* reacted negatively when using this assay on a number of strains phenotypically assigned to *Y. pseudotuberculosis* (Neubauer *et al*., 2000a). Several studies have demonstrated the applicability of 16S rRNA gene sequences to identify species of their own right within the genus *Yersinia* and its use as distinct species-specific marker e.g., for *Y. aleksiciae* and *Y. enterocolitica enterocolitica/paleartica* (Ibrahim *et al*., 1993; Neubauer *et al*., 2000b; Sprague & Neubauer, 2005). The aim of the present study was to investigate if isolates of *Y. pseudotuberculosis* displaying different 16S rRNA gene sequences could form a new species.

Six *Yersinia* isolates were originally phenotyped as *Y. pseudotuberculosis* by the former German *Yersinia* reference centre, Hamburg, Germany. These *Yersinia* isolates were extensively investigated by molecular and biochemical techniques (Table 1 and 2). Type

strains were purchased from ATCC, Rockville, Maryland, USA. *Yersinia* type strains included were: *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 29833^T (Y111^T), *Yersinia enterocolitica paleartica* DSMZ 13013^T (Y11^T), *Yersinia ruckeri* ATCC 29473^T (Y81^T) and *Yersinia kristensenii* ATCC 33638^T (Y110^T). Strains were maintained on standard nutrient agar I (Oxoid, Wesel, Germany) at 4°C. Subcultivation was on blood agar over night at 28°C. Broth culture was carried out over night in LB medium (Difco, Augsburg, Germany) at 28°C and 150 rpm in controlled environment shakers (New Brunswick, Edison, N.J., USA). Cells were harvested by centrifugation (1,200 x *g;* 30 min) and stored in 70 % isopropanol at 4°C until used for DNA-DNA hybridisation experiments.

Chemotaxonomic analyses were carried out with strain Y228^T, *Y. enterocolitica* Y11^T and *Y. pseudotuberculosis* Y111^T. The strains were grown on 3.3xPYE (1 % peptone from casein, 1 % yeast extract, pH 7.2) and polyamines were extracted and analysed as described by Busse & Auling, (1988) and Stolz *et al*., (2007). Quinone systems and polar lipids were analysed according to the procedures of Tindall, (1990a, b) and Altenburger *et al.* (1996) using a HPLC apparatus described by Stolz *et al*. (2007). Molecular and biochemical characterisation and identification of *Yersinia* isolates was done as described by Neubauer *et al*. (2000a, b and c). Multiple sequence alignments of partial 16S rRNA gene sequences were performed with ClustalW 1.8 and prepared for publication with BOXSHADE 3.21 available at http://clustalw.genome.jp/ and http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.

The phylogenetic *rrs* tree (1388 nt) was generated using the online accessible bioinformatics tools from HUSAR available from http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz. *rrs* sequences were aligned using ClustalW. The Phylogenetic tree was constructed from the alignment obtained with CLUSTREE and the implemented Kimura-2-parameter model. Phylogenetic reconstruction was done using the neighbour-joining method, and 1000 bootstrap resamplings were performed to assess probabilities of the nodes. Trees were rooted using the 16S rRNA gene sequence of *E. coli* ATCC 43895.

The API 20E (BioMerieux, Nürtingen, Germany) test was performed as described by the manufacturer and the semi miniaturised *Yersinia* identification system (Merlin, Bornheim-Hersel, Germany) according to Neubauer *et al.* (2000d). All incubations were carried out at 28°C in order to avoid failure of metabolic reactions which can occur at 37°C. DNA extractions, DNA-DNA hybridisations and determination of the G+C contents were carried out at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig as recently described (De Ley *et al*., 1970; Cashion *et al*., 1977; Escara & Hutton, 1980; Huss *et al*., 1983; Tamaoka & Komagata, 1984; Mesbah *et al*., 1989; Jahnke, 1992; Martin *et al*., 1997).

All putative *Yersinia pseudotuberculosis* strains were small, Gram-negative motile coccoid rods, catalase- and urease-positive and oxidase- negative. They were rhamnose-, glucose-, ornithine decarboxylase-, trehalose-, L-pyroglutamicacid-ß-naphylamide positive, and showed various negative reactions (Table 2). Strains Y111^T, Y117, Y36 were identical in their 16S rRNA gene sequence type P and were able to ferment melibiose. These strains were also clearly identified by a semi miniaturised *Yersinia* identification system (Merlin, Bornheim-Hersel, Germany) optimised for *Yersinia* isolates as *Y. pseudotuberculosis* with relative probability of 100 % and an absolute probability of <1,200:1. The strains Y228^T, Y252, and Y233 were identical in their 16S rRNA gene sequence type S and melibiose-negative and were also identified as *Y. pseudotuberculosis* with a relative probability of > 95 % but with an absolute probability of >10,000:1 making this diagnosis doubtful (Neubauer *et al*., 2000d). The API 20E test system identified all six strains as *Y. pseudotuberculosis*. The type strain ATCC 29833^T was negative for tryptophan deaminase (TDA) and gelatine. However, it showed a number of very untypical reactions when compared to the majority of strains belonging to the species *Y. pseudotuberculosis* in the semi miniaturised *Yersinia* identification system, i.e. esculin, cellibiose, lactose, sorbose and Voges-Proskauer reaction (Neubauer & Sprague, 2005). In the classical tube testing system no deviations were observed compared to the original description (Bercovier *et al.*, 1980). The anomalous results seen in the semi miniaturised *Yersinia* identification system can be explained by the formulation of the reagents and the arbitrary choice of cut-off values selected for optimal species and biovar designation within the genus *Yersinia* or *Yersinia enterocolitica*, respectively (Neubauer *et al.*, 2000d). Additionally, we observed positive reactions for γ -glutamyl-ß-naphtylamide (γ-GTA), L-pyroglutamic acid-ß-naphtylamide (PYR) and proline (PROL) but negative reactions for p-nitrophenyl-ß-D-xylopyranoside (PNPX), p-nitrophenyl-ß-glucoronide (PGUR), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl butyrate (BUT) and pyrazinamide (PCA).

Chemotaxonomic analyses (Tab. 3) revealed rather similar polyamine patterns in the three strains (Y228^T; Y11^T; Y111^T) with the predominant compound putrescine. Moderate to minor amounts of spermidine and minor amounts of 1,3-diaminopropane and spermine were detected in the three strains. Only *Y. enterocolitica* Y11^T exhibited

the presence of cadaverine. The presence of cadaverine in the polyamine pattern of the type strain of *Y. enterocolitica* is in agreement with the results from a previous report (Hamana, 1996) where cadaverine was found to be the predominant compound. This difference might be caused by different media for growth of biomass. Another explanation for the observed difference might be that Hamana (1996) harvested either logarithmically growing or stationary cells whereas we harvested the cells at approximately 70 % of the maximum optical density.

Ubiquinone Q-8 was the predominant quinone compound found in the three strains. Additionally, minor amounts of Q-9 and minor to moderate amounts of menquinone MK-8 were detected. Similar quinone systems have been reported in all *Enterobacteriaceae* species examined so far (Yokota *et al*., 1992). The polar lipid profile of $Y228^T$ shared major characteristics with the other two strains (Table 3) but could be distinguished from *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$ due to the lack of phosphatidylmonomethyl-ethanolamine and two aminolipids. The chemotaxonomic characteristics of strain $Y111^T$ are in agreement with those of the two reference strains analysed here and thus support its assignment to the genus *Yersinia*. Differences in the polar lipid profile (absence of phosphatidylmonomethyl-ethanolamine and two aminolipids) compared with *Y. pseudotuberculosis* $Y111^T$ support the view that $Y228^T$ is a representative of a species not yet described within the genus (Fig. 1).

All strains investigated were negative in the plasminogen activator- and F1 antigen gene PCR assay specific for *Y. pestis*. 16S rRNA gene sequence type S strains were negative in the *Y. pseudotuberculosis / Y. pestis* specific 16S rRNA gene PCR described by Neubauer *et al*. due to sequence alterations in the sequence of primer PT2 (Neubauer *et al*., 2000a). Molecular pathogenicity markers were dispersed within all strains investigated (Table 1). A phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence obtained from this study and sequences of all other *Yersinia* species type-strains showed the close relatedness of *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis*. Strains of the *Y. pseudotuberculosis*-like strains of the 16S rRNA gene type S uniformly grouped into an own cluster (Fig. 2).

Strains of the 16S rRNA gene sequence type P (Y36, $Y111^T$, and Y117) formed a genomic species with an intragroup relatedness of > 70 % DNA-DNA similarity. Hence, we consider only strains Y36 and Y117 as members of the species *Y. pseudotuberculosis*. It has to be stressed that this sequence can also be found in the 16S rRNA gene of other bacteria. As a marker for *Y. pseudotuberculosis* it can only be used after an isolate has

been phenotypically assigned to the genus *Yersinia*. Strains of the 16S rRNA gene sequence type S (Y228^T, Y233, and Y252) form a second genomic species with an intragroup relatedness of > 70 % DNA-DNA similarity but only 44-66 % with the strains of *Y. pseudotuberculosis* (Tab. S1 available at: supplementary data at IJSEM online). Members of these genomic species showed no significant degree of DNA-DNA similarity to *Y. ruckeri* Y81^T or *Y. kristensenii* Y110^T (Table S1). The G + C mol% content was: Y36: 48.9 mol%; Y117: 48.9 mol%, Y228^T: 48.1 mol%; Y233: 47.6 mol%; and Y252: 49.3 mol%. Strains characterised by the lack of melibiose utilisation and a 16S rRNA sequence type S were considered to be a species of their own and are referred to as from now as *Yersinia similis* sp. nov.

Y. similis sp. nov. strains show a high sequence similarity in helix 18 of the 16S rRNA gene sequence (positions 451 to 480 *E. coli* 16S rRNA, International Union of Biochemistry [IUB] nomenclature) to the sequence of *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis*. 16S rRNA gene sequences have already been used as marker to identify new species and subspecies within the genus *Yersinia* (Neubauer *et al*., 2000b; Sprague & Neubauer, 2005). Thus, for the differentiation of *Y. similis* sp. nov. a new specific sequence 5'-GATTTGGCAGAGATGCCTTA-3' (position 987 to 1006; *E. coli* IUB nomenclature) has now been introduced as genetic marker. The phenotypic marker for biochemical differentiation of both species is melibiose fermentation which is regularly observed in the species *Y. pseudotuberculosis* but not in *Y. similis* sp. nov. However, sporadically melibiose-negative *Y. pseudotuberculosis* strains have been described previously (Fukushima *et al*., 2001). The strains of *Y. similis* sp. nov. we have investigated seem to belong to the non-pathogenic, virulence-plasmidless genetic group 4 described by Fukushima *et al*. (2001). They have been isolated from clinically inapparent animals and from the environment, i.e. surface water, but have never been isolated from diseased animals or humans. The occurrence of such a strain in Germany like the *Y. similis* sp. nov. type strain Y228 (CCUG 52882^T) is not surprising since *Yersinia* strains are easily introduced into non-endemic areas via food, animals or even human travellers (Fukushima *et al*., 2001). Kim *et al*. (2003) defined a molecular subgroup within the entity of *Y. pseudotuberculosis* strains ('subgroup 4') by 16S rRNA gene sequencing, REP-PCR, ERIC-PCR and Box-PCR. This subgroup was made up of strains of our 16S rRNA gene sequence type S (AF 365936, AF 365945, AF 365948 and AF 365950) of serotypes 1c; 6, 9 and 11. These strains can now also be identified as *Y. similis* sp. nov. *Y.*

similis sp. nov. strains should be grouped into risk class 2 until apathogenicity for man has been confirmed.

The 16S rRNA genes of the two *Y. similis* sp. nov. strains were identical (Fig. 2), exhibiting 99.6 % identity with the 16S rRNA genes of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*. When comparing the 16S rRNA sequences of the type strains of the species of the genus *Yersinia*, the relatedness never falls below 97.4 %.

The mean G + C content of *Y. pseudotuberculosis* isolates was 48.4 mol% and is thus 1.9 mol% above the previously published value (Bercovier *et al.*, 1980). The mean G + C content of *Y. similis* sp. nov. is estimated to be 48.3 mol%. This value is slightly higher than the values determined for *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (47.55 mol%) and several *Y. pestis* strains (47.63-47.70 mol%) based on their whole genome sequences (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/Genomes.cgi) and 1.8 mol% higher than the value published for *Y. pseudotuberculosis* (Bercovier & Mollaret, 1984). This estimate is within the accepted limits for the genus *Yersinia* of 46 to 50 mol% (Bercovier & Mollaret, 1984).

16S rRNA gene sequence type analysis, results from DNA-DNA hybridisations, absence of fermentation of melibiose and p-nitrophenyl-ß-D-galactopyranoside and absence of phosphatidylmonomethyl-ethanolamine and two unknown aminlipids provide evidence that strains Y228^{T}, Y233, and Y252 are representatives of a novel species, which is phenotypically distinguishable from its nearest phylogentic neighbour *Y. pseudotuberculosis* for which we propose the name *Y. similis* sp. nov.

The importance of this new species for ecologists, evolution geneticists and clinical microbiologists must be emphasised. Members of the new species seem to be well adapted to the environment and do not cause disease. *Y. similis* sp. nov. is distributed in the Far East and in areas where plague is still endemic. *Y. similis* may therefore interfere with the classical field diagnostics. The removal of this new species from the *Y. pestis* / *Y. pseudotuberculosis* complex will also be an important step for future pathogenicity and evolution studies.

Description of the species *Yersinia similis* sp. nov.

The species *Yersinia similis* sp. nov. (si'mi.lis. L. fem. adj. similis, similar, resembling) is composed of small Gram-negative motile coccoid rods. Cells are catalase- and urease-positive, oxidase-negative, and reduce nitrate. Members of the species are rhamnose-, trehalose-, glycin- and pyracinamidase positive but melibiose negative. The specific 16S

rRNA gene sequence marker is 5'-GATTTGGCAGAGATGCCTTA-3' (position 987 to 1006; *E. coli* IUB nomenclature). Other characteristics of the species are listed in tables 2 and 3. The mean G + C content of the species was determined to be 48.3 mol% (HPLC) and the G+C content of the type strain Y228^T was determined to be 48.1 mol%. The type strain Y228^T (CCUG 52882^T; LMG 23763^T) was isolated from a rabbit in Germany. The accession number of the 16S rRNA gene sequence of Y228^T is AM182404.

Acknowledgements

The excellent technical assistance of C. Lodri and R. Schneider is gratefully acknowledged.

References

Altenburger, P., Kämpfer P., Makristathis, A., Lubitz, W. & Busse, H.-J. (1996). Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol* **47**, 39-52.

Bercovier, H., Mollaret, H. H., Alonso, J. M., Brault, J., Fanning, G. R., Steigerwaldt, A. G. & Brenner, D. J. (1980). Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridisation and its relatedness to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr Microbiol* **4**, 225-229.

Bercovier, H. & Mollaret, H. H. (1984). Genus XIV. *Yersinia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1,* pp. 498-506. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore and London: Wiliams and Wilkens.

Brenner, D. J., Steigerwaldt, A. G., Falcao, D. P., Weaver, R. E., & Fanning, G. R. (1976). Characterisation of *Yersinia entercolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyrionucleic acid hybridisation and by biochemical reactions. *J Syst Bacteriol* **26**, 180-194.

Busse, H.-J. & Auling, G. (1988). Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the *Proteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* **11**, 1-8.

Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J. & Franklin, M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**, 461-466.

De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridisation from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**, 133-142.

Escara, J. F. & Hutton, J. R. (1980). Thermal stability and renaturation of DNA in dimethyl sulfoxide solutions: acceleration of the renaturation rate. *Biopolymers* **19**, 1315-1327.

Fukushima, H., Gomyoda, M., Hashimoto, N., Takashima, I., Shubin, F. N., Isachikova, L. M., Paik, I. K. & Zheng, X. B. (1998). Putative origin of *Yersinia pseudotuberculosis* in western and eastern countries. A comparison of restriction endonuclease analysis of virulence plasmids. *Zentralbl Bakteriol* **288**, 93-102.

Fukushima, H., Matsuda, Y., Seki, R., Tsubokura, M., Takeda, N., Shubin, F. N., Paik, I. K. & Zheng, X. B. (2001). Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J Clin Microbiol.* **39**, 3541-3547.

Hamana, K. (1996). Distribution of diaminopropane and acetylspermidine in *Enterobacteriaceae*. *Can J Microbiol* **42**, 107-114.

Huss, V. A. R., Festl, H. & Schleifer, K. H. (1983). Studies on the spectrometric determination of DNA hybridisation from renaturation rates. *J Syst Appl Microbiol* **4**, 184-192.

Ibrahim, A., Goebel, B. M., Liesack, W., Griffiths, M. & Stackebrandt E. (1993). The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **114**, 173-178.

Jahnke, K.-D. (1992). Basic computer program for the evaluation of spectroscopic DNA renaturation data from GILFORD System 2006 spectrometer on a PC/XT/AT type personal computer. *J Microbiol Methods* **15**, 61-73.

Kim, W., Song, MO., Song, W., Kim, KJ., Chung, SI., Choi, CS. & Park, YH. (2003). Comparison of 16S rDNA analysis and rep-PCR genomic fingerprinting for molecular identification of *Yersinia pseudotuberculosis*. Antonie Van Leeuwenhoek **83**, 125-133.

Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. (1989). Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acids by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167**.**

Nagano, T., Kiyohara, T., Suzuki, K., Tsubokura, M. & Otsuki, K. (1997). Identification of pathogenic strains within serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis* and the presence of non-pathogenic strains isolated from animals and the environment. *J Vet Med Sci* **59**, 153-158.

Neubauer, H., Meyer, H., Prior, J., Aleksic, S., Hensel, A. & Splettstösser, W. (2000a). A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**, 573-580.

Neubauer, H., Hensel, A., Aleksic, S., Finke, E.-J. & Meyer H. (2000b). *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three different homology clusters. *Int J Med Microbiol* **290**, 61-64.

Neubauer, H., Hensel, A., Aleksic, S. & Meyer, H. (2000c). Specific detection of plasmid bearing *Yersinia* isolates by PCR. *Clin Lab* **46**, 583-587.

Neubauer, H., Molitor, M., Rahalison, L., Aleksic, S., Bakes, H., Chanteau, S. & Meyer, H. (2000d). A semi-automated system for identification of *Yersinia* species within the genus *Yersinia*. *Clin Lab* **46**, 561-567.

Sprague, L. D. & Neubauer, H. (2005). *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 831-835.

Stolz, A., Busse, H.-J.& Kämpfer, P. (2007). *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57,** 572-576.

Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reverse-phased high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**, 125-128.

Tindall, B. J. (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* **13**, 128-130.

Tindall, B. J. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi. FEMS Microbiol Lett* **66**, 199-202.

Tsubokura, M. & Aleksic, S. (1995). A simplified antigenetic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterisation of reference strains and preperation of O and H factor sera. *Contrib Microbiol Immunol* **13,** 99-105**.**

Yokota, A., Akagawa-Matsushita, M., Hiraishi, A., Katayama, Y., Urakami, T. & Yamasato, K. (1992). Distribution of quinone systems in microorganisms: Gram-negative eubacteria. *Bull JFCC* **8**, 136-171.

Table 1: Characterisation of the *Yersinia* isolates of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. similis* sp. nov.

***Yersinia* strain**	origin	source	16S rRNA gene sequence	V-antigen gene*	Adhesin gene#	serotype
$Y111^T$ ($ATCC29833^T$)	Turkey	n.d.	P	-	-	n.d.
$Y36^x$	Germany	guinea pig	P	+	-	III
$Y117^x$	Germany	mara	P	+	-	III
$Y228^T$ ($CCUG\ 52882^T$)$^+$	Germany	rabbit	S	-	-	6
$Y233^+$	Japan	mole	S	+	-	5b
$Y252^+$	Japan	mole	S	+	-	5a

n.d.: not determined; P: 16S rRNA gene sequence type of *Yersinia pseudotuberculosis* $Y111^T$ ($ATCC\ 29833^T$); S: 16S rRNA gene sequence type of strain $Y228^T$ ($CCUG\ 52882^T$; $LMG\ 23763^T$; *: presence of the chromosomally fixed pathogenicity marker V-antigen (Neubauer *et al*. 2000c); #: presence of the plasmid fixed pathogenicity marker adhesin gene (Neubauer *et al*. 2000c).

^{x}: supplied by Dr. G. Wolf, LMU, Faculty of Veterinary Medicine, Munich, Germany; $^+$: supplied by Prof. Dr. S. Aleksic, formerly German National Reference Laboratory for Yersiniosis, Hamburg, Germany.

P and S 16S rRNA gene sequence types: P: 5'-ATTTGGCAGAGATGCTAAA-3'; S: 5'-GATTTGGCAGAGATGCCTTA-3' (Neubauer *et al*., 2000a).

Table 2: Biochemical characterisation of strains of the species *Yersinia pseudotuberculosis* and the proposed species *Yersinia similis* sp. nov. compared to biochemical patterns of *Yersinia* type strains (Table modified according to Sprague & Neubauer, 2005)

Species/ Strains	MEL	RHA	ADH	ODC	GLC	URE	LDC	GLU	ARA	ESC	ONPX	TRE	XYL	H2S	ONPG	SAL	ADO	PGUR	AMY	DUL	BUT	CEL	INO	CIT	IND	INU	LAC	MAL	VP	RAF	SRB	TDA	PCA	SOR	SUC	jGTA	PYR	PROL
Y. mollaretii	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Y. aldovae	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Y. bercovieri	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Y. intermedia	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Y. rhodei	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Y. ent. enterocolitica	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Y. ent. parlearctica	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Y. aleksiciae	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Y. frederiksenii	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Y. kristensenii	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
***Y. pestis** n=40**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**100**	**38**	**100**	**0**	**88**	**10**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**5**	**0**	**0**	**0**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**73**
***Y. pseudotuberculosis** n=36**	**97**	**100**	**0**	**0**	**89**	**100**	**0**	**100**	**81**	**94**	**0**	**94**	**94**	**0**	**75**	**11**	**6**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**64**	**100**	**100**
***Y. similis* sp. nov.* n=3**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**100**	**0**	**100**	**100**	**100**	**0**	**100**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**33**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**33**	**100**	**0**
Y228^{T} CCUG 52882^{T}; LMG 23763^{T}	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Y233	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Y252	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Y. ruckeri	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

+: positive reaction; -: negative reaction; *: % of positive reactors within 40 *Yersinia pestis*, 36 *Y. pseudotuberculosis* (Neubauer *et al*., 2000d) and 3 *Y. similis* sp. nov. strains (present study); MEL: melibiose fermentation, GLC: glycerine fermentation, GLU: glucose fermentation, TRE: trehalose fermentation, SAL: salicin fermentation, AMY: amygdaline fermentation, CEL: cellobiose fermentation, INU: inulin fermentation, RAF: raffinose fermentation, SOR: sorbitol fermentation, γ-GTA: γ-glutamyl-ß-naphtylamide, RHA: rhamnose fermentation, URE: urea, ARA: L-arabinose fermentation, XYL: d-xylose fermentation, ADO: adonitol fermentation, DUL: dulcit fermentation, INO: inositol fermentation, LAC: lactose fermentation, SRB: sorbose fermentation, SUC: saccharose (sucrose) fermentation, PYR: L-pyroglutamic acid-ß-naphylamide, ADH: arginine dihydrolase, LDC: lysine decarboxylase, ESC: esculin, H_2S: hydrogen sulphide, BUT: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl butyrate, CIT: citrate, MAL: malonate, TDA: tryptophan deaminase, PROL: L-proline-ß-naphtylamide, ODC: ornithine decarboxylase, PNPX: p-nitrophenyl-ß-D-xylopyranoside, PNPG: p-nitrophenyl-ß-D-galactopyranoside, PGUR: p-nitrophenyl-ß-glucuronide, IND: indole, VP: Voges Proskauer medium, PCA: pyrazinamide.

Table 3: Chemotaxonomic characteristics of strain Y228^T (*Yersinia similis* sp. nov.; CCUG 52882^T; LMG 23763^T) and type strains of two *Yersinia* reference species, *Y. enterocolitica* Y11^T (DSMZ 13013^T) and *Y. pseudotuberculosis* Y111^T (ATCC 29833^T). Components in the polyamine patterns and quinone systems are given in relative amounts; polar lipids: +++, present in major amounts; ++, present in moderate amounts; +, present in minor amounts; ND: not detected.

	Y228^T (CCUG 52882^T; LMG 23763^T)	*Yersinia enterocolitica* Y11^T (DSMZ 13013^T),	*Yersinia pseudotuberculosis* Y111^T (ATCC 29833^T)
Polyamines			
1,3-diaminopropane	0.9%	1.8%	0.3%
Putrescine	91.8%	94.2%	88.0%
Cadaverine	ND	2.6%	ND
Spermidine	6.4%	1.3%	11.4%
Spermine	0.9%	0.2%	0.3%
Quinones			
Q-8	89%	95%	93%
Q-9	1%	1%	1%
MK-8	10%	4%	6%
Polar lipids*			
PE	+++	+++	+++
DPG	+++	+++	+++
PG	++	++	++
PME	ND	ND	+
APL1	++	++	++
AL1	ND	ND	+
AL2	ND	ND	+

*Abbreviations: PE: phosphatidyl-ethanolamine; DPG: diphosphatidyl-glycerol; PG: phosphatidyl-glycerol; PME: phosphatidylmonomethyl-ethanolamine; APL1: unknown aminophospholipid; AL1, AL2: unknown amino lipids.

Table S1: Results of DNA-DNA hybridisation between strains of the species *Yersinia pseudotuberculosis* and the proposed species *Yersinia similis* sp. nov.

Strain	**Y111^{T}***	**Y36***	**Y117***	**Y228$^{T\#}$**	**Y233$^{\#}$**	**Y252$^{\#}$**
	Yersinia pseudotuberculosis			*Yersinia similis* sp. nov.		
Y111^{T}*	-------					
Y36*	81.0%	------				
Y117*	85.2%	71.5%	------			
Y228$^{T\#}$	53.1%	66.6%	54.0%	------		
Y233$^{\#}$	64.0%	58.8%	59.1%	77.3%	------	
Y252$^{\#}$	59.9%	44.6%	52.0%	83.3%	73.3%	------
Y81^{T}	n.d.	19.1%	7.3%	19.7%	13.9%	14.5%
Y110^{T}	n.d.	22.1%	34.5%	43.7%	12.1%	14.7%

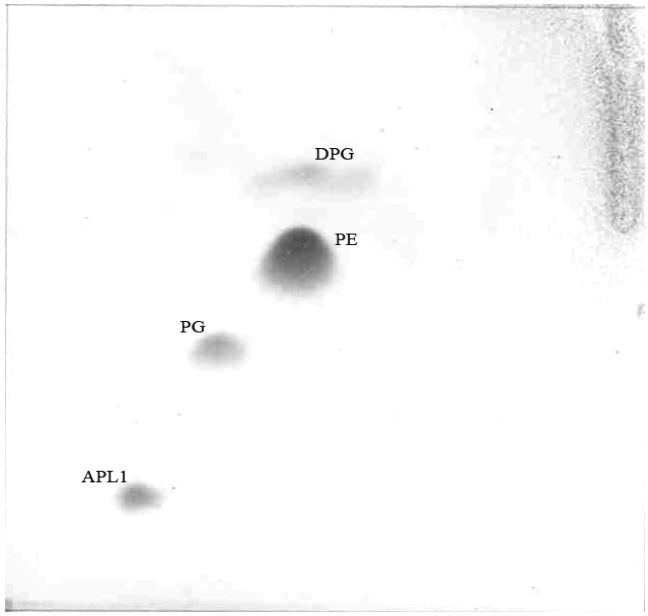
*:16S rRNA gene sequence type P of *Yersinia pseudotuberculosis* Y111^{T} (ATCC 29833^{T});

#:16S rRNA gene sequence type S of *Yersinia similis s*p. nov. Y228^{T} (CCUG 52882^{T}; LMG 23763^{T});

Y81^{T}: *Yersinia ruckeri* (ATCC29473^{T})**;** Y110^{T}: *Yersinia kristensenii* (ATCC 33638^{T});

n.d.: not determined.

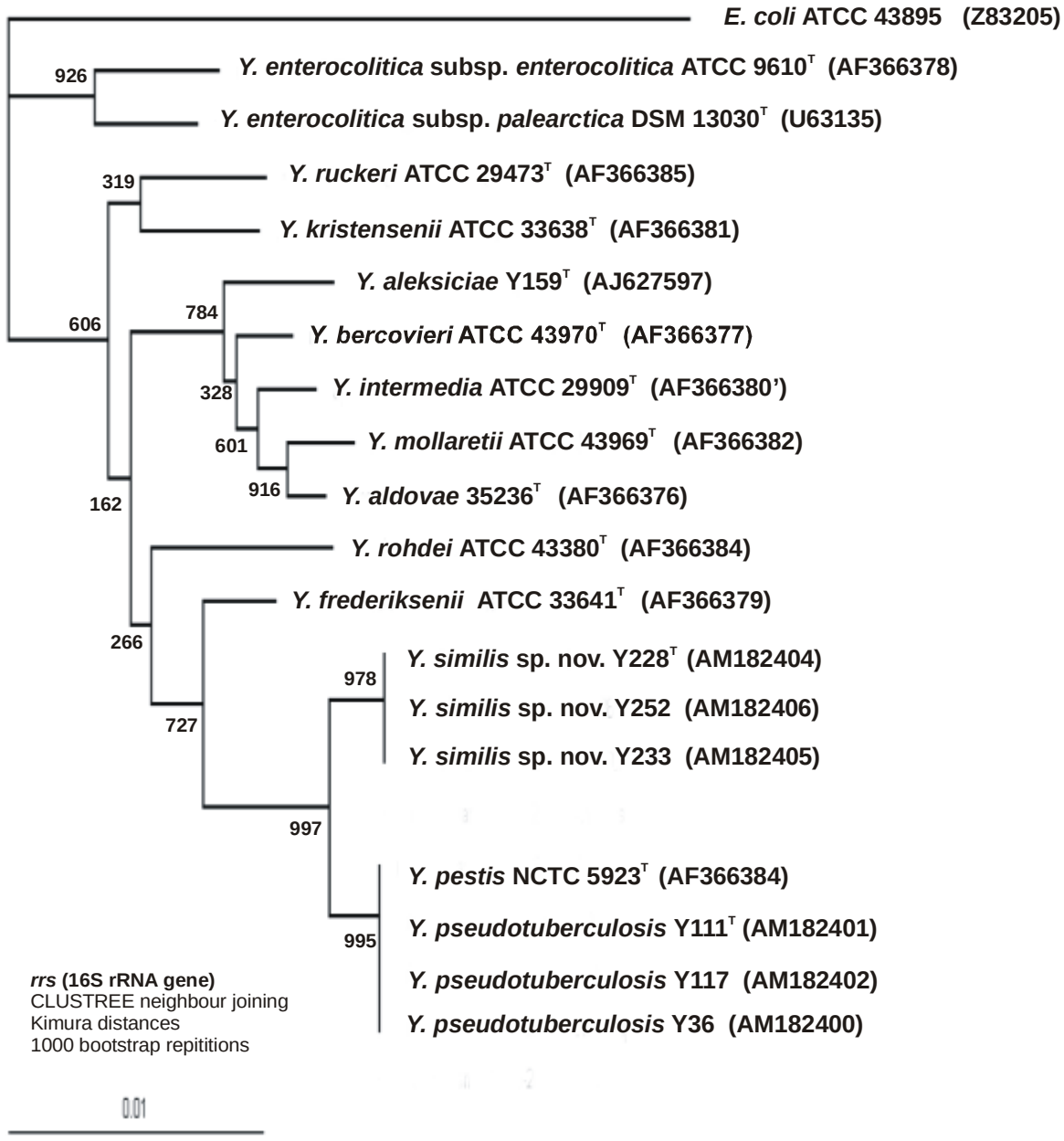
Figure 1: Two-dimensional thin-layer chromatogram of polar lipids of strain Y228^{T} (CCUG 52882^{T}; LMG 23763^{T}). For abbreviations see table 3.



2nd dimension ↑

→ 1st dimension

Figure 2: Phylogenetic tree obtained with 16S rRNA gene sequences (1388 nt) using CLUSTREE neighbour-joining analysis. Scale bar, 0.01 divergent residues per site. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1.000 subsets. The tree was rooted by outgrouping sequence *E. coli* ATCC 43895 (Z83205).



Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich bei Univ.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Diplomarbeit in seinem Labor und die gute Betreuung während dieser Zeit bedanken.

Weiters möchte ich mich herzlich bei Birgit Huber bedanken, die mir immer mit vielen Tipps und Tricks zur Seite stand, vor allem wenn es darum ging die Tücken der PCR zu besiegen.

Allen MitarbeiterInnen am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien, dabei besonders Univ.-Prof. Dr. Renate Rosengarten, gilt ein großes Dankeschön für die herzliche Aufnahme und die nette Zeit, die ich dort verbringen durfte.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Erna und Norbert Amann, die mich immer unterstützt haben und immer für mich da waren!

Und last, but not least ein riesiges Dankeschön an meine Freunde Anna, Clara, Elli, Franzi, Ivan, Johannes, Ludi, Maria, René und ganz besonders Fabi für die Unterstützung. Ohne euch wäre das Leben nur halb so schön!

Curriculum vitae

Name	Sabine Amann
Geburtsdatum	10. November 1982
Geburtsort	Feldkirch
Nationalität	österr.

Ausbildung

1989 – 1993	Volksschule Hohenems Herrenried
1993 – 2001	Bundesgymnasium Dornbirn
2001 – 2007	Studium der Molekularen Biologie mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Zellbiologie und Wissenschaftskommunikation an der Universität Wien

Wissenschaftlicher Werdegang

August 2005

Praktikum im mikrobiologischen Labor des Instituts für Pathologie, LKH Feldkirch

März 2006

Schwerpunktübung Zellbiologie im Labor von F. Probst, Universität Wien

Titel: Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

Mai 2006

Schwerpunktübung Zellbiologie im Labor von R. Foisner, Medizinische Universität Wien

Titel: Lamina associated polypeptide (LAP) 2α

Juni 2006 – Juli 2006

Schwerpunktübungen Mikrobiologie im Labor von H.-J. Busse, Veterinärmedizinische Universität Wien

Titel: Untersuchung zur Klassifizierung von Stämmen der Spezies *Arthrobacter agilis*

August 2006

Praktikum im mikrobiologischen Labor des Instituts für Pathologie, LKH Feldkirch

September 2006 – Juli 2007

Diplomarbeit im Labor von H.-J. Busse, Veterinärmedizinische Universität Wien

September 2007

Tutorin bei den Übungen „Molekulare Systematik“, Universität Wien

Posterpräsentation

Amann, S. and Busse, H. J. Institute for Bacteriology, Mycology and Hygiene, University of Veterinary Medicine, Vienna. (2007).
Is *Yersinia ruckeri* chemotaxonomically distinguishable from other *Yersinia* species?
Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Osnabrück.

Publikation

Sprague, L. D., Scholz, H. C., Amann, S., Busse, H. J. and Neubauer, H. *Yersinia similis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* (submitted).