



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Analyse einer Fosmid-Bibliothek bakterieller Symbionten der
Tannentrieblaus *Adelges nordmannianae*

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

| | |
|--|--|
| Verfasserin / Verfasser: | Thomas Penz |
| Matrikel-Nummer: | 0300687 |
| Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): | A 437 Diplomstudium Biologie/ A 441 Diplomstudium Genetik - Mikrobiologie |
| Betreuerin / Betreuer: | Univ.-Prof. Dr. Matthias Horn |

Wien, im

Jänner 2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| A. EINLEITUNG | 1 |
| A.1 Symbiose | 1 |
| A.1.1 Symbiose zwischen Prokaryoten und Insekten | 2 |
| A.1.1.1 Primäre und sekundäre Endosymbionten | 3 |
| A.1.1.2 Genomstruktur der Endosymbionten | 4 |
| A.2 Adelgidae | 8 |
| A.2.1 <i>Adelges nordmanniana</i> (Eckstein)..... | 9 |
| A.3 Metagenomik..... | 10 |
| A.4 Metagenomische Bibliothek | 11 |
| A.4.1 Konstruktion einer Fosmid Genbibliothek..... | 12 |
| A.4.1.1 Scherung der DNS..... | 12 |
| A.4.1.2 Reparatur der Enden der isolierten DNS | 13 |
| A.4.1.3 Isolierung der DNS-Fragmente mit der richtigen Größe | 13 |
| A.4.1.4 Ligation | 13 |
| A.4.1.5 Verpackung | 13 |
| A.4.1.6 Transduktion..... | 14 |
| A.5 Ziele dieser Arbeit | 14 |
| B. MATERIAL UND METHODEN | 15 |
| B.1. Technische Geräte | 15 |
| B.2 Verbrauchsmaterialien | 16 |
| B.3 Chemikalien | 16 |
| B.4 Kits | 18 |
| B.5 Enzyme | 18 |
| B.6 Organismen..... | 18 |
| B.7 Primer | 19 |
| B.8 Software | 21 |
| B.9 Puffer, Nährmedien und allgemeine Lösungen | 21 |
| B.9.1 Puffer, Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese | 21 |
| TAE-Puffer | 21 |
| TBE-Puffer | 22 |
| Auftragspuffer | 22 |
| Ethidiumbromid-Lösung..... | 22 |
| SYBR [®] Green I-Lösung | 23 |
| DNS-Längenstandards..... | 23 |
| B.9.2 Nährmedien | 24 |
| Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) | 24 |
| Luria-Bertani-Medium + 7% Glycerol: | 24 |
| B.9.3 Antibiotika-Lösungen | 24 |
| Ampicillin-Stammlösung | 25 |
| Kanamycin-Stammlösung | 25 |
| Chloramphenicol-Stammlösung..... | 25 |
| B.9.4 Selektionslösungen | 25 |
| B.9.5 Lösungen für Plasmid-Miniprep | 26 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Puffer P1..... | 26 |
| NaOH/SDS – Lösung..... | 26 |
| Kaliumacetat/Acetat – Lösung..... | 26 |
| B.10. Vorversuche zur Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek..... | 26 |
| B.10.1 Quantitative Untersuchung der DNS mittels Photometrie..... | 26 |
| B.10.2 <i>In vitro</i> -Amplifizierung von 23S rRNS-Genen von TTL1 und TTL4 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 27 |
| B.10.3 Qualitative Untersuchung der <i>in vitro</i> -amplifizierten 23S rRNS Gen-Fragmente von TTL1 und TTL4 durch Agarose-Gelelektrophorese..... | 28 |
| B.10.3.1 Agarose-Gelelektrophorese..... | 28 |
| B.10.3.2 DNS-Detektion..... | 29 |
| B.10.3.3 DNS-Größenbestimmung..... | 29 |
| B.10.4 Klonierung der <i>in vitro</i> -amplifizierten 23S rRNS Gene von TTL1 und TTL4 mit dem TOPO TA Cloning® Kit..... | 30 |
| B.10.4.1 Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus einem Agarose-Gel..... | 30 |
| B.10.4.2 Ligation..... | 30 |
| B.10.4.3 Transformation..... | 31 |
| B.10.5 Anzucht rekombinanter <i>E. coli</i> Stämme..... | 31 |
| B.10.6 Identifizierung rekombinanter Klone..... | 32 |
| B.10.6.1 Insert-Nachweiß mittels Blau-Weiß-Selektion..... | 32 |
| B.10.6.2 Größenbestimmung des klonierten Inserts mittels PCR..... | 32 |
| B.10.6.3 Unterscheidung gleich großer Inserts mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)..... | 33 |
| B.10.6.4 Sequenzierung der Inserts mit verschiedenen RFLP-Mustern..... | 34 |
| B.10.6.5 Analyse der Sequenzdaten..... | 34 |
| B.10.7 Anzucht der transformierten <i>E. coli</i> -Zellen..... | 35 |
| B.10.8 Stammhaltung rekombinanter <i>E. coli</i> Stämme..... | 35 |
| B.10.9 <i>E. coli</i> Plasmid Isolierung..... | 35 |
| B.10.10 Einstellen der Primer für die 23S rRNS Sequenz für TTL1 und TTL4 mittels Gradienten-PCR..... | 36 |
| B.11 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek..... | 37 |
| B.11.1 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek..... | 37 |
| B.11.2 Anzucht rekombinanter <i>E. coli</i> Fosmid Stämme in 96 MicroWell™ Platten..... | 37 |
| B.11.3 Stammhaltung rekombinanter <i>E. coli</i> Fosmid Stämme in 96 MicroWell™ Platten..... | 38 |
| B.12 Austesten der Analysebedingungen..... | 38 |
| B.12.1 Ermittlung der notwendigen Zellzahl..... | 39 |
| B.12.2 Ermittlung der notwendigen Fosmidzahl..... | 40 |
| B.13 Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek..... | 40 |
| B.13.1 Poolen der 96 MicroWell™ Platten mit den angezüchteten Fosmid Klonen..... | 41 |
| B.13.2 Fosmid DNS Isolierung aus den Platten-Pools..... | 41 |
| B.13.3 Quantitative Untersuchung der isolierten Fosmid DNS mittels Photometrie..... | 42 |
| B.13.4 Aliquotieren und Verdünnen der isolierten Fosmid DNS..... | 42 |
| B.13.5 PCR der aus Platten-Pools isolierten Fosmid DNS..... | 43 |
| B.13.6 Poolen der Reihen und Spalten positiver Platten-Pools..... | 45 |
| B.13.7 PCR-Analyse von Reihen- und Spalten-Pools positiver Platten-Pools..... | 45 |
| B.14 Isolierung der Fosmid Klone mit 16S bzw. 23S rRNS von TTL1 und TTL4..... | 47 |
| B.14.1 Vereinzelung der Fosmid Klone..... | 47 |
| B.14.2 Isolierung der Fosmid Klone..... | 47 |
| B.14.3 Fosmid DNS-Isolierung..... | 47 |
| B.14.4 Stammhaltung der Fosmid Klone..... | 48 |
| B.15 Analyse der Fosmid Klone mit dem 16S bzw. 23S rRNS Gen von TTL1..... | 48 |
| B.15.1 rRNS Operonanalyse..... | 48 |
| B.15.2 Größenbestimmung der Fosmide durch RFLP und PFGE..... | 48 |
| B.15.2.1 RFLP der Fosmid DNS..... | 49 |
| B.15.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese..... | 49 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| B.15.3 Sequenzanalyse der Fosmide | 50 |
| B.15.3.1 Sequenzanalyse der 16 und 23S rRNS Gene | 50 |
| B.15.3.2 Sequenzanalyse der Fosmid-Enden..... | 51 |
| B.15.3.3 Sequenzanalyse ausgewählter Fosmide..... | 51 |
| B.15.4 Annotation der sequenzierten Fosmide | 52 |
| | |
| C. ERGEBNISSE | 53 |
| | |
| C.1 Vorversuche zur Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek | 53 |
| C.1.1 <i>In vitro</i> -Amplifizierung und Klonierung der 23S rRNS-Genen der Endosymbionten TTL1 und TTL4..... | 53 |
| C.1.2 Einstellen der Primer für die 23S rRNS Sequenz für TTL1 und TTL4 | 54 |
| C.2 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek | 55 |
| C.3 Austesten der Analysebedingungen | 55 |
| C.3.1 Ermittlung der notwendigen Zellzahl | 55 |
| C.3.2 Ermittlung der notwendigen Fosmidzahl | 56 |
| C.4 Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek..... | 56 |
| C.4.1 PCR-Analyse der aus Platten-Pools isolierten Fosmid DNS..... | 56 |
| C.4.1. Ergebnisse der Analyse der Platten-Pools für die 16S und 23S rRNS Gene von TTL1 | 57 |
| C.4.1.2 Ergebnisse der Analyse der Platten-Pools für die 16S und 23S rRNS Gene von TTL4 | 58 |
| C.4.2 PCR-Analyse von Reihen- und Spalten-Pools positiver Platten-Pools | 59 |
| C.4.2.1 TTL1 Analyse-Ergebnisse der Reihen- und Spalten-Pools | 59 |
| C.4.2.2 TTL4 Analyse-Ergebnisse der Reihen- und Spalten-Pools | 61 |
| C.5 Analyse der Fosmid Klone mit der 16S bzw. 23 S rRNS von TTL1..... | 62 |
| C.5.1 rRNS Operonanalyse | 62 |
| C.5.2 Größenbestimmung der Fosmide durch RFLP und PFGE..... | 63 |
| C.5.3 Sequenzanalyse der Fosmide | 65 |
| C.5.3.1 Sequenzanalyse der 16S und 23S rRNS Gene..... | 65 |
| C.5.3.2 Sequenzanalyse der Fosmid-Enden | 66 |
| C.5.3.3 Sequenzanalyse ausgewählter Fosmide | 67 |
| C.5.4 Annotation der sequenzierten Fosmide | 69 |
| | |
| D. DISKUSSION | 73 |
| | |
| D.1 Vorversuche zur Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek | 73 |
| D.1.1 <i>In vitro</i> -Amplifizierung und Klonierung der 23S rRNS-Genen der Endosymbionten TTL1 und TTL4..... | 73 |
| D.2 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek | 74 |
| D.3 Austesten der Analysebedingungen | 75 |
| D.4 Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek..... | 76 |
| D.4.1 PCR-Analyse der 16S und 23S rRNS Gene von TTL1 | 76 |
| D.4.2 PCR-Analyse der 16S und 23S rRNS Gene von TTL4..... | 77 |
| D.5 Analyse der Fosmid Klone mit der 16S bzw. 23 S rRNS von TTL1..... | 79 |
| D.5.1 Größenbestimmung der Fosmide durch RFLP und PFGE..... | 79 |
| D.5.2 Sequenzanalyse der Fosmide | 80 |
| D.5.2.1 Sequenzanalyse der 16S und 23S rRNS Gene..... | 80 |
| D.5.2.2 Sequenzanalyse der Fosmid-Enden | 80 |
| D.5.2.3 Sequenzanalyse und Annotation ausgewählter Fosmide..... | 80 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|-----------|
| E. REFERENZEN | 82 |
| G. ANHANG | 93 |
| G.1 Abkürzungen..... | 93 |
| G.2 Zusammenfassung..... | 95 |
| G.3 Summary | 96 |
| G.4 Curriculum vitae..... | 97 |
| G.5 Danksagung | 98 |

A. Einleitung

A.1 Symbiose

Der Begriff Symbiose wurde erstmals 1878 von Anton De Bary in die Biologie eingeführt (De Bary 1879). Symbiosen sind in der Natur weit verbreitet. Nach der Definition von De Bary beschreibt Symbiose im Allgemeinen die Interaktion zwischen verschiedenen Organismen. Symbiosen können räumlich in zwei verschiedene Gruppen geteilt werden: die Endosymbiose (Valdivia 2007), wie zwischen Blattläusen und dem Gammaproteobakterium *Buchnera aphidicola* (Buchner 1965), und die Ektosymbiose, die es zwischen Bakterien und Ziliaten gibt (Rosati 2006). Bei der Ektosymbiose bleiben die Partner der Symbiose körperlich getrennt, wohingegen bei der Endosymbiose keine räumliche Trennung dieser Partner mehr vorliegt. Bei der Endosymbiose befindet sich ein Partner, der Endosymbiont, im Körper des anderen Partners, nämlich in dem des Wirtes.

Aus dem Grad der wechselseitigen Abhängigkeit zwischen den Organismen ergeben sich drei Unterscheidungsmöglichkeiten der Symbiose: der Mutualismus (Boucher 1984), der Kommensalismus (White 1973) und der Parasitismus (Charles 2004).

Im Falle einer mutualistischen Beziehung zwischen zwei Organismen profitieren beide davon, Wirt und Symbiont. Keiner der beiden zieht aus dieser Beziehung einen Nachteil. Eine gut untersuchte mutualistische Symbiose findet man in der Natur zwischen höheren Pflanzen und den Bakterien der Gattung *Rhizobium*. In diesem Beispiel dienen die Bakterien der Stickstofffixierung. Für den erhaltenen Stickstoff werden die Bakterien von den Pflanzen mit Kohlenhydraten versorgt (Kuykendall 1976).

Beim Kommensalismus hingegen profitiert nur einer der beiden Partner. Dem anderen wird durch diese Beziehung weder geholfen noch geschadet. Ein sehr bekanntes Beispiel für den Kommensalismus ist die Beziehung zwischen dem Clownfisch und der Seeanemone (Mebis 1994). Die Seeanemone bietet dem Clownfisch Schutz, wohingegen der Clownfisch keinen Beitrag zu dieser Beziehung leistet.

Der Parasitismus ist eine Form der Symbiose, wo wiederum nur ein Partner von dieser Beziehung profitiert, dem anderen schadet diese Beziehung aber.

Beispiele für parasitische Symbiosen gibt es zwischen Umweltchlamydien und Protozoen (Horn 2008). Manche dieser intrazellulären Symbionten sind nicht fähig primäre Metaboliten selbst zu synthetisieren. Diese Symbionten sind daher in der Lage diese primären Metaboliten über Transportsysteme aus dem Wirtszytosol aufzunehmen (Haferkamp 2004, Horn 2004) und betreiben somit Energieparasitismus.

A.1.1 Symbiose zwischen Prokaryoten und Insekten

Gesellschaften zwischen Insekten und Prokaryoten sind in der Natur weit verbreitet (Baumann 2000). Es wird geschätzt, dass mehr als 15-20% aller Insekten in einer symbiotischen Beziehung mit Prokaryoten leben (Buchner 1965, Douglas 1998). Die erste Symbiose von Bakterien mit Insekten liegt wahrscheinlich etwa 300 Millionen Jahre zurück (Moran 1998) und war für die Entwicklung einiger Insektenlinien von entscheidender Bedeutung (Douglas 1989). Im speziellen Fall von *Sulcia*, einem bakteriellen Endosymbionten von Zikaden, zeigen phylogenetische Analysen, dass diese Symbiose bis auf das mittlere Perm (270 Millionen Jahre) zurückgeht (Moran 2005).

Bakterielle Symbionten können den Wirt, das Insekt, auf verschiedene Arten beeinflussen. Sie können dem Wirt wichtige Nährstoffe liefern (Douglas 1998), ihn vor Stress oder natürlichen Feinden schützen und ihn in der Reproduktion beeinflussen (Moran 2008).

Eine symbiotische Beziehung muss aber nicht immer von Vorteil sein, sondern es können sich auch Nachteile für den Wirt ergeben. In vielen Fällen, wie unter anderen auch bei *Wolbachia* sind dies zum Beispiel reduziertes Wachstum (Chen 2000) und Feminisierung (Werren 2008).

Das Vorkommen einiger bakterieller Endosymbionten von Insekten ist auf spezielle Organe beschränkt, nämlich auf das Bakteriom. Dieses Bakteriom besteht aus Wirtszellen, die Bakteriozyten genannt werden (Buchner 1965, Douglas 1989). Bakteriozyten-assoziierte Bakterien werden vertikal von der Mutter auf die Nachkommenschaft weitergegeben (Buchner 1965).

Die wohl bekannteste Bakteriozyten-assoziierte Symbiose kommt zwischen Blattläusen (*Aphididae*) und dem bakteriellen Endosymbionten *Buchnera aphidicola* vor (Munson 1991). Man findet *Buchnera* aber auch in anderen Insekten-Prokarioten-Systemen: Tsetse Fliegen, Kakerlaken, Rüsselkäfer, Schildläuse, Blattflöhe und anderen Insektengruppen (Baumann 2000).

A.1.1.1 Primäre und sekundäre Endosymbionten

Die Assoziation der Prokaryoten mit den Insekten kann man in zwei Kategorien einteilen: die primären (P-) und die sekundären (S-) Symbionten (Moran 2008).

P-Endosymbionten sind essentiell für das Überleben des Wirtes. Sie sind obligate Mutualisten, Bakteriozyten-assoziiert und spielen bei der Entwicklung des Wirtes eine große Rolle. Eine der wichtigsten Funktion dieser P-Endosymbionten ist der Ausgleich der unausgewogenen Ernährung des Wirtes, zum Beispiel die Synthese essentieller Aminosäuren, die für das Überleben des Wirtes unverzichtbar sind (Douglas 1998). Zwischen den P-Endosymbionten und dem Wirt tritt in den meisten Fällen eine Kokladogenese auf. Die phylogenetischen Stammbäume bestimmter Gene der P-Endosymbionten und bestimmter Gene des Wirtes weisen Ähnlichkeiten untereinander auf (Munson 1991). Das lässt darauf schließen, dass es eine gemeinsame Evolution gegeben hat und die Wirt-Symbionten-Beziehung sehr eng und alt ist. Einige Beispiele für primäre Insekten-Symbionten sind *Sulcia* in Zikaden (McCutcheon 2007), *Blattabacterium* in Kakerlaken (Bandi 1995), *Rickettsia* in Staubläusen (Perotti 2006), *Tremblaya* in Wanzen (Baumann 2005) und *Buchnera* in Blattläusen (Buchnera 1965).

Neben den Assoziationen mit P-Endosymbionten gibt es auch Assoziationen mit S-Endosymbionten bei Insekten. Die Funktion dieser S-Endosymbionten ist in einigen Fällen positiv. Sie kann aber auch negativ oder in nicht erkennbar in Bezug auf den Wirt sein. S-Endosymbionten sind nicht essentiell für den Wirt, bringen ihm aber in vielen Fällen Vorteile. Sie bieten dem Wirt Vorteile bei Hitzestress oder schützen ihn vor parasitischen Wespen (Oliver 2003). Beispiele für die negative Auswirkung dieser S-Endosymbionten auf ihren Wirt sind die negative Beeinflussung in seinem Wachstum, seiner Reproduktion und seiner Lebensdauer (Chen 2000). S-Endosymbionten ähneln invasiven Pathogenen, da sie nicht wie die P-Endosymbionten auf ein bestimmtes Organ beschränkt sind, sondern in vielen

unterschiedlichen Zelltypen des Wirtes vorkommen können (Fukatsu 1996). Beispiele für sekundäre Insekten-Symbionten sind unter anderen *Wolbachia* (Stouthamer 1999), *Cardinium* (Zchori-Fein 2004), *Sodalis* in Tsetse Fliegen (Toh 2006), *Hamiltonella* (Moran 2005) und *Serratia* in Blattläusen (Moran 2005).

A.1.1.2 Genomstruktur der Endosymbionten

Neben den schon erwähnten Merkmalen besitzen bakterielle Endosymbionten von Insekten noch ganz spezielle genomische Merkmale, die sie von frei lebenden Bakterien sehr unterscheiden. Oft wird von einem „Symbiotische Syndrom“ (Rispe 2004) gesprochen. Merkmale dieses „Symbiotische Syndroms“ sind (1) ein Anstieg der Sequenzveränderung (Moran 1996), (2) eine Häufung von nicht-synonymen Substitutionen im Vergleich zu synonymen Substitutionen (Clark 1999, Moran 1996), (3) der A+T Reichtum in den Genen der Endosymbionten (Shigenobu 2000), (4) die Häufung von Deletionen (Moran 1996) und (5) die Häufung von Mutationen in der 16S rRNS (Lambert 1998).

Ein besonderes Merkmal obligat intrazellulärer Bakterien ist, dass sie im Vergleich zu ihren nächsten frei lebenden Verwandten in ihrer Größe reduzierte Genome besitzen (Moran 2002). Diese Genomgrößen reichen von 160-800 kb (Moran 2008). Das Genom von *Buchnera*, je nach Stamm, hat eine Größe von 416-641 kb, was im Vergleich zur Genomgröße von *E. coli* (4,6 mb) weniger als ein Siebentel ist (Blattner 1997, Shigenobu 2000). Es gibt aber noch kleinere Genome von Endosymbionten. Das bis heute am kleinsten bekannte Genom stammt von einem Endosymbionten eines Blattfloh, *Carsonella ruddii*. Dieses Genom besitzt eine Größe von nur 160 kb (Nakabachi 2006).

Im Gegensatz zu den obligat intrazellulären Bakterien, die eine Genomgröße unter einer mb besitzen, haben fakultativ intrazelluläre Bakterien ein weniger reduziertes Genom.

Ein Grund für die reduktive Evolution ist der Verlust von Genen, die für den intrazellulären Lebensstil nicht mehr essentiell sind. In diesen Endosymbionten fehlen oft Gene für grundlegende zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel für die Transkription, Translation, Replikation, Zellteilung, Biosynthese von Phospholipiden, und Gene für Reparatur und Rekombination von DNS (Moran 2001). In machen

Einleitung

Fällen sind im Wirt orthologe Gene zu denen des Endosymbionten vorhanden und werden nicht mehr gebraucht, da der Endosymbiont Protein- oder Stoffwechselprodukte der Wirts-Gene importieren kann. Bei *Buchnera* fehlen zum Beispiel Gene, die für die Synthese nicht-essentieller Aminosäuren notwendig sind (Shigenobu 2000). Ebenso fehlen Gene für die Biosynthese von Oberflächenproteinen. Wenn kein Selektionsdruck auf diese bestimmten Gene herrscht und sich Mutationen in diesen Genen häufen, kann es zur Inaktivierung dieser kommen. Die intrazelluläre Umgebung fungiert hier als Flaschenhals, denn hier kann es nicht mehr zum Austausch von genetischem Material mit Bakterien einer anderen Population kommen und so fixiert sich diese Mutation in dieser Population. Der letzte Schritt in dieser Kette ist die Deletion dieses Genes (Andersson 1998, Wixon 2001). Rückmutationen von einzelnen mutierten Basen sind sehr selten. Auch Gene, die bereits deletiert wurden, können nicht mehr zurückkommen. Dieser Prozess ist auch unter dem Namen „Muller's ratchet“ bekannt (Muller 1964).

Wenn das reduzierte *Buchnera* Genom auf der Ebene der Gene mit dem von *E. coli* verglichen wird, ist das *Buchnera* Gen-Set ist nichts anderes, als ein Gen-Sub-Set von *E. coli*.

In Bezug auf die frühe Wirtsinvasion ist es nicht möglich zu sagen, ob bei der frühen Symbiose im Falle von *Buchnera*, Gene für die Wirtsinvasion involviert waren, da *Buchnera* keine Gene für die Wirtsinvasion besitzt. Die Gene für die Wirtsinvasion könnten aber vor Millionen von Jahren noch vorhanden gewesen sein. In manchen Symbionten aber, wie *Sodalis glossinidius*, der Symbiont der Tsetse Fliege, in Symbionten von Rüsselkäfern und manchen weniger reduzierten S-Endosymbionten findet man ein Typ III Sekretionssystem (Dale 2001, 2002, 2005). Dieses Typ III Sekretionssystem hilft den Symbionten bei der Invasion in eine Wirtszelle.

Eine weitere Besonderheit des Genoms von Endosymbionten ist der hohe A+T Gehalt im Genom. Er ist im Vergleich zu anderen frei lebenden Prokarioten relativ hoch und der Mutations-Bias geht eindeutig in Richtung der Basen A+T, als zu G+C (Moran 1996). Der A+T Gehalt von sehr reduzierten Endosymbionten bewegt sich im Bereich von 67-83,5 %, wohingegen der von frei lebenden Bakterien nahe an 50% liegt (Shigenobu 2000, Moran 2008).

Eine mögliche Erklärung für den hohen A+T Gehalt könnte auf den Metabolismus zurückgehen. CTP und GTP Nukleotide sind energetisch teurer als ATP und UTP

Einleitung

(Rocha 2002). Weitere Theorien besagen, dass GC Basen leichter als AT Basen mutieren können (Graur 2000).

In den Genomen der Endosymbionten *Buchnera aphidicola* und *Blochmannia pennsylvanicus* wurde noch eine weitere Besonderheit gefunden. In den ORF's wurden lange Poly-A Abschnitte von 10 A's und mehr entdeckt. Diese Poly-A Abschnitte zerstören oft den Leserahmen dieser Gene. In der Vergangenheit sind diese Gene als Pseudogene identifiziert wurden. Durch ein Phänomen bei dem die DNS-Polymerase aber über diese Poly-A's gleitet, wird der korrekte Leserahmen wieder hergestellt (Tamas 2008).

Eine andere besondere Charakteristik bakterieller Endosymbionten ist, dass die intergenischen Spacer-Regionen fehlen, wie im Fall von *Carsonella*. Bei diesem Beispiel von *Carsonella* überlappen die Gene und haben gemeinsame Start- und Stopp-Kodons. Die meisten benachbarten Gene haben die Sequenz ATGA, wobei hier das erste Triplet als Start-Kodon für das nächste Gen ist und TGA das Stopp-Kodon vom vorhergehenden (Clark 2001).

Eine eigentümliche Besonderheit von Endosymbionten ist die Häufung von nicht-synonymen Substitutionen im Vergleich zu synonymen Substitutionen der Aminosäurekodons (Clark 1999). Bei nicht-synonymen Substitutionen wird ein Nukleotid im Aminosäure-Kodon ausgetauscht, das eine Änderung der kodierten Aminosäure zur Folge hat. Dieser Prozess trägt deutlich zur Reduktion der endosymbiotischen Genome bei (Rispe 2004).

Weiters besitzen intrazelluläre bakterielle Symbionten oft mehrere Kopien ihres Genoms. Dieser Umstand hängt allerdings vom Entwicklungsstadium des Wirtes ab. *Buchnera* hat oft 50 bis 100 Chromosomkopien. Die Funktion dieser Polyploidie ist allerdings nicht klar. Es besteht die Möglichkeit, dass im *Buchnera* Genom Gene, die für die Kopienanzahl der Chromosomen während der Zellteilung zuständig sind, durch den genetischen Drift verloren gegangen sind. Als anderer bzw. als weiterer Grund für die große Kopienanzahl der Chromosomen kommt die Genomstabilität in Frage (Komaki 1999). Da einigen Symbionten DNS-Reparatur Systeme fehlen, wird durch die große Anzahl an Chromosomen die Genomstabilität erhöht.

Wie schon erwähnt fehlen manchen Insektenendosymbionten, wie manchen *Buchnera* Stämmen, einige Komponenten des DNS Reparatur- und Rekombinationssystems. Die wichtigste Komponente bei der homologen Rekombination *recA* ist nicht vorhanden, das weitere für die homologe

Einleitung

Rekombination benötigte Cluster *recBCD* hingegen schon. Wichtige Komponenten des SOS Reperaturmechanismus sind im *Buchnera* Genom ebenfalls abwesend. Es fehlen *lexA*, *umuCD* und *uvrABC*. Auch Gene für die DNS-Methylierung und die Restriktion von DNS sind ferner nicht vorhanden (Shigenobu 2000). Das alles lässt darauf schließen, dass das *Buchnera* Genom sehr verwundbar ist.

Ebenso ist der Verlust von rRNS Genen in Endosymbionten wie *Buchnera* signifikant. Es gibt nur eine Kopie von der 16S, 23S und der 5S rRNS. *E. coli* hat im Vergleich dazu sieben rRNS Operons (Blattner 1997). Wenn aber im Falle von *Buchnera* die Kopienanzahl der Chromosomen mit einbezogen wird, reicht dieses eine rRNS Operon mit Sicherheit aus. Die rRNS Gene von *Buchnera* liegen auch nicht in einem Operon zusammen, sondern sind im Genom verteilt. Die 16S rRNS ist von den beiden weiteren ribosomalen Genen 23S und 5S rRNS, die zusammen ein gemeinsames Operon bilden, getrennt (Unterman 1989). Die Stabilität der Domäne I der 16S rRNS ist in Endosymbionten um 15-25% niedriger, als bei ihren frei lebenden Verwandten (Lambert 1998). Die tRNS Gene sind hier auch drastisch reduziert. Im Vergleich zu den 86 tRNS Genen von *E. coli* hat *Buchnera* nur 32, oft für jede Aminosäure nur ein tRNS Gen.

Um all diese Reduktionen des Genoms zu kompensieren, gibt es in diesen Endosymbionten spezielle Mechanismen.

Ein spezieller Mechanismus um dieses „Symbiotische Syndrom“ auszugleichen ist die Überexpression des Chaperons GroEL, das in der Proteinfaltung, Translokation von Proteinen durch Membranen und der Erholung von Umweltstress eine entscheidende Rolle spielt. Das Chaperon GroEL nimmt einen Anteil von 10% der gesamt exprimierten Proteine in *Buchnera* ein (Baumann 1996). Es wird vermutet, dass durch die Häufigkeit dieser Chaperone Proteine, die Mutationen wie Deletionen oder Aminosäureaustauschvorgänge enthalten, korrekt gefaltet werden. Wenn diese veränderten Proteine nicht funktionstüchtig sind, können sie durch die Mithilfe der Chaperone leichter degradiert werden. Die drastisch erhöhte Expression von GroEL maskiert anfallende Mutationen (Fares 2002).

Eine andere Maßnahme um den Effekt des „Symbiotischen Syndroms“ zu puffern ist die große Kopienanzahl der Chromosomen (Komaki 1999).

A.2 Adelgidae

Die Adelgiden sind eine kleine Familie innerhalb der Insekten, die zur Ordnung der Hemiptera gehört (Tabelle A.1). Sie kommen, wie auch ihre Wirtspflanzen, hauptsächlich auf der nördlichen Hemisphäre vor. In Mitteleuropa sind etwa 20 Arten der Adelgiden bekannt. Adelgiden leben auf Gymnospermen und nicht wie ihre nächsten Verwandten der Phylloxeroidea und die der Aphididae auf Angiospermen. Von den Gymnospermen werden bis auf wenige Ausnahmen die Pinaceen bevorzugt (von Dohlen 2000). Auf diesen Pinaceen saugen sie nicht wie ihre Verwandten, die Aphididae, Phloem (Moran 2003), sondern Xylem oder den Saft von Parenchymzellen, die von Xylem umgeben sind (Puritch 1971). Das Xylem enthält im Gegensatz zum kohlenhydratreichen Phloem anorganische Stickstoffverbindungen und keine Kohlenhydratkomponenten.

Die Adelgiden haben komplexe Generationszyklen. Sie sind zyklisch parthogenetisch und führen einen Holozyklus durch. D.h., dass parthenogenetische Organismen eine sexuelle Generation in ihrem Lebenszyklus besitzen. Ein Holozyklus besteht im Prinzip aus fünf Generationen und dauert zwei Jahre. Davon werden drei Generationen auf dem primären Wirt der Fichte (*Picea* spp.) und zwei auf dem sekundären Wirt einer anderen Konifere (*Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, oder *Pinus*) durchgeführt (Havill 2007).

Viele von den Adelgiden sind Pflanzenschädlinge und können ganze Wälder zerstören (Stürzer-Gilbert 1982).

In Adelgiden wurden auch, wie in den Aphididae (Buchnera 1965), bakterielle Endosymbionten gefunden (Tönshoff 2004). Anders als bei den Aphididae sind diese hier noch wenig beschrieben. Die P-Endosymbionten der Adelgiden leben in Bakteriozyten, während sich die S-Endosymbionten außerhalb der Bakteriozyten befinden (Buchner 1965, Profft 1937, Steffan 1968). Die spezifische Rolle, die die bakteriellen Endosymbionten für die Adelgiden spielen, ist nicht bekannt (Havill 2007). Es wurde aber gezeigt, dass eine Behandlung der Adelgiden mit Antibiotika deren Endosymbionten tötete. Der Verlust der Endosymbionten führte bei den Adelgiden ebenfalls zum Tod (Shields 2005). Hiermit wurde gezeigt, dass die Endosymbionten eine wichtige Rolle für die Adelgiden spielen.

Neue Wege zur Bekämpfung dieser Pflanzenschädlinge, ohne chemische Mittel einzusetzen, werden durch die Untersuchung der bakteriellen Endosymbionten, die

Einleitung

in den Adelgiden leben, eröffnet. Durch die Untersuchung der bakteriellen Endosymbionten gewinnt man ein besseres Verständnis für die Wirt-Symbionten-Beziehung.

Tabelle A.1: Wissenschaftliche Klassifikation der Adelgiden

| | |
|---------------------|----------------|
| Reich | Animalia |
| Phylum | Arthropoda |
| Klasse | Insecta |
| Ordnung | Hemiptera |
| Unterordnung | Sternorrhyncha |
| Überfamilie | Phylloxeroidea |
| Familie | Adelgidae |

A.2.1 *Adelges nordmannianae* (Eckstein)

Um 1840 wurde die Tannentrieblaus (*Adelges nordmannianae*) vom westlichen Kaukasus mit Nordmannstannen (*Abies nordmanniana*) nach Mitteleuropa eingeschleppt. Von da an breitete sie sich rasch über ganz Mitteleuropa aus (Eichhorn 1969). Ihr Primärwirt ist die Orientfichte (*Picea orientalis*) und der Sekundärwirt die Nordmantanne (*Abies nordmanniana*) (Steffan 1968). In Europa aber vollzog *Adelges nordmannianae* einen Wirtswechsel, nämlich von der Nordmantanne zur Weißtanne (*Abies alba*).

Besonders gefährlich ist *Adelges nordmannianae* für Nordmantannenchristbaumkulturen. Das Insekt, das zwei Endosymbionten der Klasse der Gammaproteobakterien besitzt, nämlich TTL1 und TTL4 (Tönshoff 2004), saugt an den Trieben der Tannen Xylem. Dies führt dazu, dass die Triebe der Tanne nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt sind und dann absterben. In weiterer Folge sterben ganze Bäume.

Adelges nordmannianae ist ein sonnenliebendes Insekt und befällt vor allem an sonnenexponierten Stellen freistehende Tannen.

A.3 Metagenomik

Die Metagenomik ist ein relativ neues Feld in der Biologie. Der Begriff Metagenom wurde erstmals 1998 in einer Publikation von Jo Handelsmann erwähnt (Handelsmann 1998). Laut Definition ist Metagenomik die genomische Analyse von Mikroorganismen durch die direkte Extraktion und Klonierung von DNS einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Der metagenomische Ansatz wurde entwickelt, um die Gesamtheit einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft zu untersuchen. Es gab schon vor der Metagenomik Ansätze um eine mikrobielle Lebensgemeinschaft zu charakterisieren. Diese Ansätze werden neben der Metagenomik heute noch verwendet. Die ersten Meilensteine wurden durch die Lichtmikroskopie gelegt. Antonie van Leeuwenhoek sah 1663 zum ersten Mal eine bakterielle Zelle. Einen weiteren Meilenstein in der Mikrobiologie legte Carl Woese, der zeigte, dass man rRNS Gene als evolutionären Maßstab verwenden kann (Woese 1987). Pace und Stahl kreierten einen neuen Zweig der Mikrobiologie, indem sie direkt die Sequenzen der 5S und 16S rRNS Gene aus mikrobiellen Lebensgemeinschaften nahmen, um die mikrobielle Diversität einer Umweltprobe ohne die Bakterien kultivieren zu müssen, erfassten (Pace 1986, Stahl 1985). Mit diesem rRNS Ansatz kann man aber nur Aussagen über die Anwesenheit eines Mikroorganismus und dessen evolutionäre Beziehung zu anderen treffen.

Metagenomik kann aber mehr. Neben den Aussagen des rRNS Ansatzes kann man auch noch Aussagen über die Physiologie und Genetik der unkultivierbaren Bakterien treffen.

Eine metagenomische Analyse beinhaltet das Isolieren von DNS aus einer Umweltprobe und die Klonierung dieser in einen angemessenen Vektor. Der Vektor mit dem Insert wird dann im Anschluss in ein Wirtsbakterium transformiert. Die dadurch erhaltene Metagenombibliothek wird danach auf Gene, die von Interesse sind analysiert. Die Analyse kann durch PCR oder verschiedene Hybridisierungstechniken erfolgen.

Vor allem in der Biotechnologie findet der metagenomische Ansatz enormen Anklang. Das Potential scheint hier endlos zu sein. Durch die Metagenomik hat man etliche neue Enzyme, Antibiotika und andere Reagenzien in mikrobiellen Lebensgemeinschaften gefunden.

Nicht nur in der Biotechnologie sondern auch im Feld der Symbiose spielt die Metagenomik zurzeit eine große Rolle. Da hier viele Symbionten, im speziellen Fall Endosymbionten, sehr spezifische Beziehungen zu ihrem Wirt haben, ist es in vielen Fällen nicht möglich die Endosymbionten zu kultivieren.

Die erste Genomrekonstruktion eines nicht kultivierbaren Symbionten, im speziellen Fall eines bakteriellen Insekten Endosymbionten, war die von *Buchnera aphidicola*, dessen Wirt eine Blattlaus ist. Die Wirt-Symbionten Beziehung ist hier so eng, dass beide ohne den jeweiligen anderen Partner nicht überlebensfähig sind. Moran isolierte die bakterielle DNS von den Insekten, sequenzierte sie und reassemblierte das bakterielle Genom (Abbot 2001). Die Rekonstruktion des endosymbiontischen Genoms brachte Einsichten in die biochemische Abhängigkeit beider, der evolutionären Beziehung, der Reduktion und Veränderung des Genoms von bakteriellen Endosymbionten in Insekten.

Das Potential der Metagenomik ist aber zu einem großen Teil von der Konstruktion einer metagenomischen Bibliothek und der Analyse dieser abhängig. Weiters stellen die Kosten der Sequenzierung und die Zeit der Analyse deutliche Barrieren dar (Handelsmann 2004).

A.4 Metagenomische Bibliothek

Es gibt mehrere Ansätze metagenomische DNS in Vektoren zu klonieren und dadurch eine metagenomische Bibliothek herzustellen. Hier ist es von Vorteil Vektorsysteme, die große DNS Fragmente als Insert aufnehmen können, zu wählen. Zu diesen Vektoren gehören BAC's (Bacterial Artificial Chromosome, O'Connor 1989), die Phagen-basierenden Vektoren PAC's (P1 Artificial Chromosome, Ioannou 1994), Cosmide (Collins 1978) und Fosmide (Kim 1992). BAC's und PAC's sind die Vektoren, die die größten DNS Fragmente aufnehmen können. Es können bei PAC's Fragmente von bis zu 100 kb eingebaut werden. Auch bei BAC's reicht die Größe eines klonierten Fragmentes bis zu 300 kb. Die Nachteile dieser Vektoren bei der Konstruktion einer metagenomischen Bibliothek sind aber die geringe Anzahl an Klonen und die schwierige Isolierung dieser langen DNS Fragmente (Gillespie 2005). Gegenüber BAC's haben die anderen bereits genannten Vektoren den Vorteil, dass sie eine viel höhere Transformationseffizienz besitzen. Cosmide haben den Nachteil

Einleitung

gegenüber den anderen Vektoren, dass sie, sobald sie transformiert wurden instabil sind (Yokobata 1990).

Ein Fosmid ist im Prinzip nichts anderes als ein Cosmid (Collins 1978) mit einem *E. coli* basierten F-Faktor, einem „partitioning“ und „single-copy origin“ (Kim 1992). Diese Eigenschaften machen das Fosmid stabiler als das Cosmid. Weiters besitzt ein Fosmid, wie auch das Cosmid, *cos* Stellen für die Verpackung des Fosmides in λ -Phagen.

A.4.1 Konstruktion einer Fosmid Genbibliothek

Die Konstruktion einer Fosmid Genbibliothek (Abb. A.1) wird im Allgemeinen in sechs Schritten durchgeführt: (1) die Scherung der DNS, (2) die Reparatur der DNS Enden, (3) die Isolierung der DNS-Fragmente mit der richtigen Größe, (4) die Ligation der DNS-Fragmente in das Fosmid, (5) die Verpackung des Vektors in Phagenkapside und (6) die Transduktion.

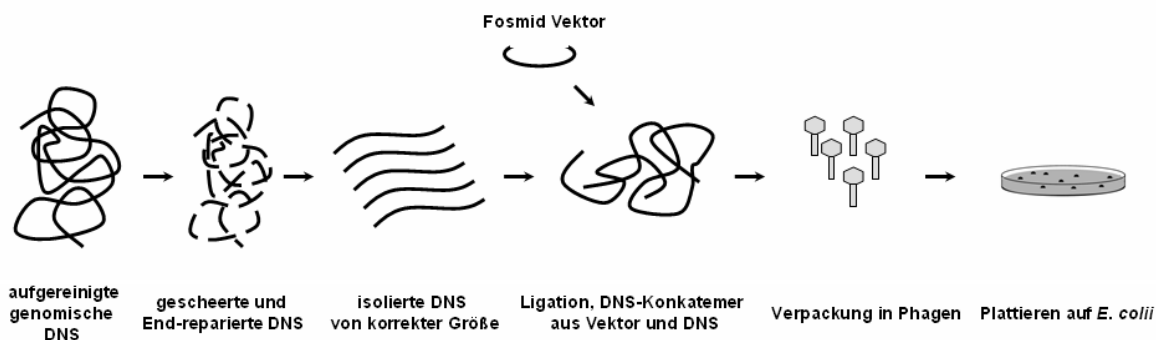


Abbildung A.1: Konstruktion einer Fosmid Genbibliothek

A.4.1.1 Scherung der DNS

Nach dem Isolieren der DNS aus einer Umweltprobe wird die DNS in etwa 40 kb große Fragmente geschnitten. Diese Scherung sollte zufallsbedingt geschehen und nicht durch einen Restriktionsverdau. Bei einem Restriktionsverdau werden Bibliotheken, die einen größeren Bias aufweisen, als bei einer zufälligen Scherung, konstruiert. D.h. es gibt DNS-Fragmente, die immer an der gleichen Stelle

geschnitten sind. Es gibt hier keine überlappenden DNS-Fragmente, wie bei einer zufälligen Scherung. Die Scherung von DNS Fragmenten passiert schon bei der Isolierung der DNS und ist in vielen Fällen im Anschluss an die DNS Isolierung nicht mehr notwendig.

A.4.1.2 Reparatur der Enden der isolierten DNS

Nach dem Scheren der DNS müssen die Enden der DNS repariert werden, um hier 5'-phosphorylierte stumpfe Enden für die Ligation in das Fosmid zu gewährleisten. Diese 5'-phosphorylierte stumpfen Enden sind für den Ligationsschritt bei der Konstruktion der Fosmid-Bibliothek wichtig.

A.4.1.3 Isolierung der DNS-Fragmente mit der richtigen Größe

Die Isolierung der DNS mit den 5'-phosphorylierten Enden ist nach der End-Reparatur sehr wichtig. Die Größe der DNS-Fragmente sollte im besten Fall zwischen 30 und 40 kb liegen, da ansonsten bei Fragmenten, die kleiner als 25 kb sind, chimäre Klone auftreten können. Hier werden im speziellen Fall zwei verschiedene DNS Fragmente in zwei Fosmide ligiert, die bei der Verpackung in den λ Phagen vom Phagen Protein A nicht getrennt und gemeinsam verpackt werden. Auch DNS Fragmente, die größer als 45 kb sind, sind für die Fosmid Genbibliothek unbrauchbar, da diese nicht zu infektiösen Phagenpartikeln führen.

A.4.1.4 Ligation

Im Anschluss an die Größenselektion der DNS Fragmente erfolgt die Ligierung der Fragmente in das Fosmid. Bei der Ligation entsteht ein DNS Konkatermer. In diesem Fall ist dieses Konkatermer nichts anderes als ein langes DNS Molekül, das abwechselnd aus Vektoren und der rund 30-40 kb großen DNS Fragmenten besteht.

A.4.1.5 Verpackung

Nach der Ligation erfolgt die Verpackung der Fosmide mit der metagenomischen DNS in Bakteriophagen. Hierfür wird das DNS Konkatermer in einen Mix aus Partikeln

Einleitung

des λ Phagen und des Bakteriophagen Proteins A gegeben. Das Bakteriophagen Protein A schneidet das DNS Konkatermer an den *cos* Stellen. Nun entstehen Fragmente mit der rund 30-40 kb großen metagenomischen DNS, die an beiden Seiten mit Teilen der Vektoren flankiert sind. Diese DNS Moleküle werden dann in ein Kapsid des λ Phagen verpackt. Schlussendlich erhält man dann λ Phagen mit der zu klonierenden DNS.

A.4.1.6 Transduktion

Anschließend erfolgt die Infektion der phagenresistenten *E. coli* Zellen mit dem λ Phagen durch Transduktion. Der λ Phage ist hier ein Klonierungsvehikel, der das Fosmid mit dem DNS Insert mit sehr hoher Transformationseffizienz, höher als zum Beispiel durch Elektroporation, in *E. coli* transduziert.

A.5 Ziele dieser Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin eine metagenomische Fosmid-Bibliothek mit bakteriellen Symbionten der Tannentrieblaus *Adelges nordmanniana* zu analysieren. Mittels PCR wurde in der aus 14.208 Fosmid Klonen bestehenden Genbibliothek nach Genomfragmenten der Endosymbionten TTL1 und TTL4 gesucht. Als Einstiegspunkte in die Fosmid Genbibliothek dienten die bereits bekannten 16S und 23S rRNS Gene der Symbionten.

Das weitere Ziel im Anschluss an die Analyse der Fosmid Genbibliothek war die Sequenzierung ausgewählter Fosmide mit den Genen der 16S und 23S rRNS der Symbionten.

Durch die, aus der Sequenzierung erhaltenen Informationen, sollten Rückschlüsse auf die Funktion, das Alter und die Evolution dieser Endosymbionten gezogen werden.

B. Material und Methoden

B.1. Technische Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|--|
| Boekel Replicator Microplate Type, 96-well | Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA |
| DNA Sequencer Applied Biosystems 3130 XL | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Gelelektrophorese: Sub-Cell [®] GT PowerPac Basic Chef-Dr [®] III System Elektrophoresis Cell Variable Speed Pump Cooling Module | Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland |
| iCycler | Biorad, München, Deutschland |
| Innova [™] 2300 Platform Shaker | New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA |
| Laminar flow hood Safe 2010 Model 1.2 | Holten, Jouan Nordic, Allerød, Dänemark |
| Magnetrührer RCT basic | IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland |
| Mikrowelle MD6460 | Microstar [®] , Taipei Hsien, Taiwan |
| NanoDrop [®] ND-1000 | NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |
| pH-Meter WTW InoLab Level 1 | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland |
| Pipetten: Pipetman [®] P2-P1000 Eppendorf Research [®] pipettes 1-1000 µl Eppendorf Research [®] 12-Kanal 10-100 µl pipette | Gilson International, Wien, Österreich Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Spektralphotometer SmartSpec [™] 3000 | Biorad, München, Deutschland |
| Transilluminator UST-30M-8E (312 nm) | Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland |
| Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation | Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, NJ, USA |
| Waagen: OHAUS [®] Analytical Plus balance Sartorius BL 3100 | Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| Wasserbäder: DC10 Thermo GFL [®] type 1004 | Haake, Karlsruhe, Deutschland Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland |
| Wasserdampf-Hochdruckautoklaven: Varioclav135S Varioclav25T | H+P, München, Deutschland H+P, München, Deutschland |
| Zentrifugen: Centrifuge 5804 R Mikro 22 R | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland |

B.2 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|---|---|
| 96 MicroWell [™] Platten mit Deckel | Nunc [™] , Roskilde, Dänemark |
| Einmal-Injektion-Kanülen Sterican [®] (ø 0.45 x 25 mm), steril | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Einmalspritzen Injekt [®] 5mL, steril | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Eppendorf Reaktionsgefäße versch. Größen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Glaskapillaren 50 µL | Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA |
| Parafilm [®] M Sealing Film | Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland |
| PCR Reaktionsgefäße 0,2 mL | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland |
| Petrischalen 96/16 | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Pipettenspitzen, versch. Größen | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Plastikküvetten Halb-Mikro | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| PP-Rörchen 15, 50 mL, steril | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Schraubdeckel Reaktionsgefäß 2mL | Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, UT, USA |
| Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße | Asahi Techno Glass Corporation, Iwaki Glass Co., Ltd., Funabashi-City, Japan |

B.3 Chemikalien

| Chemikalien | Hersteller |
|------------------------|---|
| 10x Taq Buffer mit KCl | Fermentas International Inc, Burlington, Canada |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Agar | Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Agarose: | |
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland |
| Biozym Sieve 3:1 Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland |
| SeaKem® Gold Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| Borsäure | Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | J.T.Baker, Deventer, Holland |
| dNTP Mix 2mM | Fermentas International Inc, Burlington, Canada |
| Eisessig | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol absolut | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Ethidiumbromid | Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Ethylendiaminteraacetat (EDTA), di-Natriumsalz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| Ficoll® 400 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| Glycerol | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Hefeextrakt | Oxoid LTD, Hamshire, England |
| Isopropanol (2-Propanol) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| MgCl ₂ 25mM | Fermentas International Inc, Burlington, Canada |
| N,N-Dimethylformamid (DMF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Natrium-di-Hydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | J.T.Baker, Deventer, Holland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Salzsäure (HCl) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| SYBR® GreenI | Cambrex Bio Science, Rockland Inc., Rockland, ME, USA |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Tris | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Tryptone | Oxoid LTD, Hamshire, England |
| Wasseraufreinigungssystem MILLI-Q® biocel | Millipore GmbH, Wien, Österreich |
| Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| X-Gal | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Xylencyanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland |

B.4 Kits

| Name des Kits | Hersteller |
|--|--|
| QIAprep® Spin Miniprep Kit | Quiagen, Hilden, Deutschland |
| QIAquick PCR purification Kit | Quiagen, Hilden, Deutschland |
| TOPO TA Cloning® | Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| CopyControl™ Fosmid Library Production Kit | EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI, USA |

B.5 Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|---------------------------|---|
| EcoRI | Fermentas International Inc, Burlington, Canada |
| MspI | Fermentas International Inc, Burlington, Canada |
| RNAse A | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Taq</i> DNS-Polymerase | Fermentas International Inc, Burlington, Canada |

B.6 Organismen

| Organismus | Symbiont | Herkunft |
|-----------------------------|------------|----------------------|
| <i>Adelges nordmanniana</i> | TTL1, TTL4 | Klausen-Leopoldsdorf |

Material und Methoden

Transformationskompetente Organismen: EPI300™ T1®

| Art | Stamm | Transformations-system | Genotyp | Topt. [°C] | Medium | Hersteller |
|----------------|-------------|--------------------------|--|------------|--------|--|
| <i>E. coli</i> | TOP10 | chemische Transformation | <i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 recA1</i> <i>ara139 Δ(ara-leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL (StrR) endA1</i> <i>nupG</i> | 37 | LB | Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| <i>E. coli</i> | EPI300™ T1® | Transduktion | <i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80dlacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ</i> <i>rpsL nupG trfA tonA</i> | 37 | LB | Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA |

B.7 Primer

| Primer | 5´-3´ Sequenz | T [°C] | Binde-position <i>E. coli</i> | Spezifität | Referenz |
|--------|-------------------|--------|-------------------------------|---------------|---|
| M13 F | GTAAAACGACGGCCAG | 60 | - | pCR® II TOPO® | TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) |
| M13 R | CAGGAAACAGCTATGAC | 60 | - | pCR® II TOPO® | TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) |

Material und Methoden

| | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|----|------------------------|--------------------------|---|
| TTL1-70F | CATCGGAAAGGAG TTTACTTC | 58 | 70 (16S- rRNS) | TTL 1 (16S-rRNS) | Diplomarbeit Elena R. Tönshoff |
| TTL1-1267R | GAGGTCCGCTGA CCCTCA | 58 | 1267 (16S- rRNS) | TTL 1 (16S- rRNS) | Diplomarbeit Elena R. Tönshoff |
| TTL4-107F | GGACGGGTGAG TAATATT | 58 | 107 (16S- rRNS) | TTL 4 (16S- rRNS) | Diplomarbeit Elena R. Tönshoff |
| TTL4-1449R | GTAAGTGCCCTCCAATAC | 58 | 1449 (16S- rRNS) | TTL 4 (16S- rRNS) | Diplomarbeit Elena R. Tönshoff |
| 23S-TTL1- 346 | GGTGTGTTAGTT GTGAGC | 64 | 346 (23S- rRNS) | TTL 1 (23S-rRNS) | Elena R. Tönshoff |
| TTL1-23S- 1169Rcomp | CCAGCAACACTCTCATGC | 64 | 1169 (23S- rRNS) | TTL 1 (23S-rRNS) | Elena R. Tönshoff |
| 23S-TTL4- 259 | GGGACAGCCC AGAGCTAG | 64 | 259 (23S- rRNS) | TTL 4 (23S-rRNS) | Elena R. Tönshoff |
| TTL4-23S- 1169Rcomp | GCAATGCATATTTACAT | 64 | 1169 (23S- rRNS) | TTL 4 (23S-rRNS) | Elena R. Tönshoff |
| 23S255F | AGTAGYGGCGAGCGAA | 50 | 255 (23S- rRNS) | | Lane 1991 |
| 1037R | CGACAAGGAAT TTCGCTAC | 50 | 1948 (23S- rRNS) | | Lane 1991 |
| pCC1/F5FP 010 | GGATGTGCTGCAA GGCGATTAAGTTGG | | - | CopyControl™ pCC1FOS™ | CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE Biotechnologie, Madison, WI, USA) |

Material und Methoden

| | | | | | |
|------------------|--------------------------------|--|---|--------------------------|---|
| pCC1/ F5RP011 | CTCGTATGTTGTGT GGAATTGTGAGC | | - | CopyControl™ pCC1FOS™ | CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE Biotechnologie, Madison, WI, USA) |
| TopoSeqF | AGCTTGGTACCGAGCT | | - | pCR® II TOPO® | Christian Baranyi |
| TopoSeqR | TCTAGATGCATGCTCGA | | - | pCR® II TOPO® | Christian Baranyi |

B.8 Software

| Software | Referenz |
|---|---|
| BLAST Basic Local Alignment Search Tool | Altschul 1990 |
| EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms | Rice 2000 |
| ImageQuant TL | Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, USA |
| RAST Rapid Annotation using Subsystem Technology | Aziz 2008 |

B.9 Puffer, Nährmedien und allgemeine Lösungen

B.9.1 Puffer, Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer

50 x TAE, modifiziert

Tris 2 M
EDTA 5 Mm
pH 8,0

Material und Methoden

1 x TAE, modifiziert

| | |
|---------------------|------------|
| 50xTAE, modifiziert | 20 mL/L |
| ddH ₂ O | ad 1000 mL |

TBE-Puffer

10 x TBE

| | | |
|--------------------|--------|------------|
| Tris | 890 mM | 162,0 g/L |
| Borsäure | 890 mM | 27,5 g/L |
| EDTA | 20 mM | 9,3 g/L |
| ddH ₂ O | | ad 1000 mL |
| pH 8,3-8,7 (45°C) | | |

1 x TBE

| | |
|--------------------|------------|
| 10 x TBE | 100 mL/L |
| ddH ₂ O | ad 1000 mL |

Auftragspuffer

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

Ethidiumbromid-Lösung

Die Ethidiumbromid-Lösung wurde zum Detektieren der DNS in Agarose-Gelen verwendet. Die Färbezeit betrug rund 40 min.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/mL Ethidiumbromid in ddH₂O

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid-Stammlösung 1:10 000 mit ddH₂O verdünnen

SYBR® Green I-Lösung

Die SYBR® Green I-Färbelösung wurde zum Färben der DNS in Agarose-Gelen verwendet. Die Färbezeit betrug rund 40 min.

SYBR® Green I-Stammlösung

SYBR® Green I-Lösung 10 000 x Konzentrat in DMSO

SYBR® Green I-Färbelösung

SYBR® Green I-Stammlösung 1:10 000 mit ddH₂O verdünnen

DNS-Längenstandards

Fermentas GeneRuler™ 1kB ladder

250 bp – 10 000 bp DNS Längenstandard

Low Range PFG Marker (New England BioLabs)

2,03 kb – 194 kb DNS Längenstandard für Pulsfeldgelelektrophorese

B.9.2 Nährmedien

Alle hier angeführten Medien wurden vor der Verwendung in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Varioclav 135S H+P, München, Deutschland) für 20 min bei 121°C und 1.013×10^5 Pa autoklaviert.

Feste Nährmedien wurden durch die Zugabe von 15-20 g/L Agar (Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz) hergestellt. Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

| | |
|--------------------|------------|
| Trypton | 10,0 g/L |
| Hefeextrakt | 5,0 g/L |
| NaCl | 5,0 g/L |
| ddH ₂ O | ad 1000 mL |
| pH 7,0 – 7,5 | |

Luria-Bertani-Medium + 7% Glycerol:

| | |
|--------------------|------------|
| Trypton | 10,0 g/L |
| Hefeextrakt | 5,0 g/L |
| NaCl | 5,0 g/L |
| Glycerol | 70 mL |
| ddH ₂ O | ad 1000 mL |
| pH 7,0 – 7,5 | |

B.9.3 Antibiotika-Lösungen

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden bei ihrer Herstellung durch einen Filter (0,22 µm Porengöße) sterilfiltriert und entweder bei 4°C oder bei -20°C gelagert. Bei Flüssigmedien wurde die entsprechende Menge von Antibiotikum aus der Stammlösung unmittelbar vor der Verwendung hinzugefügt, bei festen Medien nach dem Autoklavieren bei einer Medientemperatur von rund 50°C.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin 100 mg/mL
gelöst in 50% EtOH
Endkonzentration im Medium: 100 µg/mL

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin 100 mg/mL
gelöst in ddH₂O
Endkonzentration im Medium: 100 µg/mL

Chloramphenicol-Stammlösung

Chloramphenicol 25 mg/mL
gelöst in 100% EtOH
Endkonzentration im Medium: 125 µg/mL

B.9.4 Selektionslösungen

X-Gal-Stammlösung

Die in Dimethylformamid (DMF) gelöste X-Gal-Stammlösung, die bei der TOPO-TA Klonierung verwendet wird und das Blau-Weiß-Screening ermöglicht, wurde nach ihrer Herstellung durch einen Filter (0,22 µm Porengöße) sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Für das Blau-Weiß-Screening, das Aufschluss darüber gibt, ob Vektoren ein Insert besitzen oder nicht, wurden 40 µL der X-Gal-Stammlösung auf einer LB-Agarplatte gleichmäßig ausplattiert.

X-Gal 40 mg/mL
gelöst in Dimethylformamid (DMF)

B.9.5 Lösungen für Plasmid-Miniprep

Puffer P1

| | |
|------------------|-----------|
| Tris-HCl, pH 8,0 | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| RNase A | 100 µg/ml |

NaOH/SDS – Lösung

| | |
|--------------------|------|
| ddH ₂ O | 8 ml |
| 2 N NaOH | 1 ml |
| 10 % SDS | 1 ml |

Kaliumacetat/Acetate – Lösung

| | |
|--------------------|---------|
| 5 M Kaliumacetat | 6 ml |
| ddH ₂ O | 2,85 ml |
| Eisessig | 1,15 ml |

B.10. Vorversuche zur Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

B.10.1 Quantitative Untersuchung der DNS mittels Photometrie

Für eine quantitative Messung der DNS (Clark 1977) wurden 1,5 µl einer DNS-Lösung auf das Ende eines Glasfaserkabels eines NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) pipettiert und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers vermessen.

B.10.2 *In vitro*-Amplifizierung von 23S rRNS-Genen von TTL1 und TTL4 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von 23S rRNS Genen von TTL1 und TTL4 mittels PCR wurden spezifische Primer (siehe B.7) für die PCR (Saiki 1988) verwendet.

Im Prinzip startet eine PCR mit der Denaturierung der DNS und verläuft mit etwa 25-42 Zyklen und zwar der Denaturierung der DNS, dem Annealing der Primer und einer Elongationsphase weiter. Am Ende dieser Zyklen wird noch eine finale Elongationsphase angehängt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer stammen von Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland). Alle in dieser Arbeit hergestellten PCR-Reaktionsansätze wurden in einer Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) unter sterilen Bedingungen (Dekontamination mit 3% H₂O₂, 15 min Dekontamination mit UV-Licht) gemeinsam vermengt. Die PCR's wurden auf einem iCycler der Firma Biorad (München, Deutschland) durchgeführt. Bei jeder PCR wurden eine Positivkontrolle und auch eine Nullprobe (ohne DNS) mitgeführt.

Die PCR für die Amplifizierung der 23S rRNS Sequenz von den Endosymbionten TTL1 und TTL4 wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen (siehe Tab. B.1) mit den spezifischen Vorwärts-Primern 23S-TTL1-346 für den Symbionten TTL1, 23S-TTL4-259 für den Symbionten TTL4 und einem allgemeinen Rückwärts-Primer 1037R (siehe B.7.) durchgeführt.

Tabelle B.1: PCR-Programm zur Amplifikation von 23S rRNA-Genen

| PCR-Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklusanzahl |
|-------------------|------------|--------------|--------------|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | 35 |
| Annealing | 50°C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 1 min 30 sec | |
| finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

Material und Methoden

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

| | |
|-----------------------------|---------|
| MgCl ₂ (25mM) | 4 µL |
| Puffer (10x) | 5 µL |
| dNTP-Mix (2mM) | 5 µL |
| Vorwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Rückwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Taq DNS Polymerase (5 U/µL) | 0,2 µL |
| Template | 1 µL |
| ddH ₂ O | 33,8 µL |

Standardansatz pro Reaktion 50 µL

Als Template wurde aufgereinigte DNS der bakteriellen Endosymbionten TTL1 und TTL4 (isoliert von Elena R. Tönshoff) mit einer Konzentration von 100 und 50 ng/µL, vermessen mit einem NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA), in die PCR eingesetzt.

B.10.3 Qualitative Untersuchung der *in vitro*-amplifizierten 23S rRNS Gen-Fragmente von TTL1 und TTL4 durch Agarose-Gelelektrophorese

B.10.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die qualitative Untersuchung der DNS erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Diese Technik ermöglicht die größenabhängige Auftrennung von DNS-Fragmenten unter Einwirkung eines elektrischen Feldes. Die DNS-Moleküle wandern auf Grund ihrer Ladung im elektrischen Feld durch die Agarosematrix und werden proportional ihrer entsprechenden Größe aufgetrennt.

Für das Agarose-Gel wurde eine bestimmte Menge an Agarose eingewogen. Diese Menge richtet sich nach der Art der Analyse. Im Falle eines Kontroll-Agarose-Gels für PCR-Produkte wurde immer ein 1% Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurde 1g pro 100 mL 1xTBE (siehe B.1.9.1) eingewogen und darauf in einer Mikrowelle MD6460 (Microstar[®], Taipei Hsien, Taiwan) erhitzt und aufgeschmolzen. Nach dem Abkühlen

der Agaroselösung auf etwa 60°C wurde die noch flüssige Agarose in einen Sub-Cell[®] GT Gelschlitten (Biorad, München, Deutschland) mit einem Gelkamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose wurde dieser Gelschlitten samt dem Agarose-Gel in eine Sub-Cell[®] GT Gelelektrophorese-Apparatur (Biorad, München, Deutschland), die zuvor mit 1xTBE (siehe B.9.1) befüllt wurde, gelegt.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurde die zu untersuchende DNS mit Auftragspuffer (siehe B.9.1) vermischt. Die Menge des Auftragspuffers richtet sich nach dem Volumen der zu untersuchenden Nukleinsäuremenge. Nach dem Beladen der Geltaschen mit dem Nukleinsäure-Auftragspuffergemisch wurde die Apparatur zusammengebaut und an eine PowerPac Basic Stromquelle (Biorad, München, Deutschland) angeschlossen und eingeschaltet. Bei PCR-Produkten erfolgte die Separation der DNS-Moleküle bei einer Spannung von 120 V für 50 min. Einen guten Hinweis, wie weit die DNS-Moleküle schon gewandert sind, geben auch die Farbmarker des Auftragspuffers: Bromphenolblau und Xylencyanol. Bei einem 1%igen Agarose-Gel befindet sich die Laufmittelfront von Bromphenolblau bei rund 300 bp und die von Xylencyanol bei rund 4000 bp

B.10.3.2 DNS-Detektion

Nach der Auftrennung der DNS wurde das Agarose-Gel in eine Ethidiumbromid-Färbelösung (siehe B.9.1) gelegt. Nach der Färbeprozedur wurden die DNS-Moleküle im Agarose-Gel durch Bestrahlung mit UV-Licht in einem Transilluminator UST-30M-8E (312 nm) (Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) sichtbar gemacht, fotografiert und digitalisiert.

B.10.3.3 DNS-Größenbestimmung

Die Abschätzung der Größe der DNS-Fragmente wurde über einen bei der Gelelektrophorese mitgeführten Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas International Inc, Burlington, Canada) bestimmt. Hier wurden die DNS-Banden des mitgeführten Größenstandards mit der zu analysierenden Bande visuell verglichen.

B.10.4 Klonierung der *in vitro*-amplifizierten 23S rRNS Gene von TTL1 und TTL4 mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit

Die Klonierung der *in vitro*-amplifizierten 23S rRNS Gen-Fragmente von den Endosymbionten TTL1 und TTL4 (siehe PCR B.10.2) wurde mit einem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Zuerst erfolgte die Ligation und danach die chemische Transformation in transformationskompetente *E. coli* TOP 10 Zellen (siehe B.6)

B.10.4.1 Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Für den Fall das man nach einer PCR mehrere verschieden große DNS-Amplifikate hat, ist es notwendig das gewünschte DNS-Amplifikat in einem „low melting“ Agarosegel aufzutrennen bzw. aufzureinigen und dann auszustechen, da bei dem TOPO-TA System bevorzugt kürzere DNS-Fragmente in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor eingebaut werden.

Für das „low melting“ Gel wurde ein 2%iges Biozym Sieve 3:1 Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) mit 1xTAE Puffer modifiziert (siehe B.9.1) hergestellt. Das Gel lief bei einer Spannung von 100 V für 1,5 h bei 4°C.

Nachdem die DNS in dem Gel mit einer SYBR[®] Green I Färbelösung (siehe B.9.1) gefärbt wurde, wurde mit Hilfe von 50 µL Glaskapillaren (Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA) unter Bestrahlung mit UV-Licht in einem Transilluminator UST-30M-8E (312 nm) (Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) die gewünschte DNS-Bande unter ausreichendem Schutz ausgestochen. Das ausgestochene Agarose-DNS-Gemisch wurde mit 100 µL ddH₂O vermennt und bei 70°C in einem Wasserbad geschmolzen. Dieses PCR-Produkt wurde weiter für die Ligation verwendet.

B.10.4.2 Ligation

Für die Ligation der *in vitro*-amplifizierten 23S rRNS Gen-Fragmente von TTL1 und TTL4 in den Vektor pCR[®] 2.1-TOPO[®] (TOPO TA Cloning[®] Kit) wurde ein Ligationsansatz hergestellt.

Hier ist es wichtig, dass immer ein frisches PCR-Produkt verwendet wird, da es ansonsten durch Einfrieren und Auftauen, durch zu harsche

Material und Methoden

Aufreinigungsprozeduren oder zu lange Lagerung die 3´Adenin-Überhänge, die durch die Polymerase bei der PCR an den flankierenden Enden des PCR-Produktes unspezifisch angehängt werden, verloren gehen. Diese 3´Adenin-Überhänge des PCR-Produktes sind wichtig beim Ligationsschritt in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor.

Ligationsansatz

| | |
|---|------|
| PCR-Produkt | 4 µL |
| Salzlösung | 1 µL |
| Vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®] | 1 µL |

Dieser Ligationsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

B.10.4.3 Transformation

2 µL des oben angeführten Ligationsansatzes wurden zu den chemisch transformationskompetenten *E. coli* TOP 10 Zellen (siehe B.6), die zuvor schonend auf Eis aufgetaut wurden, hinzugegeben, vorsichtig gemischt und danach 5 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte die Transformation 30 sec lange bei 42°C im Wasserbad. Die Zellen wurden dann sofort wieder auf Eis gestellt und nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium (TOPO TA Cloning[®] Kit) 1 h bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden jeweils 50 und 150 µL auf LB-Platten (siehe B.9.2) mit 100 µg/mL Kanamycin (siehe B.9.3) und 40 µL 40 mg/mL konzentrierter Selektionslösung X-Gal (siehe B.9.4) unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank Laminar flow hood Safe 2010 Model 1.2 (Holten, Jouan Nordic, Allerød, Dänemark) ausplattiert.

B.10.5 Anzucht rekombinater *E. coli* Stämme

Die vorhin beschriebenen transformierten *E. coli* Zellen wurden über Nacht auf LB-Platten (siehe B.9.2) mit 100 µg/mL Kanamycin (siehe B.9.3) und 40 µL 40 mg/mL konzentrierter Selektionslösung bei 37°C inkubiert.

B.10.6 Identifizierung rekombinanter Klone

B.10.6.1 Insert-Nachweiß mittels Blau-Weiß-Selektion

Bei der Identifizierung rekombinanter Klone wurde sich die Blau-Weiß-Selektion durch die Selektionslösung X-Gal (siehe B.9.4) zugute gemacht. Diese Blau-Weiß-Selektion erlaubt die Identifizierung jener Klone, die einen Vektor (pCR[®] 2.1-TOPO[®]) mit einem Insert unbestimmter Größe besitzen.

Weißer Kolonien besitzen einen Vektor mit Insert, wohingegen blaue Kolonien nur den Vektor alleine besitzen. Diese Selektion beruht auf der Disruption des β -Galactosidase α -Fragments (Beckwith *et al.* 1970). Die Blaufärbung der blauen Kolonien lässt sich durch die Lagerung, der mit Kolonien angewachsenen LB-Platten, bei 4°C verstärken.

B.10.6.2 Größenbestimmung des klonierten Inserts mittels PCR

Zur Größenbestimmung des klonierten Inserts wurde eine PCR durchgeführt. Die hier verwendeten pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektoren besitzen an den flankierenden Enden des Inserts Bindestellen für sektorspezifische M13 Primer. Mit diesen Primern ist eine ungefähre Bestimmung der Größe des Inserts möglich. Bei dieser PCR wurden folgende Primer verwendet: M13F und M13R (siehe B.7).

Hierfür wurden weiße Kolonien zuerst mit sterilen Zahnstochern gepickt, auf eine LB-Platte (siehe B.9.2) mit 100 μ g/mL Kanamycin (siehe B.9.3) für die Stammhaltung transferiert und anschließend der Rest in ein PCR-Reaktionsgefäß mit dem PCR-Reaktionsansatz, der vorher schon komplett hergestellt und auf Eis gelagert wurde, suspendiert und eine M13 PCR durchgeführt.

Tabelle B.2: M13 PCR-Programm zur Größenbestimmung des klonierten Inserts

| PCR-Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklenanzahl |
|-------------------|------------|--------------|--------------|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | 35 |
| Annealing | 60°C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 1 min 30 sec | |
| finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

Material und Methoden

| | |
|-----------------------------|---------|
| MgCl ₂ (25mM) | 4 µL |
| Puffer (10x) | 5 µL |
| dNTP-Mix (2mM) | 5 µL |
| Vorwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Rückwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Taq DNS Polymerase (5 U/µL) | 0,2 µL |
| Template | 1 µL |
| ddH ₂ O | 33,8 µL |

Standardansatz pro Reaktion 50 µL

Im Anschluss an diese M13 PCR wurde die Größe des Inserts bzw. des M13 PCR-Produktes analog zu B.10.3 mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung bestimmt.

B.10.6.3 Unterscheidung gleich großer Inserts mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

M13-PCR-Produkte, die in der Agarose-Gelelektrophorese die richtigen Größe ergaben, wurden mit einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) analysiert, da man mit einer M13 PCR nur die Größe eines klonierten Inserts bestimmen und keinerlei Aussage über die Sequenz treffen kann. Der RFLP wurde mit dem Restriktionsenzym MspI (siehe B.5) wie folgt durchgeführt:

Restriktionsansatz

| | |
|--------------------|--------|
| M13 PCR Produkt | 7 µL |
| MspI | 0,2 µL |
| Puffer Tango | 1 µL |
| ddH ₂ O | 1,8 µL |

Schnittstelle MspI:

5'- C[^]C G G -3'
3'- G G C[^]C -3'

Material und Methoden

Dieser Restriktionsansatz wurde dann für 3 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss ähnlich zu B.10.3 mit einer Agarose-Gelelektrophorese, mit einem 2,5%igem Agarose-Gel mit 1xTBE, um auch die kürzeren Fragmente gut auftrennen zu können, analysiert. Um eine optimale Auftrennung der Fragmente zu ermöglichen, wurde eine geringere Spannung von 100 V, aber eine dafür längere Laufzeit von 90 min verwendet.

B.10.6.4 Sequenzierung der Inserts mit verschiedenen RFLP-Mustern

Um Aufschluss über die Basenabfolge der einzelnen Inserts mit verschiedenen RFLP-Mustern zu bekommen, wurde eine Sequenzierung mit dem M13 PCR-Produkt nach dem „cycle-sequencing“ Prinzip, welche eine Kombination aus der Didesoxy-Ketten-Abbruchmethode (Sanger 1977) und der PCR mit einer thermostabilen DNS-Polymerase (Saiki 1988) ist, durchgeführt.

Die PCR-Produkte aus B.10.6.2 und die dazugehörigen Plasmide wurden mit einem DNS Sequenzierer Applied Biosystems 3130 XL und dem BigDye terminator sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers mit dem Primern TopoSeqF/R (siehe B.7) sequenziert. Vor der Sequenzierung wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR purification Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) laut den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Tabelle B.3: Sequenzier-PCR Programm zur Sequenzanalyse der Inserts

| PCR-Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklusanzahl |
|-------------------|------------|--------|--------------|
| Denaturierung | 95°C | 1 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 20 sec | 24 |
| Annealing | 48°C | 50 sec | |
| Elongation | 60°C | 4 min | |
| finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

B.10.6.5 Analyse der Sequenzdaten

Die von der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (Rice 2000, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) mit bereits bekannten 23S rRNS Sequenzen von den Endosymbionten TTL1 und TTL4 (Pfeiffer 2008) verglichen.

B.10.7 Anzucht der transformierten *E. coli*-Zellen

Die Anzucht der transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte sowohl in flüssigen als auch auf festen Medien. Für die Anzucht in flüssigem Medium (siehe B.9.2) mit der durch den Hersteller empfohlenen Konzentration des entsprechenden Antibiotikums wurde das Flüssigmedium mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und ständigem Schütteln inkubiert. Die Anzucht auf festem Medium erfolgte wie schon in B.10.5 angegeben ebenfalls über Nacht bei 37°C.

B.10.8 Stammhaltung rekombinater *E. coli* Stämme

Jene Klone, die die 23S rRNS Sequenz von TTL1 und TTL4 enthielten, wurden wie in B.10.7 bereits beschrieben angezüchtet. 700 µL der Übernachtskultur wurden dann in einem 2 mL Schraubdeckel Reaktionsgefäß (Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, UT, USA) mit 300 µl 50% sterilem Glycerol vermennt und 1 h bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß vor dem Einfrieren noch einmal mit einem Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NJ, USA) gevortext, damit sich die bereits sedimentierten Zellen wieder gleichmäßig in der Lösung verteilen. Dieser Schritt diente dazu, damit beim späteren Animpfen nicht der ganze Glycerinstock aufgetaut werden muss. Beim späteren Animpfen reicht es, wenn nur ein kleiner Teil des Glycerinstocks für das Animpfen abgekratzt wird.

Die Glycerinstocks mit den rekombinaten *E. coli* Stämmen wurden bei -80°C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

B.10.9 *E. coli* Plasmid Isolierung

Die, durch die Sequenzierung und des RFLP Musters identifizierten TOPO TA Klone mit den 23S rRNS Gen-Fragmenten von TTL1 und TTL4 als Insert wurden von der Master-Platte (siehe B.10.5) mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 mL Flüssigmedium angeimpft und wie in B.10.8 beschrieben angezüchtet.

Die Plasmid Isolierung erfolgte hier mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) unter Einhaltung der Angaben des Herstellers.

B.10.10 Einstellen der Primer für die 23S rRNS Sequenz für TTL1 und TTL4 mittels Gradienten-PCR

Für die 23S rRNS Gene von TTL1 und TTL4 wurde jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer gelegt (Elena R. Tönshoff). Diese Primer waren: 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp für TTL1, 23S-TTL4-259 und TTL4-23S-1169Rcomp für TTL4 (siehe B.7). Um mit dem ausgewählten Primerpaar bei der PCR möglichst spezifisch zu sein, wurden hier in einer Gradienten-PCR verschiedene Annealingtemperaturen ausgetestet. Die hier eingesetzten Templates waren die, wie in B.10.9 beschrieben isolierten pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektoren mit den 23S rRNS Gen-Fragmenten von TTL1 und TTL4. Als zusätzliche Kontrolle, um zu sehen wie spezifisch die Primer sind, wurde weiters isolierte *E. coli* DNS verwendet.

Tabelle B.4: Einstellen der Primer für die 23S rRNS Sequenz von TTL1 und TTL4

| PCR-Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklenanzahl |
|-------------------|------------|--------|--------------|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | 35 |
| Annealing | 40-70°C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 1 min | |
| finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

| | |
|-----------------------------|---------|
| MgCl ₂ (25mM) | 4 µL |
| Puffer (10x) | 5 µL |
| dNTP-Mix (2mM) | 5 µL |
| Vorwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Rückwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Taq DNS Polymerase (5 U/µL) | 0,2 µL |
| Template | 1 µL |
| ddH ₂ O | 33,8 µL |

Reaktionsansatz pro Reaktion 50 µL

Die qualitative Untersuchung des PCR-Produktes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese wie in B.10.3 beschrieben.

B.11 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

B.11.1 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

Für die Konstruktion der Genbibliothek wurden zuerst Tannentriebläuse gesammelt, zerquetscht und die Endosymbionten TTL1 und TTL4 herausgefiltert. Von diesem Filtrat wurde DNS isoliert. Für die Genbibliothek wurde der CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI, USA) verwendet.

Laut den Angaben des Herstellers wurde zuerst die aufgereinigte DNS der Endosymbionten TTL1 und TTL4 von *Adelges nordmannianae* in ungefähr 30-40 kb große Stücke geschert. Mit dieser DNS wurde dann ein End-Repair zu 5'-phosphorylierten nicht überhängenden Enden durchgeführt. Danach wurde diese DNS über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend in den Cloning-Ready CopyControl™ pCC1FOS™ Vektor (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI, USA) ligiert. Die ligierte DNS wurde in Phagen verpackt und mit EPI300™ T1® *E. coli* Zellen (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI, USA) auf LB-Platten (siehe B.9.2) mit 125 µg/mL Chloramphenicol (siehe B.9.3) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (durchgeführt von Elena R. Tönshoff).

B.11.2 Anzucht rekombinanter *E. coli* Fosmid Stämme in 96 MicroWell™ Platten

Für die Anzucht der rekombinanten *E. coli* Fosmid Stämme der metagenomischen Bibliothek wurden zuerst die „wells“ der 96 MicroWell™ Platte (Nunc™, Roskilde, Dänemark) mit jeweils 100 µL LB-Medium mit 7% Glycerol (siehe B.9.2) und 125 µg/mL Chloramphenicol (siehe B.9.3) mit einer Eppendorf Research® 12-Kanal 10-100 µl Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufgefüllt. Dann wurden die Fosmid-Kolonien (siehe B.11.1) von den LB-Platten mit Zahnstochern unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank Laminar flow hood Safe 2010 Model 1.2 (Holten,

Jouan Nordic, Allerød, Dänemark) in die „wells“ einer 96 MicroWell™ Platte gepickt. Diese Platten wurden dann ordnungsgemäß mit einem Deckel verschlossen und über Nacht, bis sich ein kleines Zellpellet am Boden der „wells“ der Platte bildete, bei 37°C inkubiert.

B.11.3 Stammhaltung rekombinanter *E. coli* Fosmid Stämme in 96 MicroWell™ Platten

Zur Stammhaltung wurden die, in B.11.2 in 96 MicroWell™ Platten (Nunc™, Roskilde, Dänemark) angezüchteten Klone zuerst in deren MicroWell™ Platte mit einem Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NJ, USA) gevortext, bis sich das in B.11.2 zuvor beschriebene Zellpellet im Nährmedium resuspendiert hat.

Um die Flüssigkeitströpfchen vom Deckel zu bekommen und somit beim Öffnen der Platten Kontaminationen zu vermeiden, wurden die MicroWell™ Platten kurz bei 1000 rpm in einer Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgespinnt.

Nun wurden für das Überimpfen die „wells“ der 96 MicroWell™ Platten mit 100 µL LB-Medium mit 7% Glycerol (siehe B.9.2) und 125 µg/mL Chloramphenicol (siehe B.9.3) befüllt.

Im Anschluss wurden die MicroWell™ Platten mit den rekombinanten *E. coli* Fosmid Stämmen mehrmals mit einem Boekel Replicator Microplate Type, 96-well (Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA) in die zuvor mit Medium befüllten Platten repliziert bzw. abgestempelt und wieder unter den in B.11.2 genannten Bedingungen angezüchtet.

Nach dem Anwachsen der Fosmid-Klone wurden die MicroWell™ Platten eine Stunde bei 4°C gelagert und dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

B.12 Austesten der Analysebedingungen

Um für die Suche nach den Fosmid Klonen sensitivste PCR-Bedingungen zu haben, wurden im Vorfeld einige Ansätze ausprobiert. Das Austesten der

Analysebedingungen wurde mit *E. coli* Zellen, die ein Fosmid mit einem *HmeD* Segment (*HmeD*-Fosmid) besitzen durchgeführt. Das Einstellen der Bedingungen fand sowohl mit Zellen als auch isolierter Fosmid DNS statt (siehe B.13.2).

B.12.1 Ermittlung der notwendigen Zellzahl

Hierfür wurde eine bestimmte Anzahl von *HmeD*-Fosmid Zellen mit anderen *E. coli* Zellen, die ein anderes Fosmid besitzen, vermischt. Das Ziel war hier zu analysieren, wie viele Zellen mit dem *HmeD*-Fosmid sind durch die PCR nachweisbar und ob andere Zellen bei der PCR stören.

Für das Austesten der Analyse-Bedingungen wurden eine sich verändernde Anzahl an *HmeD*-Fosmid Zellen mit einer konstanten Anzahl an anderen Fosmid Zellen vermengt. Die Anzahl der hinzugefügten Fosmid Zellen war konstant $1,1 \times 10^8$. Die Anzahl der *HmeD*-Fosmid Zellen variierte von $1,5 \times 10^8$ bis $1,5 \times 10^1$. Die Anzahl der *E. coli* Zellen wurde mit einem Spektralphotometer SmartSpec™ 3000 (Biorad, München, Deutschland) bestimmt.

Mit den verschiedenen Mengen dieser Zellen wurde dann eine PCR unter folgenden Bedingungen und mit dem Primerpaar HmeD384for/HmeD1068rev für das *HmeD*-Fosmid durchgeführt.

Tabelle B.5: PCR-Bedingungen für die Ermittlung der für die Analyse-PCR der Fosmid Genbibliothek notwendigen Zellzahl mit dem *HmeD*-Fosmid

| PCR-Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklenanzahl |
|-------------------|------------|--------------|--------------|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | 42 |
| Annealing | 57°C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 1 min 30 sec | |
| Finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

Material und Methoden

| | |
|-----------------------------|---------|
| MgCl ₂ (25mM) | 4 µL |
| Puffer (10x) | 5 µL |
| dNTP-Mix (2mM) | 5 µL |
| Vorwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Rückwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Taq DNS Polymerase (5 U/µL) | 0,2 µL |
| Template | 1 µL |
| ddH ₂ O | 34,8 µL |

Reaktionsansatz pro Reaktion 50 µL

B.12.2 Ermittlung der notwendigen Fosmidzahl

Um zu wissen, welche Anzahl an Fosmiden durch PCR noch detektiert werden kann, wurde eine PCR mit einer unterschiedlichen Anzahl an Fosmiden durchgeführt. Als Template diente hier wieder das isolierte *HmeD*-Fosmid. Die Bedingungen für die PCR waren gleich wie in B.12.1. Zuerst wurden viele Verdünnungen des isolierten Fosmides hergestellt und anschließend mit einem NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) vermessen. Die Anzahl der Fosmide wurde dann mit einem Programm von URI Genomics & Sequencing Center (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>) anhand der Fosmid Größe und Konzentration bestimmt. Die Anzahl der Fosmide reichte von $5,6 \times 10^6$ bis zu $5,6 \times 10^1$.

B.13 Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

Die Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek auf die Symbionten TTL1 und TTL4 von *Adelges nordmannianae* erfolgte mittels PCR und spezifischen Primern auf die Sequenzen der ribosomalen Gene der 16S und 23S rRNS von den Endosymbionten TTL1 und TTL4. Die 16S und 23S rRNS Gene wurden zuvor in anderen Arbeiten durch Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH) (Amann 1995, DeLong 1989) nachgewiesen und verifiziert (Tönshoff 2004, Pfeiffer 2008). Nach dem Ablegen der Fosmid-Klone in 96 MicroWell[™] Platten wurden zuerst alle Platten

gepoolt. Von diesen Pools wurde im Anschluss DNS isoliert und mittels PCR nach den 16S und 23S rRNS Genen gesucht (siehe Abb. B.1). Nach der Detektion eines dieser Gene in einem Platten-Pool wurde auf der jeweiligen Platte die Position des gesuchten Fosmids bestimmt (siehe Abb. B.2).

B.13.1 Poolen der 96 MicroWell™ Platten mit den angezüchteten Fosmid Klonen

Für das Poolen, der in den 96 MicroWell™ Platten (Nunc™, Roskilde, Dänemark) wie in B.11.2 beschrieben angezüchteten rekombianten *E. coli* Fosmid Stämme, wurden pro Platten-Pool zwei 96 MicroWell™ Platten verwendet. Bevor diese Platten geöffnet wurden, wurden diese kurz bei 1.000 rpm in einer Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgespinn, um die Flüssigkeitströpfchen vom Deckel zu bekommen und somit beim Öffnen der Platten Kontaminationen zu verhindern. Aus jedem „well“ der zwei Platten wurden jeweils 100 µL unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank Laminar flow hood Safe 2010 Model 1.2 (Holten, Jouan Nordic, Allerød, Dänemark) abpipettiert und in ein steriles 15 mL PP-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt.

B.13.2 Fosmid DNS Isolierung aus den Platten-Pools

Die Isolierung der Fosmid DNS aus den Platten-Pools wurde wie folgt durchgeführt. Zuerst wurden 5 Mal 2 mL, der aus B.13.1 erhaltenen rund 10 mL Zellsuspension in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durch Zentrifugation mit einer Mikro 22 R Zentrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) bei 13.000 rpm 1 min pelletiert und der Überstand jedes Mal verworfen. Zum Verdau der RNS wurde das erhaltene Zellpellet nun in 100 µL Puffer P1 (siehe B.9.5) resuspendiert und 5 min bei RT stengelassen. Zur Zellyse wurden 200 µL NaOH/SDS Lösung (siehe B.9.5) zugegeben, durch Schwenken gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde auf Eis während dieser 5 min nochmals geschwenkt. Anschließend wurde zum Fällern der Proteine 150 µL Kaliumacetat/Acetat Lösung (siehe B.9.5) hinzugefügt und kräftig geschüttelt.

Diese Lösung wurde wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde in ein neues, steriles 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes mit 450 µL zuvor beigemengtem Isopropanol wurde die DNS 10 min lange bei RT gefällt. Im Anschluss wurde wieder bei 13.000 rpm 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das daraus erhaltene weiße Pellet mit 500 µL eiskaltem 70 % EtOH durch einen Zentrifugationsschritt 2 min bei 13.000 rpm gewaschen. Der Alkohol wurde schlussendlich abgenommen und das Pellet bei RT etwa 15 min getrocknet bis das Pellet die weiße Farbe verloren hatte. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 30 µL sterilem ddH₂O aufgenommen.

B.13.3 Quantitative Untersuchung der isolierten Fosmid DNS mittels Photometrie

Die quantitative Untersuchung der isolierten Fosmid DNS erfolgte wie schon beschrieben mit Hilfe eines NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometers (siehe B.10.1).

B.13.4 Aliquotieren und Verdünnen der isolierten Fosmid DNS

Um bei jeder PCR die gleichen standardisierten, ausgehend von der DNS-Template-Menge, Bedingungen zu haben und um die zu analysierende DNS nur einmal auftauen zu müssen, wurde die isolierte Fosmid DNS (siehe B.13.2) aliquotiert.

Nach dem Vermessen der DNS Menge (siehe B.13.3) erfolgte die Aliquotierung und Verdünnung der Fosmid DNS mit ddH₂O in mehrere Aliquots von 300 ng/µL. Alle hier durchgeführten Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese Aliquots bei -20°C gelagert.

B.13.5 PCR der aus Platten-Pools isolierten Fosmid DNS

Die Analyse der Platten-Pools erfolgte auf die Sequenzen der 16S und 23S rRNS Gene der Endosymbionten TTL1 und TTL4.

Für jeden PCR-Analyse Ansatz wurde jeweils ein Aliquot (siehe B.13.4) der aliquotierten Fosmid DNS verwendet. Die in diesen PCR-Ansatz eingesetzte Menge an Fosmid-DNS-Template waren 3 µL, was soviel wie etwa 900 ng/µL Fosmid DNS entspricht. Als Primer für die 16S rRNS Sequenz wurden die Primerpaare TTL1-70F und TTL1-1267R für TTL1, TTL4-107F und TTL4-1449R für TTL4 verwendet (siehe B.7). Für die 23S rRNS Sequenz waren es die Primerpaare 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp für TTL1, 23S-TTL4-259 und TTL4-23S-1169Rcomp für TTL4 (siehe B.7).

Tabelle B.6: PCR-Analyse der 16S und 23S rRNS von TTL1 und TTL4

| PCR-Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklenanzahl |
|-------------------|--|--|--------------|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | 42 |
| Annealing | 58 ₁ /61 ₂ /64 ₃ °C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 1 min ₄ / 1 min 30 sec ₅ | |
| finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

- 1 ... 16S rRNS TTL1: TTL1-70F/TTL1-1267R
16S rRNS TTL4: TTL4-107F/TTL4-1449R
- 2 ... 23S rRNS TTL4: 23S-TTL4-259 und TTL4-23S-1169Rcomp
- 3 ... 23S rRNS TTL1: 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp
- 4 ... 23S rRNS TTL1 und TTL4
- 5 ... 16S rRNS TTL1 und TTL4

| | |
|-----------------------------|---------|
| MgCl ₂ (25mM) | 4 µL |
| Puffer (10x) | 5 µL |
| dNTP-Mix (2mM) | 5 µL |
| Vorwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Rückwärtsprimer (50 pmol) | 0,5 µL |
| Taq DNS Polymerase (5 U/µL) | 0,2 µL |
| Template | 3 µL |
| ddH ₂ O | 31,8 µL |

Reaktionsansatz pro Reaktion 50 µL

Material und Methoden

Die qualitative Untersuchung des PCR-Produktes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese wie schon in B.10.3 beschrieben. Hier wurden die Taschen des Agarose-Gels mit 40 μ L des PCR-Produktes beladen.

Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren wurde bei allen Pools, die bei dieser Analyse PCR in B.13.5 ein Fragment in der entsprechenden Größe in dem Agarose-Gelelektrophorese analysierten PCR-Produkt gaben, eine Bestätigungs-PCR mit einem neuen Aliquot und den zuvor verwendeten Primerpaaren und PCR-Bedingungen gemacht. Somit wurde die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses bestätigt.

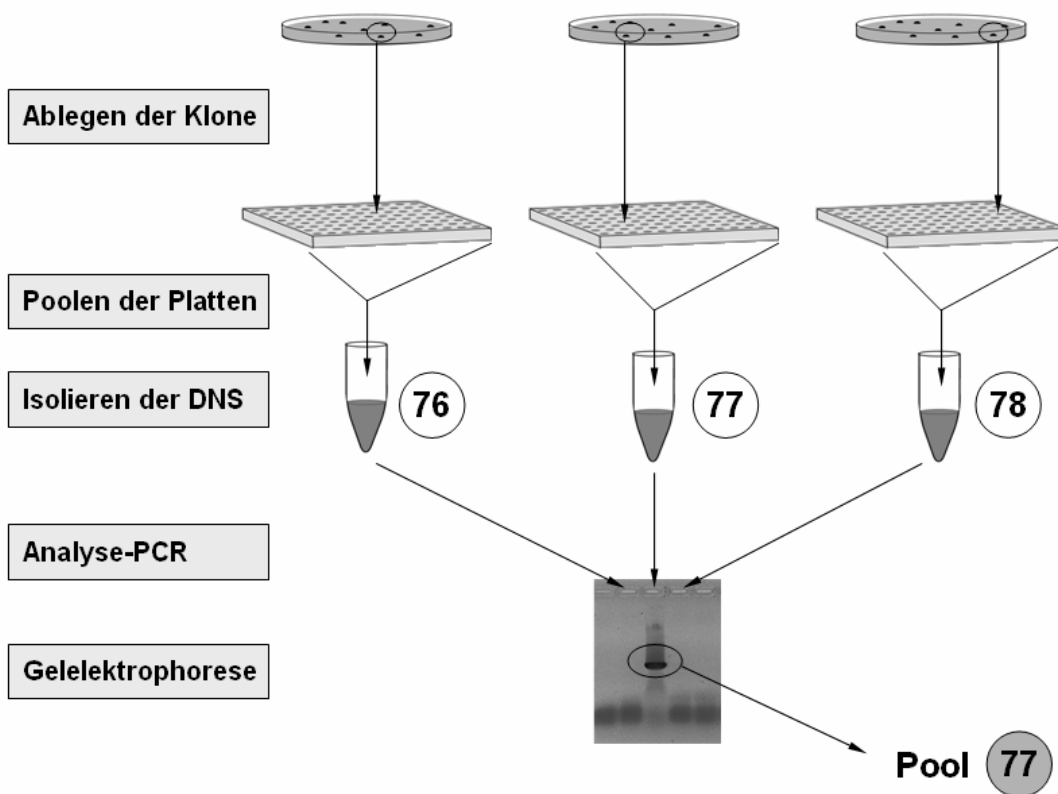


Abbildung B.1: Prinzip der Platten-Pool Analyse

Zuerst erfolgte das Ablegen der Fosmid Klone in 96 MicroWell™ Platten. Im Anschluss wurde jede Platte gepoolt und von jedem Pool DNS isoliert. Danach wurde eine Analyse-PCR mit den Pools auf das gewünschte Gen durchgeführt. Wurde ein PCR Signal für das gewünschte Gen in einem Pool gefunden, wurde dieser Pool weiter analysiert.

B.13.6 Poolen der Reihen und Spalten positiver Platten-Pools

Für das Poolen von Reihen und Spalten von Platten, wurden die Platten, die in der Bestätigungs-PCR (siehe B.13.5) ein weiteres positives Signal für die 16S und 23S rRNS von TTL1 und TTL4 gaben verwendet.

Insgesamt wurden je vier Platten zum Poolen der Reihen und Spalten verwendet. Diese Platten wurden von einer eingefrorenen Platte angeimpft (siehe B.11.3) und wie in B.11.2 angezüchtet. Vor dem Poolen wurde jede Platte gevortext und abgespinn (siehe B.13.1). Zum Poolen jeder Reihe wurden von jeder Position in einer Reihe (A-H) zwei Mal 70 µL der Zellsuspension in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Zum Poolen jeder Position in einer Spalte (1-12) wurden 100 µL Zellsuspension verwendet. Alle hier durchgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank Laminar flow hood Safe 2010 Model 1.2 (Holten, Jouan Nordic, Allerød, Dänemark) durchgeführt.

Die Isolierung der Fosmid DNS erfolgte wie in B.13.2 beschrieben.

B.13.7 PCR-Analyse von Reihen- und Spalten-Pools positiver Platten-Pools

Um die genaue Position eines Fosmid Klons der ein Insert mit der 16S bzw. 23S rRNS von TTL1 oder TTL4 besitzt, zu bestimmen, wurde mit den entsprechenden Primerpaaren von jedem Spalten und Reihen Pool eine PCR durchgeführt. Wenn eine beliebige Spalte und eine beliebige Reihe ein positives PCR Ergebnis geben, hat man die genaue Position mit den Koordinaten des Fosmid Klons in der 96 MicroWell™ Platte (Nunc™, Roskilde, Dänemark) (siehe Abb.B2). Alle PCR Bedingungen waren gleich wie in B.13.5.

Um auch hier die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Signale zu reduzieren wurde ebenfalls bei allen Pools, die bei dieser Analyse-PCR in B.13.7 ein Signal in der entsprechenden Größe in dem Agarose-Gelelektrophorese analysierten PCR-Produkt gaben, eine Bestätigungs-PCR mit einem neuen Aliquot und den zuvor verwendeten Primerpaaren und PCR-Bedingungen durchgeführt. Somit wurde die Reproduzierbarkeit dieses Signals bestätigt.

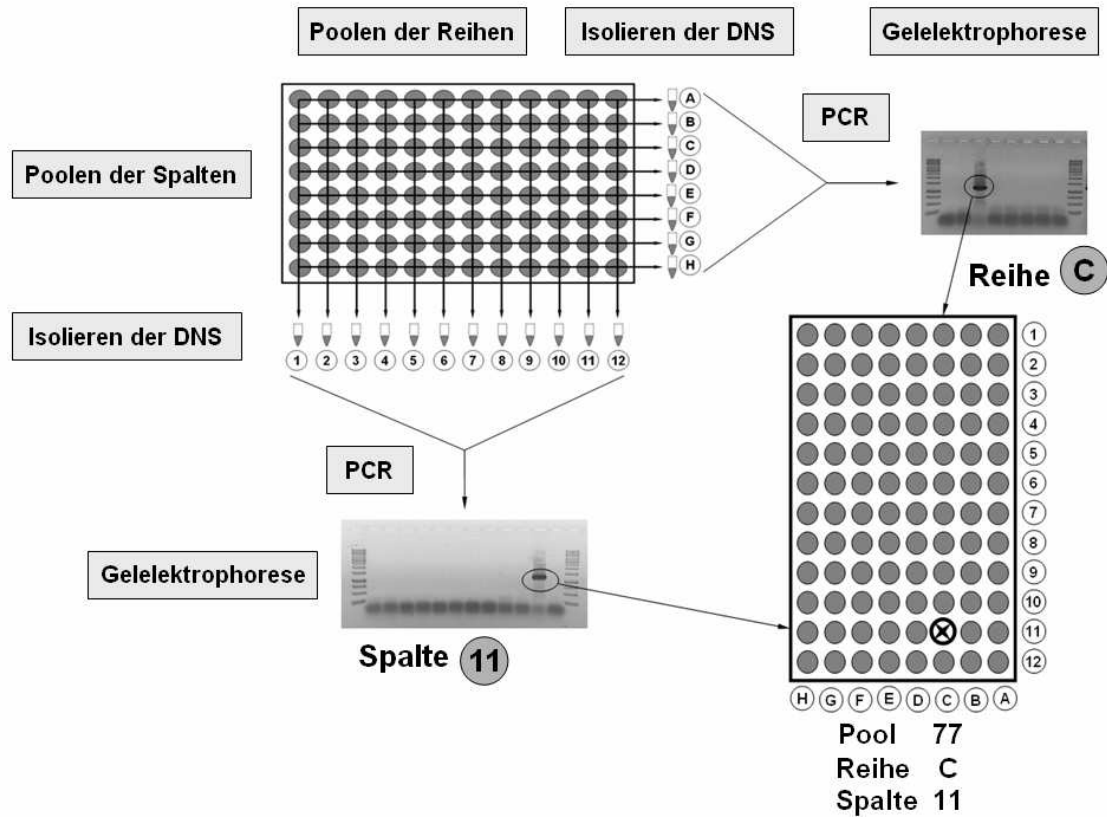


Abbildung B.2: Prinzip der Reihen- und Spalten-Pool Analyse

Von einem Pool, der in der Platten-Pool Analyse-PCR ein Signal für ein gewünschtes Gen gab, wurden alle Reihen und Spalten gepoolt. Von diesen Reihen- und Spalten-Pools wurde dann DNS isoliert und wieder eine PCR durchgeführt, um die Position des Klons mit dem gewünschten Insert zu bestimmen

B.14 Isolierung der Fosmid Klone mit 16S bzw. 23S rRNS von TTL1 und TTL4

B.14.1 Vereinzlung der Fosmid Klone

Um sicher zu gehen, dass man für weitere Analyse Zwecke der Fosmid Klone eine Reinkultur vorliegen hat, wurde ein Einzelkolonieausstrich auf LB-Platten (siehe B.9.2) mit 125 µg/mL Chloramphenicol (siehe B.9.3) gemacht.

Die Fosmid Klone wurden von ihrer nun bereits bekannten Plattenposition in der 96 MicroWell™ Platte (Nunc™, Roskilde, Dänemark) mit einer Impfhöhse auf der LB-Platte mit 125 µg/mL Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B.14.2 Isolierung der Fosmid Klone

Jeweils 4 Einzelkolonien der Fosmid Klone des Einzelkolonieausstriches (siehe B.14.1) wurden nun mit einem Zahnstocher gepickt, auf einer LB-Platte mit 125 µg/mL Chloramphenicol abgelegt, parallel dazu für die in B.14.3 durchgeführte DNS-Isolierung in 5 mL flüssigem LB mit 125 µg/mL Chloramphenicol angeimpft.

Von diesen Einzelkolonien des Fosmid Klones wurde direkt mit den Zellen auch noch eine Bestätigungs-PCR mit den Bedingungen und entsprechenden Primerpaaren wie in B.13.5 durchgeführt.

B.14.3 Fosmid DNS-Isolierung

Die Isolierung der Fosmid DNS erfolgte wie schon in B.13.2.

B.14.4 Stammhaltung der Fosmid Klone

Die aus B.14.2 in 5 mL flüssigem LB mit 125 µg/mL Chlorampfenicol angeimpften Fosmid Klone wurden zuerst bei 37°C über Nacht unter ständigem Schütteln angezüchtet.

700 µL der Zellsuspension wurden dann in einem 2mL Schraubdeckel Reaktionsgefäß (Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, UT, USA) mit 50% sterilem Glycerol vermischt und 1 h bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß mit den Fosmid Klonen bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

B.15 Analyse der Fosmid Klone mit dem 16S bzw. 23S rRNS Gen von TTL1

B.15.1 rRNS Operonanalyse

Um zu sehen, ob sich die Sequenz der 23S rRNS auf einem Fosmid, das in der Analyse durch die Sequenz der 16S rRNS gefunden wurde, befindet, wurde eine PCR mit den entsprechenden Fosmiden und den dazugehörigen Primerpaar 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp für die 23S rRNS Sequenz von TTL1 durchgeführt.

Um zu sehen, ob sich die Sequenz der 16S rRNS auf einem Klon, der in der Analyse durch die Sequenz der 23S rRNS gefunden wurde, befindet, wurde ebenfalls noch eine PCR mit den entsprechenden Fosmiden und den dazugehörigen Primerpaar TTL1-70F und TTL1-1267R für die 16S rRNS Sequenz von TTL1 durchgeführt.

Die Bedingungen für die PCR waren analog zu B.13.5.

B.15.2 Größenbestimmung der Fosmide durch RFLP und PFGE

Zur Größenbestimmung der Fosmide wurden die aus B.14.3 isolierte Fosmid DNS der Fosmid Klone, die entweder das 16S oder 23S rRNS Gen enthalten, mit einem

Material und Methoden

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und einer anschließenden Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) analysiert.

B.15.2.1 RFLP der Fosmid DNS

Für den RFLP der Fosmid DNS wurde das Restriktionsenzym EcoRI (Fermentas International Inc, Burlington, Canada) verwendet. Dabei wurde bei der Enzymauswahl darauf geachtet, dass dieses Restriktionsenzym sowohl einmal im CopyControl™ pCC1FOS™ Vektor (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI, USA), als auch einmal in den Genen der 16S und 23S rRNS von TTL1 und TTL4 schneidet. Durch das Addieren der einzelnen, aufgetrennten DNS-Banden im darauf folgenden Pulsfeldgel kann man Rückschlüsse auf die Größe der Fosmide ziehen. Dieser RFLP gab auch Aufschlüsse über die Unterschiedlichkeit der Sequenz, des im Fosmid klonierten Inserts. Für den Restriktionsverdau wurde die aus B.14.3 isolierte Fosmid DNS auf eine Konzentration von 2.000 ng/μL verdünnt. Anschließend wurde ein Restriktionsansatz angelegt und dieser dann bei 37°C zwei Stunden lang inkubiert.

Schnittstelle EcoRI:

5´- G[^]A A T T C-3´

3´- C T T A A[^]G -3´

| | |
|-------------------------|-------|
| Fosmid DNS (2000 ng/μl) | 20 μL |
| EcoRI | 4 μL |
| Puffer 10x | 4 μL |
| ddH ₂ O | 12 μL |

Reaktionsansatz pro Reaktion 50 μL

B.15.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese

Da mit der konventionellen Gelelektrophorese keine hochmolekulare DNS aufgetrennt werden kann und bei diesem RFLP DNS-Fragmente, die größer als 10 kb erwartet wurden, wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt.

Material und Methoden

Bei der PFGE wird nicht wie in der konventionellen Gelelektrophorese ein konstantes elektrisches Feld angelegt, sondern ein sich in der Richtung wechselndes Feld. Wird ein elektrisches Feld angelegt, so wandert das DNS Molekül auf Grund seiner Ladung zur Anode. Während den Pausen, in denen sich das elektrische Feld wieder neu ausrichtet geht die DNS in ihre globuläre Form über. Dieser Effekt spielt bei der Auftrennung ebenfalls eine Rolle.

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde nach der *CHEF-Methode* (Contour clamped homogeneous electric field) durchgeführt (Chu 1986).

Um nach dem RFLP die Fosmid DNS Fragmente ihrer Größe entsprechend mit einer PFGE aufzutrennen, wurde ein 0,5 % TBE Puffer (siehe B.9.1) und ein 1 % Agarose-Gel hergestellt. Nach dem Herstellen des Agarose-Gels wurde die Apparatur für die PFGE schon in Betrieb genommen, um für ausreichende Kühlung zu sorgen. Diese Apparatur beinhaltete ein Chef-Dr[®] III System Netzgerät, eine Elektrophorese Zelle, eine variable Geschwindigkeitspumpe und ein Kühlmodul (Biorad, München, Deutschland). Für die PFGE wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle B.5: Bedingungen für die PFGE

| | |
|-------------|-----------|
| Laufzeit | 8,4 h |
| Temperatur | 14°C |
| Winkel | 120° |
| Spannung | 6V/cm |
| Wechselzeit | 0,1-5 sec |

Nach der PFGE wurde das Gel in einer SYBR[®] Green I-Färbelösung (siehe B.9.1) etwa 45 min lange gefärbt.

Im Anschluss wurde mit dem Computerprogramm ImageQuant TL v2003 durch das Addieren der einzelnen Banden der jeweiligen Fosmide, ihre ungefähre Größe abgeschätzt.

B.15.3 Sequenzanalyse der Fosmide

B.15.3.1 Sequenzanalyse der 16 und 23S rRNS Gene

Um zu bestimmen, ob die isolierten Fosmide aus B.14.3 tatsächlich die richtigen Sequenzen der zu untersuchenden Organismen haben wurde eine

Sequenzbestimmung anhand der 16S und 23S rRNS Gene durchgeführt. Dafür wurde zuerst eine PCR von den isolierten Fosmiden entsprechend ihres Genes gemacht. Alle PCR Bedingungen waren gleich wie in B.13.5. Das dadurch erhaltene PCR-Produkt wurde dann wie in B.10.6.4 mit dem QIAquick PCR purification Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) laut den Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend ebenfalls wie in B.10.6.4 sequenziert. Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die Primerpaare TTL1-70F und TTL1-1267R für die 16S rRNS Sequenz von TTL1 und die Primerpaare 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp die 23S rRNS Sequenz von TTL1 verwendet. Für eine grobe Bestimmung, um welche Sequenz es sich handelt wurde das Programm BLAST (Altschul 1990, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Die Sequenzen wurden weiters mit dem Programm EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (Rice 2000, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) mit bereits bekannten 16S rRNS (Tönshoff 2004) und 23S rRNS Sequenzen (Pfeiffer 2008) von TTL1 verglichen.

B.15.3.2 Sequenzanalyse der Fosmid-Enden

Um zu bestimmen, von welchen Enden das Inserts des Fosmids flankiert ist, wurden für die Sequenzierung, mit dem Unterschied, dass es diesmal 99 statt 24 Zyklen waren, wie in B.10.6.4 das Primerpaar pCC1/F5FP010 und pCC1/ F5RP011 verwendet. Für die Bestimmung, um welche Sequenz es sich handelt wurde das Programm BLAST (Altschul 1990, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet.

B.15.3.3 Sequenzanalyse ausgewählter Fosmide

Drei Fosmide wurden auf Grund ihres unterschiedlichen RFLP Musters und ihrer Gene, 16S und 23S rRNS für eine Sequenzierung ausgewählt.

Die Fosmide 51H5, 117A11 und 1C10 wurden bei einem Sequenzierungsservice der Firma AGOWA (Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Berlin, Deutschland) nach Sanger (Sanger 1977) sequenziert. Vorrausgehend wurden „shotgun-Bibliotheken“ für jedes Fosmid erstellt. Die „shotgun-Klone“ wurden dann mit einer 4 fachen Abdeckung vorwärts und rückwärts sequenziert. Im Anschluss

wurden die Lücken zwischen den einzelnen „shotgun-Klonen“ mit einem „single primer walking“ gefüllt und die einzelnen Kontigs richtig aneinander geordnet.

B.15.4 Annotation der sequenzierten Fosmide

Die drei sequenzierten Fosmide wurden mit dem RAST Server (Rapid Annotation using Subsystem Technology, Aziz 2008) automatisch annotiert. Im Anschluss wurde noch mit den vorausgesagten ORF's eine blastn (Altschul 1990, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Analyse durchgeführt, um zu bestimmen zu welchen Organismen mit welcher Identität die vermeindlichen Gene fallen.

C. Ergebnisse

C.1 Vorversuche zur Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

C.1.1 *In vitro*-Amplifizierung und Klonierung der 23S rRNS-Genen der Endosymbionten TTL1 und TTL4

Als weitere Einstiegspunkte in die metagenomische Fosmid-Bibliothek neben den bereits bekannten 16S rRNS Genen (Tönshoff 2004) der Endosymbionten TTL1 und TTL4, dienten die 23S rRNS Gene der Endosymbionten. Die 23S rRNS Gene waren wie die 16S rRNS Gene schon bekannt und wurden durch FISH (Pfeiffer 2008) bestätigt. Da aber keine Klone mit diesen 23S rRNS Genen vorhanden waren, wurden diese aus der, in die Fosmid Genbibliothek eingesetzten aufgereinigten Symbionten-DNS (Tönshoff E.R.), durch eine PCR (siehe B.10.2) wieder amplifiziert und kloniert (siehe B.10.4).

Die PCR-Produkte wurden wie schon in B.10.4 beschrieben aufgereinigt und in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor kloniert. Die Klone mit Vektoren, die ein Insert besitzen, wurden vorerst durch ein Blau-Weiß-Screening selektiert. Das Insert wurde dann durch eine M13-PCR in B.10.6.2 wieder amplifiziert und die Klone, die einen Vektor mit der richtigen Insertgröße besitzen durch einen RFLP (siehe B.10.6.3) und eine anschließende Sequenzierung (siehe B.10.6.4) analysiert.

Für die M13-Analyse wurden jeweils 50 weiße Kolonien der jeweiligen 23S rRNS-Sequenz für die Endosymbionten TTL1 und TTL4 analysiert. Alle hier analysierten Kolonien gaben ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe von etwa 1 800 bp.

Beim RFLP traten verschiedene Bandenmuster auf. Bei allen RFLPs, die ein gleiches Bandenmuster aufwiesen, wurde angenommen, dass es sich um die gleiche Sequenz handelt. Von jedem dieser unterschiedlichen Bandenmuster wurde jeweils ein M13-PCR-Produkt repräsentativ sequenziert.

Die Sequenz dieser vermeintlichen 23S rRNS Gene der Endosymbionten TTL1 und TTL4 wurde nun mit dem Programm EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (siehe B.10.6.5) mit einer bereits bekannten 23S rRNS Sequenz (Pfeiffer 2008) verglichen.

Ergebnisse

Alle Amplifikate mit der Primerkombination für das 23S rRNS Gen von TTL1 (siehe B.10.2) passten perfekt mit der bereits bekannten Sequenz des 23S rRNS Genes von TTL1 überein.

Bei der Amplifikation des 23S rRNS Genes von TTL4 (siehe B.10.2) wurde nur ein Klon, mit einer teilweise identen 23S rRNS-Sequenz gefunden. Hier war es so, dass sich diese Sequenz am 3'-Ende von der bereits bekannten Sequenz der 23S rRNS unterschied. Bis zur Basenposition 1160 gab es nahezu 100% Identität mit der bereits bekannten Sequenz. Von den Basenpositionen 1161 bis 1699 gab es nur mehr 78,3% Identität.

Aus diesem Grund wurden für die folgende Analysen in beiden Fällen, sowohl bei TTL1 als auch TTL4, Primer designt, die bei der PCR nur das erste Stück, bei TTL1 die ersten 823 Basen und bei TTL4 die ersten 910 Basen, der 23S rRNS amplifizieren (Toenshoff E.R.).

C.1.2 Einstellen der Primer für die 23S rRNS Sequenz für TTL1 und TTL4

Um optimale Analyse-Bedingungen zu haben, wurde mit den aus B.10.4 klonierten, aus B.10.6 analysierten und aus B.10.9 isolierten pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektoren mit der vermeintlichen 23S rRNS-Sequenz der Endosymbionten TTL1 und TTL4 die optimale Annealingtemperatur mit der höchsten Stringenz mittels einer in B.10.10 angeführten Gradienten-PCR ausgetestet.

Im Falle von TTL1 verschwand das PCR-Signal bei einer Annealingtemperatur von 67°C. Bei einer Annealingtemperatur von 64°C gab es das letzte stark detektierbare PCR-Produkt von richtiger Größe (823 bp). Somit wurde in der darauf folgenden PCR-Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek für das 23S rRNS-Gen von TTL1 eine Annealingtemperatur von 64°C verwendet.

Bei TTL4 war das letzte starke PCR-Signal der richtigen Größe (910 bp) bei einer Annealingtemperatur von 61°C noch detektierbar und wies dann bei einer Annealingtemperatur von 64°C mehrere, unspezifische nicht von der richtigen Größe PCR-Produkte auf. Für die weitere PCR-Analyse wurde für das 23S rRNS Gen von TTL4 eine Annealingtemperatur von 61°C verwendet.

C.2 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

Die metagenomische Fosmid-Bibliothek der Endosymbionten TTL1 und TTL4 von *Adelges nordmannianae* wurde wie in B.11 beschrieben konstruiert (Toenshoff E.R.). Die aus B.11.1 erhaltenen Fosmid-Klone wurden in 96 MicroWell™ Platten abgelegt (siehe B.11.2). Insgesamt wurden 14 208 Fosmid Klone in 148 96 MicroWell™ Platten abgelegt.

Im Durchschnitt besitzen Fosmide ein Insert, das eine Größe von 30-40 kb besitzt. Schätzungsweise befinden sich dann 430-570 mb des Metagenomes, wenn man von Kontaminationen absieht, von den Endosymbionten von *Adelges nordmannianae* TTL1 und TTL4 in der metagenomischen Fosmid-Bibliothek.

C.3 Austesten der Analysebedingungen

Das Austesten der Analysebedingungen fand sowohl mit Zellen als auch mit isolierten Fosmiden statt (B.12). Es wurde die notwendige Zellzahl und auch die notwendige Fosmidzahl, die für eine Analyse-PCR benötigt wird, ausgetestet.

C.3.1 Ermittlung der notwendigen Zellzahl

Für die Ermittlung der notwendigen Zellzahl in einer Analyse-PCR wurden *HmeD*-Fosmid Zellen mit einer bestimmten Anzahl anderer Fosmid Zellen vermischt (siehe B.12.1). Die PCR für diese Ermittlung wurde in einem „triple“ Ansatz durchgeführt. Die letzte detektierbare Anzahl von *HmeD*-Fosmid Zellen, vermischt mit anderen Fosmid Zellen reichte hinunter bis zu $1,5 \times 10^4$. Auffällig war, dass es bei einigen PCR's, die über diesem LOD liegen Ausfälle gab. Eine Inhibierung der anderen Fosmid Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

C.3.2 Ermittlung der notwendigen Fosmidzahl

Für die Ermittlung der notwendigen Fosmidzahl, die in einer Analyse-PCR für die metagenomische Fosmid-Bibliothek benötigt werden, wurden verschiedene Mengen des *HmeD*-Fosmides in eine PCR eingesetzt (siehe B.12.2). Die letzte detektierbare PCR-Bande war bei einer Fosmidanzahl von $5,6 \times 10^3$ zu sehen.

C.4 Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

Die hier durchgeführte Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek beruhte auf einer zwei Schritt Strategie. Es erfolgte eine Analyse der 14.208 Fosmid-Klone, die in 148 Platten abgelegt waren. Zuerst wurden alle Platten-Pools (siehe B.13.5) mit PCR auf das ausgewählte (16S und 23S rRNS) Gen der Endosymbionten TTL1 und TTL4 analysiert. Wenn einer dieser Platten-Pools ein sicheres, durch eine zweite PCR bestätigtes Signal gab, wurden alle Reihen (A-H) und alle Spalten (1-12) gepoolt (siehe B.13.6) und wiederum mit PCR analysiert (siehe B.13.7). Wenn bei diesem zweiten Schritt eine Spalte und eine Reihe ein positives PCR-Ergebnis gaben, weiß man die genaue Position mit den Koordinaten des Fosmid Klons in der 96 MicroWell™ Platte (Nunc™, Roskilde, Dänemark).

C.4.1 PCR-Analyse der aus Platten-Pools isolierten Fosmid DNS

Vor Beginn des Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek wurden alle Fosmid Klone einer Platte gepoolt (siehe B.13.1) und von diesen Platten-Pools DNS isoliert (siehe B.13.2).

Im Anschluss wurde eine Analyse-PCR für die, sich in der Fosmid-Bibliothek befindlichen 16S und 23S rRNS Gene von TTL1 und TTL4 wie bereits in B.13.5 beschrieben, durchgeführt.

C.4.1. Ergebnisse der Analyse der Platten-Pools für die 16S und 23S rRNS Gene von TTL1

Bei der PCR-Analyse für das 16S rRNS Gen des Endosymbionten TTL1 wurden 7 eindeutige PCR-Signale richtiger Größe detektiert. Auch die nachfolgende Bestätigungs-PCR spiegelt dieses Ergebnis wieder.

Die Platten mit den Nummern 22, 47, 51, 53, 77, 117 und 143 gaben ein positives PCR-Ergebnis für das 16S rRNS Gen von TTL1 (siehe Abb. C.1)

Bei der Suche nach der 23S rRNS Sequenz gab nur ein Platten-Pool ein eindeutiges PCR-Signal mit der richtigen Größe (siehe Abb. C.2). Bei diesem Platten-Pool, nämlich dem Pool 1, wurde dieses PCR-Signal in einer Bestätigungs-PCR ebenfalls noch einmal bestätigt.

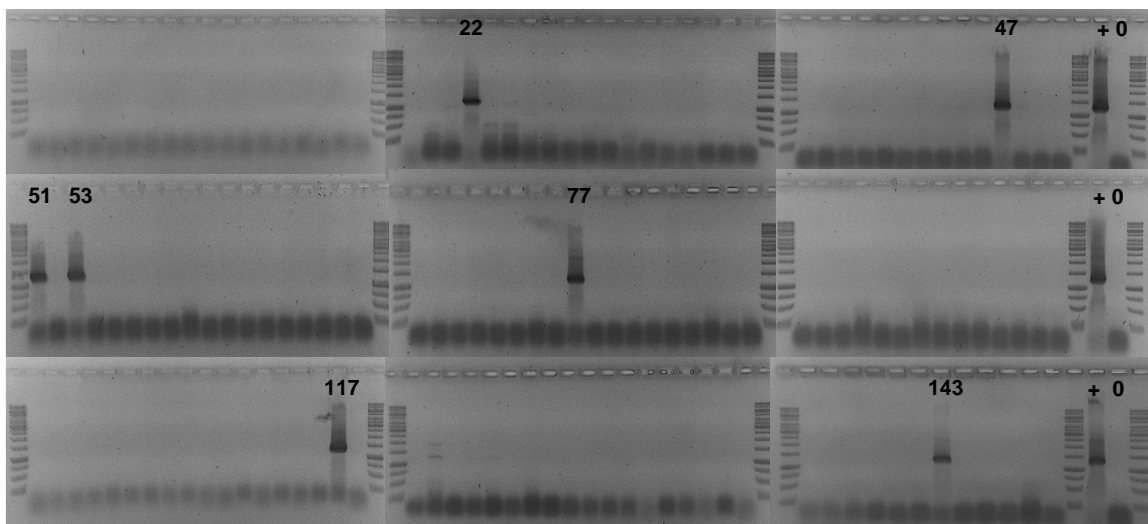


Abbildung C.1: Ergebnis der Platten-Pool Analyse für das 16S rRNS Gen von TTL1

Das abgebildete Gel wurde mit Produkten der Analyse-PCR von B.13.5 beladen. Die Platten-Pools 22, 47, 51, 53, 77, 117 und 143 gaben hier ein PCR-Signal in der richtigen Größe des 16S rRNS Gen-Fragmentes von TTL1. Am rechten Rand befindet sich die jeweilige Positivkontrolle und Nullprobe der PCR.

Ergebnisse

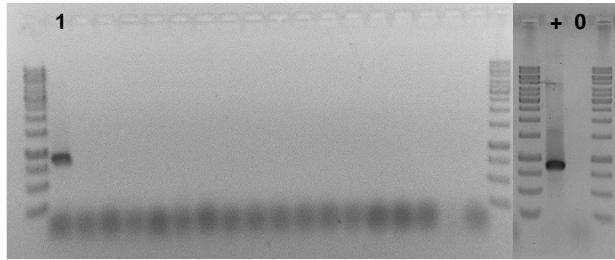


Abbildung C.2 : Ergebnis der Platten-Pool Analyse für das 23S rRNS Gen von TTL1

Das abgebildete Gel wurde mit Produkten der Analyse-PCR von B.13.5 beladen. Der Platten-Pool 1 gab hier ein PCR-Signal in der richtigen Größe des 23S rRNS Gen-Fragmentes von TTL1. Am rechten Rand befindet sich die Positivkontrolle und Nullprobe der PCR.

C.4.1.2 Ergebnisse der Analyse der Platten-Pools für die 16S und 23S rRNS Gene von TTL4

Beim der PCR-Analyse der Platten-Pools auf die 16S rRNS vom Endosymbionten TTL4 war kein einziges PCR-Signal detektierbar.

Die PCR für die 23S rRNS von TTL4 zeigte in der ersten Analyse-Runde mehrere starke und aber auch schwache Banden von der ungefähr entsprechenden Größe für das 23S rRNS-Fragment (910 bp). Bei manchen Pools waren hier ebenso weitere unspezifische Banden zu sehen. Signale für Fragmente von richtiger Größe, wenn auch nur schwach, wurden bei den Pools 12, 40, 50, 55, 56, 57, 70 und 131 detektiert (siehe Abb. C.3)

Bei der Bestätigungs-PCR gaben hingegen nur mehr die Pools 55 und 57 wieder ein PCR-Ergebnis.

Ergebnisse

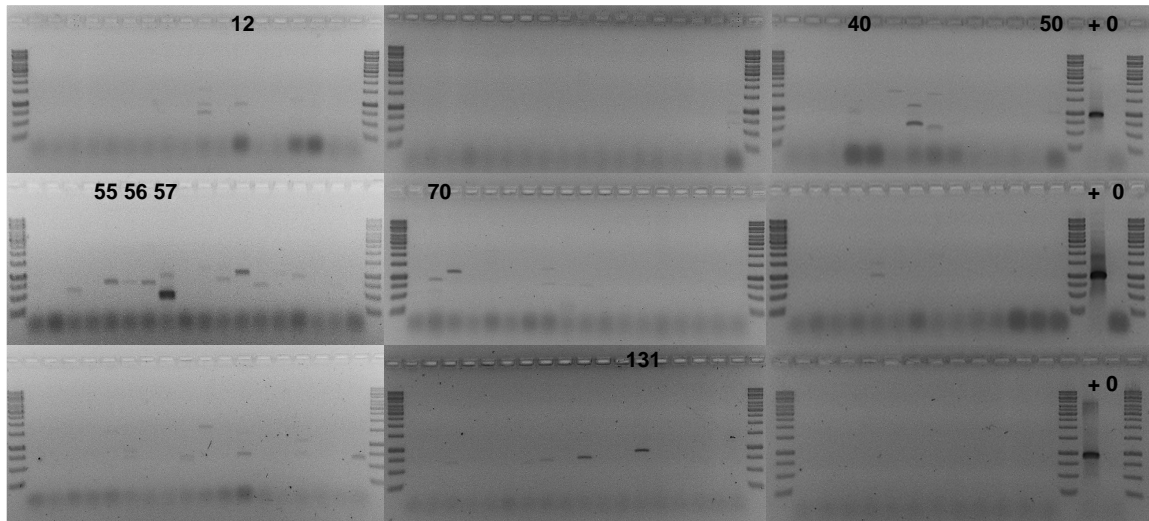


Abbildung C.3: Ergebnis der Platten-Pool Analyse für das 23S rRNS Gen von TTL4

Das abgebildete Gel wurde mit Produkten der Analyse-PCR von B.13.5 beladen. Die Platten-Poole 12, 40, 50, 55, 56, 57, 70, 131 gaben hier ein PCR-Signale in der richtigen Größe des 23S rRNS Gen-Fragmentes von TTL4. Am rechten Rand befindet sich die Positivkontrolle und Nullprobe der PCR.

C.4.2 PCR-Analyse von Reihen- und Spalten-Pools positiver Platten-Pools

Um die exakte Position jedes Klons mit einem Fosmid, das entweder das 16S oder 23S rRNS Gen von TTL1 oder TTL4 besitzt, festzustellen, wurde für die Analyse der Reihen und Spalten von den Pools, die in B.13.5 ein Signal für ein gesuchtes Gen gaben und anschließend auch bestätigt wurden, wie in B.13.6 beschrieben gepoolt und dann mittels PCR wie in B.13.7 analysiert.

Um die exakte Position der Fosmid-Klone, die entweder das 16S oder 23S rRNS Gen von TTL1 oder TTL4 besitzen, festzustellen, wurde eine weitere Analyse durchgeführt. Hierfür wurden alle Reihen und Spalten der Platten gepoolt (siehe B.13.6), die ein Signal für ein gesuchtes Gen gaben (siehe B.13.5) und dann mittels PCR analysiert (siehe B.13.7).

C.4.2.1 TTL1 Analyse-Ergebnisse der Reihen- und Spalten-Pools

Für das 16S rRNS Gen von TTL1 wurden die Pools 22, 47, 51, 53, 77, 117 und 143 weiter untersucht. Diese Platten-Pools gaben schon in der PCR von B.13.5 ein

Ergebnisse

positives PCR-Signal für das 16S rRNS-Gen von dem Endosymbionten TTL1 und wurden auch noch in einer zweiten PCR bestätigt.

Wenn pro Pool ein PCR-Signal für eine Reihe und auch für eine Spalte nachgewiesen wurde, wusste man die genaue Position d.h. in welchem der 96 „wells“ einer MicroWell™ Platten (Nunc™, Roskilde, Dänemark), sich der gesuchte Klon mit dem klonierten 16S rRNS Gen vom Endosymbionten TTL1 befindet.

In Abbildung C.4 ist als repräsentatives Beispiel eine Reihen- und Spalten-Analyse vom Platten-Pool 77 dargestellt. Im Falle von diesem Platten-Pool gab es ein PCR-Ergebnis für das 16S rRNS Gen von TTL1 in der Reihe C und in der Spalte 11. Die Position dieses Klons wurde mit 77C11 festgelegt.

Alle Fosmid Klone, die ein Insert mit der 16S rRNS vom Endosymbionten TTL1 besitzen und in der PCR von B.13.7 nachgewiesen werden konnten, wurden auf den Positionen 22F12, 47F11, 51H5, 53C7, 77C11, 117A11 und 143G10 identifiziert.

Jener Fosmid Klon, der ein Insert mit der 23S rRNS vom Endosymbionten TTL1 besitzt, wurde an der Position 1C10 identifiziert.

Die Ergebnisse der Reihen- und Spalten-Analyse ist auch in der nachfolgenden Tabelle anschaulich dargestellt (siehe Tab. C.1).

Tabelle C.1: Ergebnisse der Analyse für das 16S und 23S rRNS Gen von TTL1 in Reihen- und Spalten-Poolen

| Platte | Reihe | Spalte | 16S | 23S |
|--------|-------|--------|-----|-----|
| 1 | C | 10 | | X |
| 22 | F | 12 | X | |
| 47 | F | 11 | X | |
| 51 | H | 5 | X | |
| 53 | C | 7 | X | |
| 77 | C | 11 | X | |
| 117 | A | 11 | X | |
| 143 | G | 10 | X | |

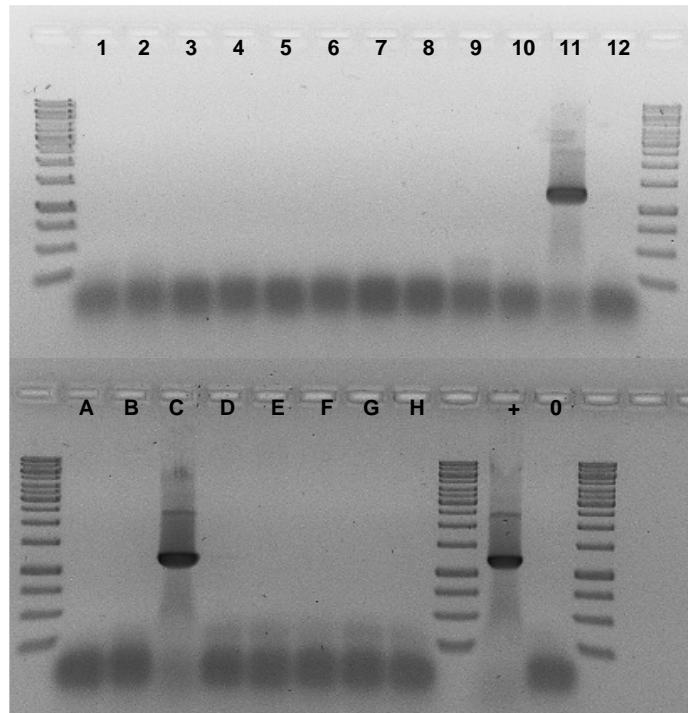


Abbildung C.4: Ergebnis der Reihen- und Spalten-Analyse für den Platten-Pool 77

Das abgebildete Gel wurde mit Produkten der Analyse-PCR von B.13.7 der Reihen und Spalten des Platten-Pools 77 beladen. Der Spalten-Pool 11 und der Reihen-Pool C gaben hier PCR-Signale in der richtigen Größe des 16S rRNS Gen-Fragmentes von TTL1. Somit liegt der Klon, der das Fosmid mit dem 16S rRNS Gen von TTL1 besitzt, auf der Position C11 in der 96 MicroWell™ Platte 77 (Nunc™, Roskilde, Dänemark). Am rechten Rand befindet sich die Positivkontrolle und Nullprobe der PCR.

C.4.2.2 TTL4 Analyse-Ergebnisse der Reihen- und Spalten-Pools

Von jenen zwei Platten-Pools (55 und 57), die mit PCR in B.13.5 zwei Mal ein Signal für das 23S rRNS Gen von TTL4 gaben, wurden die Reihen und Spalten mit PCR in B.13.7 analysiert. Vom Platten-Pool 57 gab es bei dieser Analyse keine weiteren PCR-Signale von Reihen- und Spalten-Pools.

Der Klon, der in Platte 55 ein Signal für die 23S rRNS von TTL4 gab wurde bei dieser Analyse auf Position C1 gefunden. In einer weiteren PCR verschwand aber das richtige Signal für diese Position. Hier gab es nur ein PCR-Fragment von etwa 750 bp und nicht wie erwartet von 910 bp. Somit wurde auch dieses Signal wie beim Platten-Pool 57 wieder verloren. Sämtliche weitere Versuche, diese Signale bei einer PCR zu wiederholen, blieben erfolglos. Auch das Sequenzieren des zu kurzen PCR-Produktes bracht keinerlei Aufschlüsse darüber, um welche Sequenz es sich hier handelt, da bei der Sequenz Doppel- und Tripple-Peaks vorhanden waren.

Somit wurde kein Klon, der entweder das 16S oder 23S rRNS Gen des Endosymbionten TTL4 auf dem Insert seines Fosmides besitzt, gefunden. Ebenfalls wurde kein Klon, der das 16S rRNS Gen von TTL4 enthält mit PCR in der metagenomischen Fosmid-Bibliothek nachgewiesen.

C.5 Analyse der Fosmid Klone mit der 16S bzw. 23 S rRNS von TTL1

C.5.1 rRNS Operonanalyse

Um zu zeigen, ob die Fosmide, die ein 16S rRNS Gen in ihrem Insert besitzen, auch noch ein 23S rRNS Gen von TTL1 haben, wurde noch eine PCR mit den Primern 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp für die 23S rRNS Sequenz von TTL1 durchgeführt. Dass diese beiden rRNS in einem Operon liegen, konnte in vorigen Arbeiten nicht nachgewiesen werden (Pfeiffer 2008). Es wäre aber denkbar, dass beide Gene nahe zu einander liegen und so auf einem Insert lokalisiert sind.

Bei der PCR (siehe B.15.1) mit dem Primerpaar für die 23S rRNS von TTL1 wurde kein Signal auf den Fosmiden 22F12, 47F11, 51H5, 53C7, 77C11, 117A11 und 143G10, auf denen sich das 16S rRNS Gen von TTL1 befindet, für die 23S rRNS detektiert. Daraus kann man schließen, dass das 23S Operon von TTL1 auf keinem der Fosmide, die mit den Primern für die 16S rRNS von TTL1 gefunden wurden, ist. D.h. auf den Fosmiden 22F12, 47F11, 51H5, 53C7, 77C11, 117A11 und 143G10 befindet sich jeweils nur das 16S rRNS Gen von TTL1 und kein 23S rRNS Gen.

Bei dem Fosmid 1C10 auf dem sich die 23S rRNS von TTL1 befindet, wurde derselbe Ansatz von oben nur vice versa durchgeführt. Hier wurde mit den Primern für die 16S rRNS TTL1-70F und TTL1-1267R nach der 16S rRNS gesucht. Das 16S rRNS Gen wurde auf dem Fosmid 1C10 nicht gefunden.

C.5.2 Größenbestimmung der Fosmide durch RFLP und PFGE

Zur Bestimmung der Größe wurde mit dem Enzym EcoRI ein RFLP mit den Fosmiden 1C10 (23S rRNS TTL1), 22F12, 47F11, 51H5, 53C7, 77C11, 117A11 und 143G10 (16S rRNS TTL1) und eine anschließende PFGE durchgeführt (siehe B.15.2). Zum Größenvergleich untereinander wurden die Fosmide auch in ihrer zirkulären Form auf das PFGE aufgetragen (siehe Abb. C.6).

Wie in der Abbildung C.5 erkennbar, hatten alle durch EcoRI verdauten Fosmide ein unterschiedliches Restriktionsmuster bis auf die beiden Fosmide 51H5 und 53C7 mit der 16S rRNS Sequenz von TTL1. Bei diesen Fosmiden war das RFLP-Muster exakt gleich. Dies lässt darauf schließen, dass diese beiden Fosmide (51H5 und 53C7) das gleiche Insert besitzen.

Zusätzlich signifikant war, dass alle Fosmide ein verdautes DNS-Fragment der gleichen Größe besitzen. Dieses Fragment hat eine Größe von ungefähr 1630 bp. Manche Fosmide hatten auch noch das eine oder andere Bandenmuster gleich.

Zwei Fosmide sind aber in ihrem Muster auffällig. Das Fosmid 117A11 mit der 16S rRNS und das Fosmid 1C10 mit der 23S rRNS vom Endosymbionten TTL1 haben komplett andere Restriktionsmuster als die übrigen Fosmide.

Anhand der Größenabschätzung der Laufhöhe der einzelnen Banden im Agaraose-Gel, die durch den Restriktionsverau mit EcoRI resultieren, wurde mit dem Computerprogramm ImageQuant TL v2003 die ungefähre Größe der Fosmide abgeschätzt.

Um die Insertgröße anhand der abgeschätzten Fosmidgröße zu bestimmen, wurde die Größe des Fosmid-Vektor CopyControl™ pCC1FOS™, der eine Größe von 8,1 kb besitzt, von der Gesamtgröße abgezogen.

Die durch das Computerprogramm ImageQuant TL v2003 abgeschätzte Größe der Inserts reicht von 31,1 kb bis zu 38,5 kb (siehe Tab. C.2).

Tabelle C.2: Größenabschätzung der Fosmide

| rRNS Gen | 16S | | | | | | | 23S |
|-------------------------|-------|-------|------|------|-------|--------|--------|------|
| Fosmid | 22F12 | 47F11 | 51H5 | 53C7 | 77C11 | 117A11 | 143G10 | 1C10 |
| Gesamtgröße (kb) | 41,6 | 44,4 | 46,6 | 45,5 | 42 | 40 | 39,2 | 41 |
| Insertgröße (kb) | 33,5 | 36,3 | 38,5 | 37,4 | 33,9 | 31,9 | 31,1 | 32,9 |

Ergebnisse

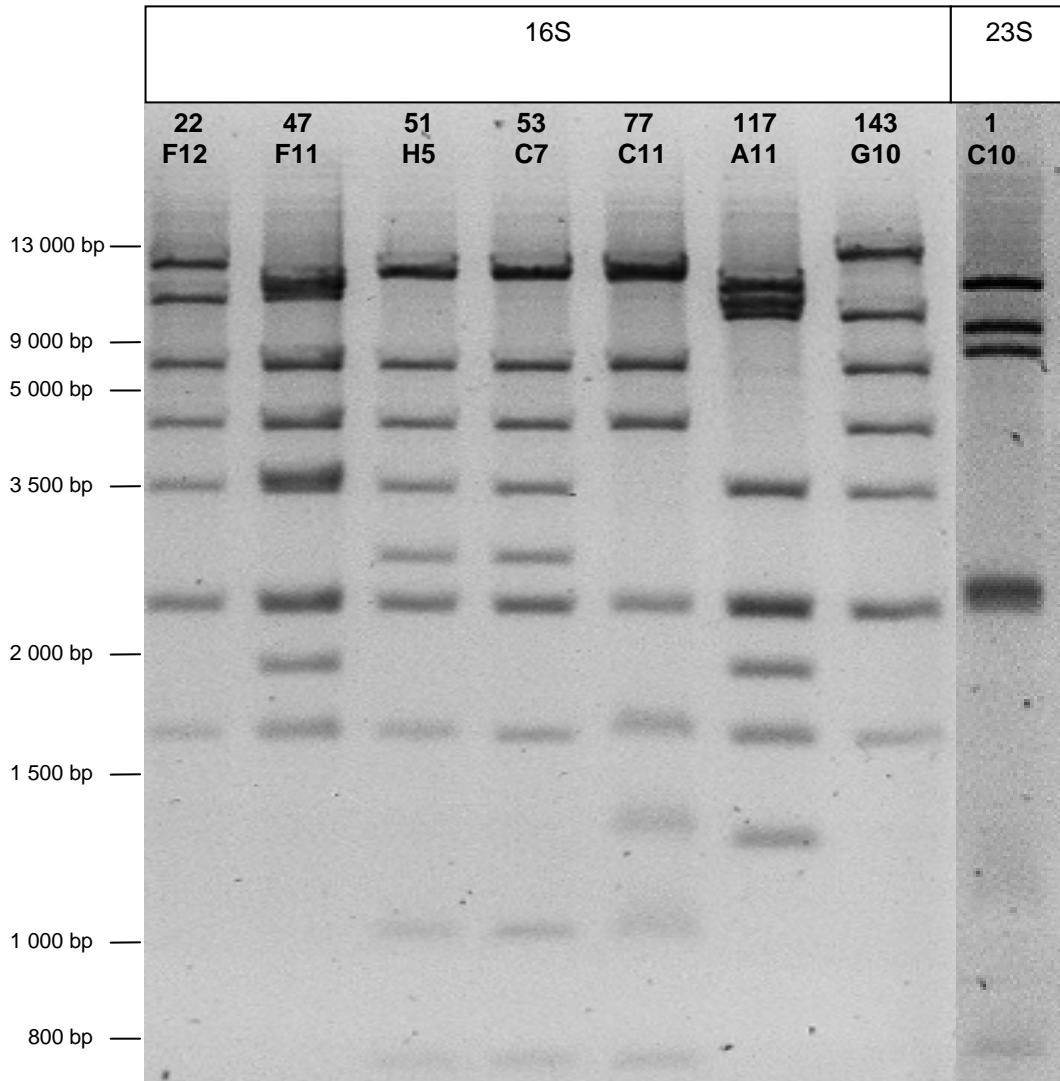


Abbildung C.5: Ergebnis des RFLPs mit EcoRI von den Fosmiden mit 16S und 23S rRNS von TTL1

Das abgebildete Gel wurde mit Produkten des RFLPs von B.14.2.1 beladen und die DNS-Fragmente anschließend durch eine PFGE (8,4h, 14°C, 6V/cm, 0,1-5 sec, 120°) aufgetrennt. Die ersten 7 Fosmide von links besitzen nur die 16S rRNS von TTL1, das erste Fosmid von rechts besitzt die 23S rRNS.

Ergebnisse

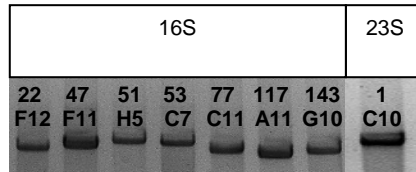


Abbildung C.6: zirkuläre Fosmide aufgetrennt durch eine PFGE

Das abgebildete Gel wurde mit zirkulären ungeschnittenen Fosmiden beladen. Bedingungen der PFGE: 8,4h, 14°C, 6V/cm, 0,1-5 sec, 120°. Die ersten 7 Fosmide von links besitzen nur die 16S rRNS von TTL1, das erste Fosmid von rechts besitzt die 23S rRNS.

C.5.3 Sequenzanalyse der Fosmide

C.5.3.1 Sequenzanalyse der 16S und 23S rRNS Gene

Bei der Sequenzierung gab es zwei Ansätze. Beim ersten Ansatz wurde direkt mit den Primern TTL1-70F und TTL1-1267R für die 16S rRNS von TTL1 und mit den Primern 23S-TTL1-346 und TTL1-23S-1169Rcomp für die 23S rRNS von TTL1 vom Fosmid sequenziert. Dieser Ansatz hat nicht funktioniert. Bei den Sequenzen gab es häufig Doppel-Peaks. Auf Grund dieser Doppel-Peaks waren diese Sequenzen nicht verwertbar.

Beim zweiten Ansatz wurde das PCR-Produkt aller in den Fosmiden klonierten 16 und 23S rRNS Gene von TTL1 sequenziert (siehe B.15.3.1).

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (Rice 2000, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) mit den bereits vorhandenen Sequenzen von 16S (Tönshoff 2004) und 23S rRNS (Pfeiffer 2008) von TTL1 verglichen. Alle 16S und 23S rRNA Fosmid Sequenzen stimmten in den durch PCR herausamplifizierten Sequenzen (siehe B.15.3.1) (kurzes Fragment bei der 23S rRNS Sequenz 823bp) zu 100% mit den bereits bekannten Sequenzen überein.

Ergebnisse

C.5.3.2 Sequenzanalyse der Fosmid-Enden

Die Enden der acht Fosmide wurden mit dem Primerpaar pCC1/F5FP010 und pCC1/F5RP011 sequenziert (siehe B.15.3.2). Danach wurden die Sequenzen mit dem Programm BLAST (Altschul 1990, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert.

Die Sequenzierung fand direkt vom Fosmid statt. Hier hatten ebenfalls einige Sequenzen Doppelpeaks, waren aber dennoch zum Teil verwertbar.

Alle Sequenzen der Fosmid-Enden gaben als ersten BLAST-Hit Sequenzen von *Sodalis glossinidius str. morsitans* (Toh 2006), einem bakteriellen Endosymbionten der Tsetse Fliege, zu dem auch phylogentisch die 16S rRNS Sequenz fällt (Pfeiffer 2008). Die Gene, die sich auf den Fosmid-Enden befinden wurden als essentielle Gene, die in sehr vielen Bakterien ebenfalls vorhanden sind, identifiziert (Tab. C.3, Tab. C.4). Es gibt in der Tabelle C.3 im Vergleich zur Tabelle C.6 leichte Abweichungen in der Identität der Gene, da beim Sequenzieren der Fosmid-Enden oft nur Genfragmente zur Analyse bereit standen. Ebenfalls findet man die Gene *priA* und *mraW* nicht in den vorausgesagten Genen (C.5.4), da diese Gene am Rand des jeweiligen Fosmides liegen und bei der späteren Annotation nicht als Gene identifiziert wurden.

In dieser Sequenzanalyse wurde auch noch, wie im RFLP bereits gesehen, die Identität der Fosmide 51H5 und 53C7 bestätigt.

Tabelle C.3: Blast-Ergebnis der Fosmid-Endsequenzen

| Primer Fosmid | pCC1FosF | pCC1FosR | TTL1 70F | TTL1 1267R | 23S TTL1 346 | TTL1 23S 1169Rcomp |
|------------------|---------------------|--------------------|----------|------------|--------------|--------------------|
| 1C10 | <i>priA</i> 71% SG | <i>murB</i> 70% SG | -- | -- | 100% | 100% |
| 22F12 | <i>murB</i> 71% SG | <i>cdsA</i> 79% BC | 100% | 100% | -- | -- |
| 47F11 | <i>ilvD</i> 68 % SG | <i>dnaE</i> 75% SG | 100% | 100% | -- | -- |
| 51H5 | -- | <i>uppS</i> 79% SG | 100% | 100% | -- | -- |
| 53C7 | -- | <i>uppS</i> 79% SG | 100% | 100% | -- | -- |
| 77C11 | -- | -- | 100% | 100% | -- | -- |
| 117A11 | <i>mraW</i> 72% SG | <i>fumC</i> 78% SG | 100% | 100% | -- | -- |
| 143G10 | <i>yaeT</i> 76% SG | <i>ilvG</i> 79% SG | 100% | 100% | -- | -- |

SG...*Sodalis glossinidius str. morsitans*

Ergebnisse

Tabelle C.4: Funktionen der sequenzierten Gene der Fosmid-Enden

| Gen | Funktion |
|-------------|---------------------------------------|
| <i>ilvD</i> | Aminosäure Biosynthese |
| <i>ilvG</i> | Aminosäure Biosynthese |
| <i>yaeT</i> | Assemblierung äußerer Membranproteine |
| <i>dnaE</i> | DNS Replikation |
| <i>priA</i> | DNS Replikation |
| <i>mraW</i> | Methyltransferase |
| <i>murB</i> | Peptidoglykan Biosynthese |
| <i>uppS</i> | Peptidoglykan Biosynthese |
| <i>cdsA</i> | Phospholipid Biosynthese |
| <i>fumC</i> | TCA Zyklus |

Die Sequenzierung der Enden der Fosmide 1C10 und 22F12 brachten interessante Ergebnisse. Beide Fosmide besitzen Fragmente des *murB* Genes. Durch Analyse mit dem Computerprogramm EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (Rice 2000, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) wurde festgestellt, dass sich auf dem 3'-Ende des Fosmides 1C10 der 5'-Teil des *murB* Genes und auf dem 3'-Ende des Fosmides 22F12 der 3'-Teil des *murB* Genes befindet. Legt man beide Fragmente des *murB* Genes übereinander überlappen sich die Sequenzen in ungefähr 100 Basen (Abb. C.7).

| | | | |
|-------|-----|--|-----|
| 22F12 | 1 | ACGATGGTTAAGCTCAGTTGAATGTCAATTCGGTTATCGCGACAGTATTT | 50 |
| | | | |
| 1C10 | 488 | ACGATGGTTAAGCTCAGTTGAATGTCAATTCGGTTATCGCGACAGTATTT | 537 |
| 22F12 | 51 | TCAAAACATGATCTTTCGCGAAGGTCACGTTATTGTTGCAGTGGGTCTAAGG | 100 |
| | | | |
| 1C10 | 538 | TCAAAACATGATCTTTCGCGAAGGTCACGTTATTGTTGCAGTGGGTCTAAGG | 587 |

Abbildung C.7: Ergebnis der Analyse der Fosmid-Endsequenzen von den Fosmiden 1C10 und 22F12 mit den Programm EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms

Die jeweils obere Sequenz stammt vom Fosmid 22F12 und die jeweils untere vom Fosmid 1C10. In dieser Abbildung sieht man die Überlappung von etwa 100 Basen des *murB* Genes.

C.5.3.3 Sequenzanalyse ausgewählter Fosmide

Die drei ausgewählten Fosmide für die Sequenzanalyse waren das Fosmid 51H5, das durch die Größenbestimmung mit PFGE und dem Programm Image Quant TL als das Größte eingeschätzt wurde und somit den größten Bereich des Genomes

Ergebnisse

von TTL1 abdeckt. Dieses Fosmid wies aber auch im Bezug auf das RFLP Muster Ähnlichkeiten zu den Fosmiden 22F12, 47F11, 53C7, 77C11 und 143G10 auf. Das zweite Fosmid war das Fosmid 117A11, das wegen seines RFLP Musters sich sehr von allen anderen Fosmiden abhob, und somit vermutet wurde, dass dieses Fosmid einen komplett anderen Teil des Genoms von TTL1 abdeckt. Das dritte Fosmid war das Fosmid 1C10 mit der 23S rRNS von TTL1. Auch dieses Fosmid hatte ein im Vergleich zu allen anderen RFLP Mustern der Fosmide grobe Unterschiede. Dass die Auswahl dieser drei Fosmide die richtige war, bzw. dass es die drei Fosmide sind, die den größten Teil, des Genomes von TTL1 abdecken, zeigt die schematische Karte in Abbildung C.8, die nach der Sequenzierung erstellt wurde. Im Anschluss wurde auch noch anhand der Sequenzierdaten aus C.5.3.2 und C.5.3.3 die tatsächliche Größe der Fosmide bestimmt (siehe Tab. C.5).

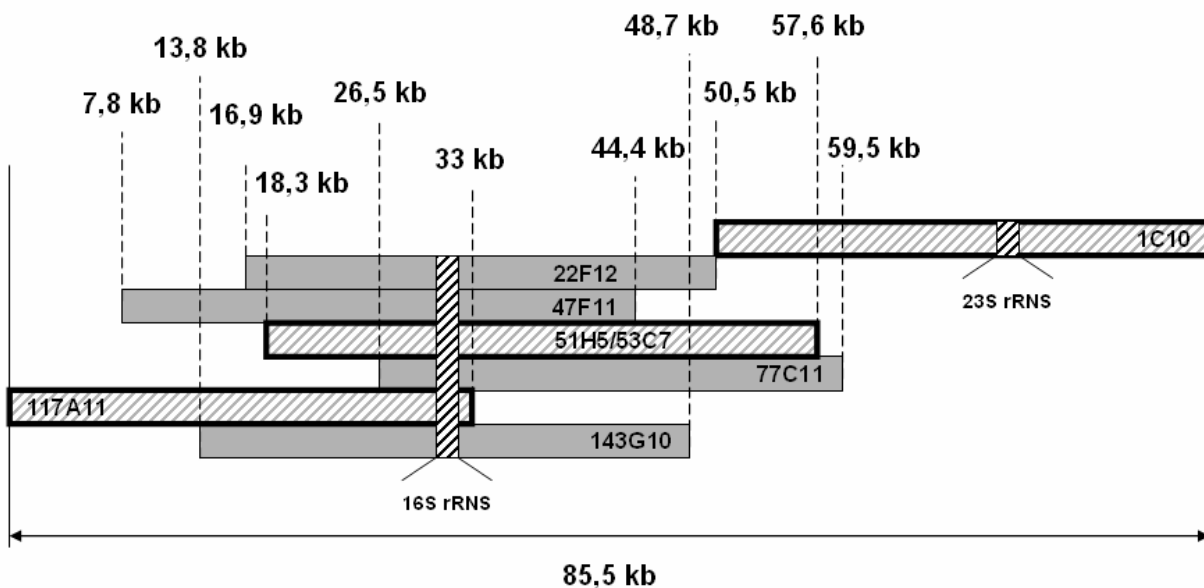


Abbildung C.8: Schematische Karte der acht gefundenen Fosmide

Es wird gezeigt, dass die Fosmide 117A11, 51H5 und 1C10, die für die Sequenzierung ausgewählt wurden, die größte Genomabdeckung von TTL1 aufweisen.

Tabelle C.5: Tatsächliche Größe der Fosmide

| rRNS Gen | 16S | | | | | | | 23S |
|------------------|-------|-------|------|------|-------|--------|--------|------|
| Fosmid | 22F12 | 47F11 | 51H5 | 53C7 | 77C11 | 117A11 | 143G10 | 1C10 |
| Insertgröße (kb) | 33,6 | 36,6 | 39,3 | 39,3 | 33 | 33 | 34,9 | 35 |

Ergebnisse

Nach der Sequenzierung der drei ausgewählten Fosmide 1C10, 51H5 und 117A11 lag ein einzelnes Kontig in der Größe von 85 548 Basen vor (siehe Abb. C.9). Wie schon erwähnt bildeten alle Fosmide zusammen ein einziges Kontig, bei dem sich die Fosmide 117A11 und 51H5 in 14,7 kB und die Fosmide 51H5 und 1C10 in 7,1 kB überlappen. Die Insertgröße der jeweiligen Fosmide wurde nach der Sequenzierung noch einmal bestimmt und ergab für das Fosmid 1C10 35kb, für das Fosmid 51H5 39,3 kB und für das Fosmid 117A11 33 kB. Die Sequenzierung zeigte auch, dass es auf dem gesamten Kontig nur eine 16S und nur eine 23S rRNS gibt. Die Fosmide 117A11 und 51H5 haben jeweils eine 16S rRNS und das Fosmid 1C10 hat eine 23S rRNS Sequenz. Die 16S rRNS liegt genau in dem 14,7 kB langen überlappenden Bereich von den Fosmiden 117A11 und 51H5 auf der Position 30 659 bis 32 150. Die 23S rRNS Sequenz liegt nur auf dem Fosmid 1C10 auf der Position 70 081 bis 73 019. Somit liegen die 16S und die 23S rRNS von einander etwa 40 kb entfernt und bilden daher kein zusammenhängendes Operon. Der GC bzw. AT Gehalt des sequenzierten Genomfragmentes von TTL1 ist 39 bzw. 61%.

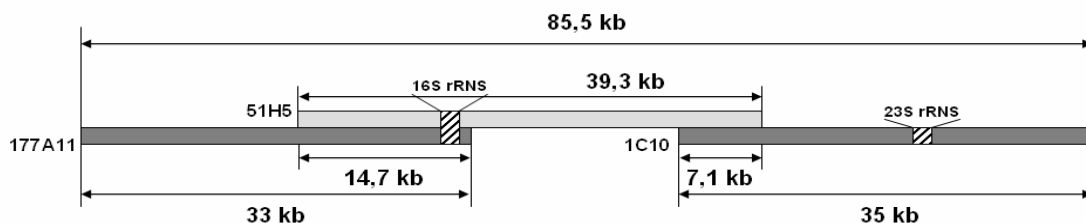


Abbildung C.9: Schematische Darstellung des sequenzierten Fosmid Kontigs der Fosmide 117A11, 51H5 und 1C10 mit den überlappenden Fragmenten und den Positionen der im Screening verwendeten Gene 16 und 23S rRNS.

C.5.4 Annotation der sequenzierten Fosmide

Es wurde eine Annotation der auf den Fosmiden 1C10, 51H5 und 117A11 befindlichen Gene mit den Programmen RAST und blastn durchgeführt (siehe B.15.4).

Insgesamt wurden 57 ORF's automatisch annotiert (siehe Tab. C.6). Unter diesen ORF's befinden sich einzelne Gene für Transkription, Translation, Replikation, Reparatur und Cluster für Gene, die in der Zellwand bzw. -membran Biogenese, im

Ergebnisse

Kohlenhydrat Metabolismus, im Aminosäure Metabolismus und in der Lipidsynthese eine Rolle spielen.

54 dieser vorausgesagten Gene fallen bei der blastn Analyse mit einer Identität von 67 bis 95% Identität zu Genen des bakteriellen Endosymbionten der Tsetse Fliege *Sodalis glossinidius str. morsitans* (Toh 2006). Die restlichen 3 Gene fallen mit ihrer Identität zu den Gammaproteobakterien *Candiadatus Hamiltonella defensa* (Moran 2005) und *Yersinia pseudotuberculaosis* (Challacombe, unpublished).

Es wurde eine Syntenie (Abb.C.10) des Abschnittes 3 771 bis 19 902 von TTL1 zum Endosymbionten *Sodalis glossinidius str. morsitans* Genom im Abschnitt 3 345 004 bis 3 328 797 (Toh 2006) mit dem RAST-Server festgestellt. Dieser Abschnitt weist ebenfalls eine Syntenie zu anderen Bakterien der Gattung *Serratia* und *Yersinia* auf (Daten nicht gezeigt).

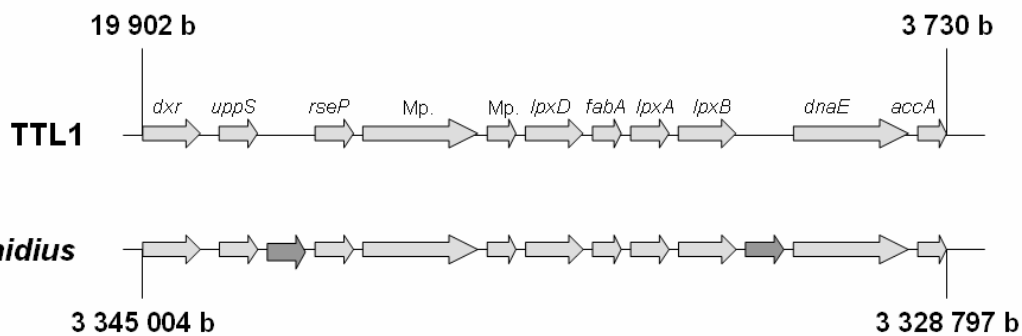


Abbildung C.10: Syntenie von Genomabschnitten zwischen den Endosymbionten TTL1 und *Sodalis glossinidius str. morsitans* (Toh 2006) im Bereich 19 902 bis 3 730 von TTL1 und 3 345 004 bis 3 328 797 von *Sodalis glossinidius str. morsitans*.

Tabelle C.6: Liste aller vermeintlichen vorausgesagten Gene vom 85,5 kb großen Genomfragment von TTL1 durch das Programm RAST. SG...*Sodalis glossinidius str. morsitans* (Toh 2006), HD...*Candiadatus Hamiltonella defensa* (Moran 2005), YP...*Yersinia pseudotuberculaosis* (Challacombe, unpublished)

| Fosmid | Start | Stop | Länge (bp) | Gen | Funktion | Organismus/Identität |
|--------|-------|-------|------------|-------------|-----------------|----------------------|
| 117A11 | 2993 | 2310 | 684 | <i>ung</i> | DNS Reparatur | SG/72% |
| 117A11 | 4730 | 3771 | 960 | <i>accA</i> | Lipid Synthese | SG/79% |
| 117A11 | 8224 | 4742 | 3483 | <i>dnaE</i> | DNS Replikation | SG/75% |
| 117A11 | 10029 | 8878 | 1152 | <i>lpxB</i> | Lipid Synthese | SG/72% |
| 117A11 | 10820 | 10032 | 789 | <i>lpxA</i> | Lipid Synthese | SG/77% |
| 117A11 | 11319 | 10825 | 495 | <i>fabA</i> | Lipid Synthese | SG/85% |
| 117A11 | 12452 | 11430 | 1023 | <i>lpxD</i> | Lipid Synthese | SG/79% |

Ergebnisse

| | | | | | | |
|-------------|-------|-------|------|-----------------|---------------------------------------|--------|
| 117A11 | 12971 | 12456 | 516 | <i>yaeT</i> | Assemblierung äußerer Membranproteine | SG/76% |
| 117A11 | 15491 | 13065 | 2427 | | äußeres Membranprotein | SG/73% |
| 117A11 | 16878 | 15529 | 1350 | <i>rseP</i> | Degradierung | SG/74% |
| 117A11 | 17827 | 16898 | 930 | <i>cdsA</i> | Phospholipid Biosynthese | SG/71% |
| 117A11/51H5 | 18509 | 17763 | 747 | <i>uppS</i> | Peptidoglykan Synthese | SG/78% |
| 117A11/51H5 | 19902 | 18706 | 1197 | <i>dxr</i> | Isopren Biosynthese | SG/72% |
| 117A11/51H5 | 22196 | 20790 | 1407 | <i>gnd</i> | Kohlenhydrat Stoffwechsel | SG/75% |
| 117A11/51H5 | 24086 | 22920 | 1167 | <i>pheA</i> | Aminosäure Biosynthese | SG/72% |
| 117A11/51H5 | 24957 | 24226 | 732 | | Lipoprotein | SG/76% |
| 117A11/51H5 | 25025 | 26068 | 1044 | <i>rluD</i> | rRNS Prozessierung | SG/72% |
| 117A11/51H5 | 26491 | 26255 | 237 | | hypothetisches Protein | |
| 117A11/51H5 | 26994 | 27212 | 219 | | hypothetisches Protein | |
| 117A11/51H5 | 27278 | 27436 | 159 | | hypothetisches Protein | |
| 117A11/51H5 | 27577 | 27759 | 183 | | hypothetisches Protein | |
| 117A11/51H5 | 28230 | 28373 | 144 | | hypothetisches Protein | |
| 117A11/51H5 | 28352 | 28495 | 144 | | hypothetisches Protein | |
| 117A11/51H5 | 30659 | 32150 | 1456 | 16S rRNS | Translation | SG/95% |
| 117A11/51H5 | 32250 | 32325 | 76 | tRNA-Glu | Translation | HD/92% |
| 117A11/51H5 | 32558 | 33952 | 1395 | <i>fumC</i> | TCA Zyklus | SG/74% |
| 51H5 | 34852 | 33995 | 858 | <i>folD</i> | Hydrolase | SG/75% |
| 51H5 | 35050 | 35126 | 77 | tRNA-Arg | Translation | HD/92% |
| 51H5 | 36028 | 35444 | 585 | | hypothetisches Protein | |
| 51H5 | 37192 | 37296 | 105 | | hypothetisches Protein | |
| 51H5 | 37493 | 38389 | 897 | <i>wbbL</i> | LPS Synthese | SG/69% |
| 51H5 | 38370 | 39575 | 1206 | <i>wbbL</i> | LPS Synthese | SG/67% |
| 51H5 | 40491 | 39526 | 963 | <i>waaL</i> | Ligase | SG/73% |
| 51H5 | 41314 | 42429 | 1116 | <i>wbbL</i> | LPS Synthese | SG/73% |
| 51H5 | 44938 | 43079 | 1860 | <i>ilvD</i> | Aminosäure Biosynthese | SG/76% |
| 51H5 | 45919 | 44987 | 933 | <i>ilvE</i> | Aminosäure Biosynthese | SG/80% |
| 51H5 | 46195 | 45965 | 231 | <i>ilvG SSU</i> | Aminosäure Biosynthese | SG/84% |
| 51H5 | 47868 | 46195 | 1674 | <i>ilvG LSU</i> | Aminosäure Biosynthese | SG/78% |
| 51H5 | 50001 | 49042 | 960 | <i>murB</i> | Peptidoglykan Synthese | SG/70% |
| 51H5/1C10 | 51038 | 49998 | 1041 | <i>murB</i> | Peptidoglykan Synthese | SG/71% |
| 51H5/1C10 | 51620 | 52105 | 486 | <i>tadA</i> | tRNS Prozessierung | SG/69% |
| 51H5/1C10 | 53744 | 52800 | 945 | <i>pyrB</i> | Pyrimidin Biosynthese | SG/77% |
| 51H5/1C10 | 56360 | 54996 | 1365 | <i>lysC</i> | Aminosäure Biosynthese | SG/76% |
| 51H5/1C10 | 56383 | 56544 | 162 | | hypothetisches Protein | |
| 51H5/1C10 | 56653 | 56790 | 138 | | hypothetisches Protein | |
| 51H5/1C10 | 56930 | 58609 | 1680 | <i>pgi</i> | Kohlenhydrat Stoffwechsel | SG/75% |
| 1C10 | 61738 | 62067 | 330 | <i>ubiB</i> | Ubiquinon Biosynthese | SG/74% |
| 1C10 | 62591 | 62746 | 156 | <i>ubiB</i> | Ubiquinon Biosynthese | SG/77% |
| 1C10 | 67142 | 65691 | 1452 | <i>trkH</i> | Ionen Transport | SG/77% |
| 1C10 | 69171 | 68470 | 702 | <i>fre</i> | Ionen Transport | SG/75% |
| 1C10 | 70081 | 73019 | 2939 | 23S | Translation | YP/91% |

Ergebnisse

| | | | | <i>rRNS</i> | | |
|------|-------|-------|------|------------------------|------------------------------|--------|
| 1C10 | 73831 | 73352 | 480 | <i>dkxA</i> | Zink Finger | SG/82% |
| 1C10 | 76088 | 76374 | 858 | <i>rpoH</i> | Transkription | SG/78% |
| 1C10 | 79499 | 79374 | 126 | hypothetisches Protein | | |
| 1C10 | 80510 | 81673 | 1164 | <i>pgk</i> | Kohlenhydrat Stoffwechsel | SG/74% |
| 1C10 | 81781 | 82860 | 1080 | <i>fbaA</i> | Kohlenhydrat Stoffwechsel | SG/76% |
| 1C10 | 83860 | 83645 | 216 | <i>rpmE</i> | rRNS Bindung | SG/84% |

D. Diskussion

D.1 Vorversuche zur Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

D.1.1 *In vitro*-Amplifizierung und Klonierung der 23S rRNS-Genen der Endosymbionten TTL1 und TTL4

Bei der Amplifizierung der 23S rRNS Sequenz von dem Endosymbionten TTL1 gab es keinerlei Sequenzunterschiede zur bereits bekannten 23S rRNS Sequenz (Pfeiffer 2008) (siehe C.1.1).

Hingegen bei der Amplifizierung des 23S rRNS Genes von dem Endosymbionten TTL4 gab es zur bereits bekannten Sequenz (Pfeiffer 2008) Unterschiede. Hier stimmte die durch FISH (Amann 1995) bestätigte Sequenz mit der aus C.1.1 amplifizierten Sequenz nur bis zu der Basenposition 1160 von insgesamt 1699 sehr gut überein.

Es besteht hier die Möglichkeit das eine 23S rRNS Sequenz von TTL4, die bereits bekannte (Pfeiffer 2008) und die aus C.1.1 amplifizierte, oder beide zum Teil PCR Artefakte sind. Diese PCR-Artefakte nennt man Chimären. In diesem Fall ist eine Chimäre eine Sequenz, die in der PCR von mehr als einem Template resultiert (Shuldiner 1989). Bei chimären PCR-Produkten startet die Synthese bei einem Template, wird dann unterbrochen und startet dann bei einer Sequenzhomologie bei einem anderen Template (Pääbo 1990). Das zuerst synthetisierte PCR-Produkt kann hier als Primer für ein anderes Template dienen.

Chimäre PCR-Produkte entstehen meist dann, wenn mehr als ein sich in einem bestimmten Abschnitt sehr ähnliches oder gar gleiches PCR Template in einem PCR Reaktionsmix für die Amplifikation zur Verfügung steht (Kopczynski 1994). Dies ist auch hier der Fall gewesen. Als Template wurde aufgereinigte DNS von den Symbionten TTL1 und TTL4 verwendet. Diese DNS kann auch noch mit der DNS von anderen Organismen verunreinigt sein.

Es ist meist auch schwierig solche chimären Sequenzen wirklich als solche zu definieren, wenn es sich bei den Organismen, die PCR-Chimären bilden um nahe Verwandte handelt.

Diskussion

Gerade bei der 16S und 23S rRNS ist diese Chimären Bildung nicht selten, da sich auf diesen Genen oft mehrere hochkonservierte Sequenzabschnitte befinden (Woese 1975).

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der allgemeine Rückwärtsprimer, der hier verwendet wurde, nicht an die Sequenz der 23S rRNS von TTL4 binden kann und somit die Chimären Bildung begünstigt.

Andere Faktoren, die eine solche Chimären Bildung ebenfalls begünstigen sind die Anzahl der PCR Zyklen, die Stringenz bei der PCR und die Härte bei der DNS Isolierung (Wang 1996).

Eine Möglichkeit zu bestimmen, welches dieser PCR-Amplifikate der 23S rRNS von TTL4 das richtige ist, wäre FISH (Amann 1995). Es müssten vier verschiedene Sonden gelegt werden: eine Sonde für den ersten Bereich am 5'-Ende des Genes, eine Sonde kurz vor der Basenposition 1160, eine kurz nach dieser Basenposition 1160 und eine Sonde am 3'-Ende des 23S rRNS Genes von TTL4. Durch verschiedene Sondenkombinationen könnte man bestimmen, welches PCR-Amplifikat das richtige und welches das falsche ist.

D.2 Konstruktion der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

Was bei einer metagenomischen Fosmid Genbibliothek sehr wichtig ist, ist ihre Genomabdeckung. Statistisch gesehen sollte zumindest jeder Abschnitt des Metagenomes mindestens einmal vorhanden sein, um bei einer Analyse, oder einem Genomschluss vernünftige Ergebnisse zu erhalten.

Die Genomabdeckung S einer Fosmid Genbibliothek setzt sich statistisch gesehen aus mehreren Faktoren zusammen: (1) die Gesamtgröße des Metagenomes T , (2) die Gesamtanzahl der Fosmid Klone N_{total} , (3) die Durchschnittsgröße der Inserts der Fosmide C .

Wenn man alle diese Faktoren kennt, kann man mit folgender Formel die Genomabdeckung berechnen:

$$S = \frac{N_{total} \cdot C}{T}$$

Da aber die Genomgröße der Endosymbionten TTL1 und TTL4 noch nicht abgeschätzt ist, wie viele Genomkopien in einem Endosymbionten vorhanden sind und vor allem wie viele Endosymbionten auf ein Insekt kommen, kann man keine Aussage über die Metagenomabdeckung treffen. Eine Aussage anhand von Schätzungen kann man aber treffen, und zwar die Größe der Fosmid-Bibliothek. Wenn man die Anzahl der Klone, nämlich 14 208, mit der Durchschnittsgröße der Inserts in den Fosmiden, nämlich 30-40 kb, multipliziert, kommt man auf eine Größe von 426-568 mb. In diesen 426-568 mb kann sich neben der Symbionten-DNS von TTL1 und TTL4 noch mitochondriale Wirts-DNS, die durch den Filtrationschritt nicht separiert werden konnte, und andere Fremd-DNS von anderen Bakterien befinden.

D.3 Austesten der Analysebedingungen

Das Austesten der Analysebedingungen fand sowohl mit Zellen als auch mit isolierten Fosmiden statt (siehe B.12).

Hier wurde ausgetestet, ob man bei der PCR-Analyse direkt mit Zellen arbeiten kann, oder ob das Verwenden von isolierter Fosmid-DNS bei der PCR zuverlässiger ist. Der Vorteil den man bei Zellen hat, die direkt in die PCR eingesetzt werden ist, dass ein zeitraubender Schritt, nämlich das Isolieren der Fosmid DNS, erspart werden kann (Sambrook 2001).

Da aber die Ergebnisse des Vortestes, bei dem Zellen direkt in die PCR eingesetzt wurden, darauf schließen ließen, dass dieser Analyseansatz nicht immer funktioniert und es daher in weiterer Folge zu falsch negativen Signalen kommen kann, wurde entschieden zuerst die Fosmid DNS zu isolieren und danach mit der isolierten Fosmid DNS als Template die PCR durchzuführen. Wie in C.3 schon gezeigt wurde, ist eine Analyse mit Fosmid DNS im Vergleich zu Zellen für eine Analyse-PCR die sensitivere Methode.

Es wurde auch gezeigt, dass die direkte PCR mit Zellen für dieses Analyse-System zwar eine sehr schnelle Methode, aber sicherlich nicht die Zuverlässigste ist.

Eine Möglichkeit, warum bei einer direkten PCR mit Zellen oft Signale ausfallen, ist, dass die Zellen beim Denaturierungsschritt nicht aufbrechen und so das Template nicht für die Polymerase und Primer zugänglich ist. Das kann unter anderen an der zu kurzen Denaturierungszeit liegen. Eine weitere Möglichkeit ist hier die PCR

Inhibierung durch Salze, die sich in der Medium-Zellsuspension, die in den Reaktionsmix pipettiert wird, befinden.

Möglichkeiten, die zuvor erwähnten Faktoren auszuschließen wären zum einen das Waschen der Zellen, um störende Salze des Mediums zu entfernen und zum anderen das Aufbrechen der Zellen durch ein vorgeschaltetes Aufkochen.

D.4 Analyse der metagenomischen Fosmid-Bibliothek

Um die genaue Position in den 96 MicroWell™ Platten eines jeden Fosmid Klons, der entweder ein 16S oder 23S rRNS Gen von TTL1 oder TTL4 im Insert besitzt, herauszufinden, wurde eine 2 Schritt PCR-Analyse durchgeführt. Zuerst wurden alle Platten Pools auf die gewünschten Gene analysiert. Wenn ein Platten Pool ein positives PCR-Signal für eines dieser Gene gab, wurden bei diesem Platten Pool alle Reihen und Spalten auf das Gen untersucht und somit die Position dieses Fosmid Klons festgelegt (siehe B.13).

D.4.1 PCR-Analyse der 16S und 23S rRNS Gene von TTL1

Bei der PCR-Analyse auf das 16S rRNS Gen von dem Endosymbionten TTL1 wurden 7 Fosmide gefunden, die dieses Gen besitzen. Hingegen bei der Analyse auf das 23S rRNS Gen wurde nur ein Fosmid gefunden, welches dieses Gen enthält. Die PCR-Signale für das 16S rRNS vom Endosymbionten TTL1 waren immer sehr stark und eindeutig. Dies ist auch wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der PCR ungewöhnlich viele Zyklen verwendet wurden, nämlich 42. Die Taq Polymerase macht bei so vielen PCR Zyklen viele Fehler, aber das spielte bei dieser Analyse keine Rolle. Es wird angegeben, dass die hier verwendete Taq Polymerase eine relativ hohe Fehlerrate von 1×10^{-4} bis 1×10^{-5} hat (Tindall 1988).

Weiters wurde auf das Agarose-Gel das gesamte PCR Produkt aufgetragen, um die Banden der PCR-Amplifikate in ihrer Intensität zu verstärken.

Um mehr Template für die Screening PCR zu bekommen bestand auch noch die Möglichkeit der Induktion des Fosmides von einem „single copy“ zu einem „multy copy“ Fosmid. Bei dieser Induktion bekommt man bis zu 200 Kopien des Fosmides

pro Zelle. Da das Induzieren aber mehr als fünf Stunden dauert und in den Pools verschiedene Fosmid Klone vorhanden sind, besteht auch die Gefahr, dass ein Fosmid Klon möglicherweise einen anderen Fosmid Klon überwächst. Das könnte zu verfälschten Ergebnissen führen. Ebenfalls ist bei induzierten Fosmid Klonen nicht die Insert Stabilität gegeben.

Interessant ist auch der Vergleich der Anzahl der gefundenen Fosmide. Wie schon erwähnt wurden 7 Fosmide mit der 16S rRNS gefunden und nur ein Fosmid, das auch die 23S rRNS enthält. Da *E. coli* ein naher Verwandter zu den Endosymbionten TTL1 und TTL4, alle drei sind Gammaproteobakterien, besteht die Möglichkeit, dass in der Nähe der 23S rRNS Fragmente mit für *E. coli* toxischen Genen liegen (Vidal 1991). Diese Gene können einen Promoter besitzen, den *E. coli* auf Grund seines Verwandtschaftsverhältnisses erkennt und die unangebrachte Expression dieses Genes steuert. Das exprimierte Protein könnte dann für *E. coli* letal sein (Bieth 1997).

D.4.2 PCR-Analyse der 16S und 23S rRNS Gene von TTL4

Bei der PCR-Analyse auf das 16S rRNS Gen von TTL4 gab es keinen einzigen Pool, der für dieses Gen ein positives PCR-Ergebnis aufwies.

Auch bei der PCR-Analyse für das 23S rRNS Gen vom Endosymbionten TTL4 wurde schlussendlich kein Klon mit diesem Gen gefunden. Es gab zwar bei der Analyse der Platten Pools zwei, auch durch eine weitere PCR bestätigte Signale. Bei der Analyse der Reihen und Spalten der beiden Poole, verschwand bei einem Pool das Signal ganz. Bei dem anderen Pool konnte sogar die Position des vermeintlichen 23S rRNS Klons bestimmt werden. Nach der Bestimmung der Position dieses Klons wurde das PCR-Signal ebenfalls unspezifisch. Eine Sequenzierung dieses PCR Produktes brachte keinerlei weitere Aufschlüsse über die Sequenz, da es hier bei der Sequenzierung Doppel- und sogar Tripple-Peaks der einzelnen Basen gab.

Auffälligkeiten gab es auch während der Pool-Analyse für das 23S rRNS Gen von TTL4. Wie in Abbildung C.3 gezeigt wurde, gab es viele unspezifische PCR-Signale für dieses Gen.

Ein Grund warum so viele unspezifische PCR Signale detektiert wurden, könnten die Primer für die PCR sein und auch die möglichen Kontaminationen an die die Primer

Diskussion

unspezifisch binden können. Somit könnten diese PCR-Signale falsch positive sein (Agrawal 2008).

Da auch angenommen wird, dass die Insektenendosymbionten A+T reiche Genome haben, kann es sein, dass diese A+T reichen Genome Probleme beim Klonieren und der Fosmidstabilität hervorrufen. Es ist bekannt, dass diese A+T reichen Regionen oft Probleme beim Klonieren verursachen. Ein Grund hierfür könnte die Ausbildung von Sekundärstrukturen sein (Razin 2001).

PCR Signale für Gene können auch durch Rekombination wieder verschwinden. Im Prinzip sind Fosmide sehr stabile Konstrukte. Sie sind F-Faktor basiert (Kim 1992) und in den für die Fosmid Genbibliothek verwendeten *E. coli* EPI300™ T1® Zellen ist das Gen *recA1*, das bei der Rekombination eine entscheidende Rolle spielt, ausgeschaltet. Ganz ausschalten kann man das Rekombinationssystem aber nicht, da es immer wieder zu Rückmutationen kommen kann, oder das noch vorhandene *recBCD* Cluster die Aufgaben von *recA* zum Teil übernehmen kann.

Alles in allem können einige Faktoren die Stabilität der Fosmid Genbibliothek beeinflussen. Im Vorfeld an die Analyse der Fosmid-Bibliothek können das die Isolierungstechnik der in die Fosmid Genbibliothek eingesetzte DNS sein, oder auch die Klonierungstechnik. Wie schon erwähnt sind einige Genomfragmente nicht klonierbar (Vidal 1991). Beim Anziehen der Fosmid Klone können die, wenn auch wahrscheinlich nur sehr seltenen Rekombinationsevents die Stabilität der Bibliothek beeinflussen.

Ein großer Teil des Erfolges bei der PCR-Analyse einer Fosmid Genbibliothek liegt auch bei der Analyse selbst. Hier ist die Auswahl der Analysebedingungen ebenso wichtig wie das Design der entsprechenden Primer. Wie man gesehen hat, wurden mit der hier verwendeten Analyse Methode acht Fosmide mit rRNS Genen vom Endosymbionten TTL1 gefunden. Daraus kann man schließen, dass die Analyse Methode als solche funktioniert hat.

D.5 Analyse der Fosmid Klone mit der 16S bzw. 23 S rRNS von TTL1

D.5.1 Größenbestimmung der Fosmide durch RFLP und PFGE

Alle durch die PCR-Analyse gefundenen Fosmide wurden durch einen RFLP mit EcoRI und einer anschließenden PFGE analysiert (siehe B 15.2).

Die abgeschätzte Insertgröße der Fosmide passt sehr gut mit den von EPICENTRE® Biotechnologies angegebenen und in der Literatur bekannten Größen von 30-40 kb überein. Die Insertgröße der gefundenen Fosmide liegt zwischen 33 und 39,3 kb (siehe Tab.C.5). DNS Fragmente die größer als 45 kb sind, wird man in der Fosmid-Bibliothek nicht finden, da diese nicht zu infektiösen Phagenpartikeln führen.

Die Durchschnittsgröße der Inserts der acht gefundenen Fosmide beträgt 35,6 kb, was genau im Schnitt von 30-40 kb liegt.

Interessant war hier, dass die zwei Fosmide 51H5 und 53C7 dass exakt gleiche RFLP Muster aufwiesen. Der Grund dafür könnte zum Beispiel eine Kontamination sein, bei der ein „well“ einer „96-well“ Platte mit einem dieser Klone kontaminiert wurde. Dies ist aber eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass es im Genom von TTL1 Sollbruchstellen geben könnte, an denen die DNS beim Scheren leichter bricht, als an anderen Stellen.

Beim RFLP weisen alle Fosmide die eine oder andere gleiche Bande auf. Dies deutet darauf hin, dass es die eine oder andere Überlappung der in den Fosmiden klonierten DNS Fragmenten von TTL1 gibt. Das Fosmid selbst besitzt eine Größe von 8.139 bp und hat nur eine Restriktionsschnittstelle von EcoRI bei der Position 332. Folglich muss es also mindestens ein Fragment geben, dass entweder gleich, oder länger als 7.807 bp ist. Dies trifft auch bei allen Fosmiden zu. Wie lange dieses Fragment aber tatsächlich ist, hängt von der am nächsten befindlichen Restriktionsschnittstelle von EcoRI im klonierten Insert ab. Ebenfalls hat sowohl die 16S als auch die 23S rRNS von TTL1 eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym EcoRI.

D.5.2 Sequenzanalyse der Fosmide

D.5.2.1 Sequenzanalyse der 16S und 23S rRNS Gene

Der erste Sequenzierungsversuch, die direkte Sequenzierung vom Fosmid, mit den entsprechenden Primern für die 16S und 23S rRNS von TTL1 ist fehlgeschlagen. Deshalb wurde das PCR-Produkt der 16S und 23S Gene, das von den Fosmiden herunteramplifiziert wurde, für die Sequenzierung verwendet.

Ein Grund, warum die direkte Sequenzierung vom Fosmid fehlschlug, könnte die Sekundärstruktur des sehr großen DNS Konstruktes sein.

Die Sequenzen der 16S rRNS stimmten zu 100% mit der bereits bekannten 16S rRNS von TTL1 überein. Das lässt erstmals darauf schließen, dass es möglicherweise keine unterschiedlichen 16S rRNS Operons auf den isolierten Genomfragmenten von TTL1 gibt. Über die Anzahl der 16S rRNS Operons in TTL1 kann man keine Aussage treffen. Endosymbionten wie *Buchnera aphidicola* haben nur ein rRNS Operon (Shigenobu 2000), wohingegen weniger reduzierte Endosymbionten wie zum Beispiel *Sodalis glossinidius* sieben rRNS Operons haben (Toh 2006).

D.5.2.2 Sequenzanalyse der Fosmid-Enden

Die Sequenzanalyse der Fosmid-Enden zeigte, dass sich an den Fosmid Enden essentielle Gene, die in sehr vielen Bakterien ebenfalls vorhanden sind, befinden. Diese Gene sind unter anderem für Aminosäurebiosynthese, DNS Replikation und für die Phospholipid und Peptidoglykan Biosynthese zuständig.

D.5.2.3 Sequenzanalyse und Annotation ausgewählter Fosmide

Die Sequenzierung der drei ausgewählten Fosmide 1C10, 51H5 und 117A11 brachte ein einzelnes Kontig mit 85,5 kb. Wenn man die Größe der Inserts der Fosmide betrachtet, nämlich 35 kb für 1C10, 39,3 kb für 51H5 und 33 kb für 117A11 kommt man auf eine Länge von 107,3 kb. Hier sollte noch erwähnt werden, dass die Größenabschätzung mittels RFLP, PFGE und ImageQuant TL ähnliche Ergebnisse brachte. Wenn die Sequenzdaten näher betrachtet werden, wurden für die

Diskussion

Sequenzierung genau die Fosmide ausgewählt, die die größte Genomabdeckung von TTL1 aufweisen (siehe Abb.C.8)

Insgesamt wurden 21,8 kb, 14,7 kb bei den Fosmiden 51H5 und 117A11, 7,1 kb bei den Fosmiden 1C10 und 51H5 durch die Überlappung der einzelnen Fosmide verloren.

Wie erwähnt wurde ein G+C Gehalt von 39% auf dem sequenzierten Genomfragment von TTL1 bestimmt. Dieser G+C Gehalt liegt sicherlich im oberen Drittel von bakteriellen Endosymbionten der Insekten. *Carsonella rudii* hat bei einer Genomgröße von 0,16 mb einen G+C Gehalt von nur 17% (Lind 2008). Auch der Insektenendosymbiont *Buchnera aphidicola* hat bei einer Genomgröße von 0,69 mb einen niedrigen G+C Gehalt von 25% (Lind 2008). *Sodalis glossinidius str. morsitans*, der Endosymbiont der Tsetse Fliege hat hingegen bei einer Genomgröße von 4,17 mb einen sehr hohen G+C Gehalt von 54,7% (Toh 2006).

Der hier untersuchte Endosymbiont TTL1 von *Adelges nordmannianae* fällt den Sequenzdaten zu urteilen nach zu den weniger reduzierten Insektenendosymbionten wie *Sodalis glossinidius*. Dies bestätigt auch noch ein etwa 16,1 kb großes Genomfragment von TTL1, dass sehr starke Ähnlichkeiten zu *Sodalis glossinidius str. morsitans* aufweist.

Dementsprechendes ergab auch die Annotation mit RAST. 54 von 57 Genen, das sind knapp 95%, fallen mit 67 bis 95%iger Identität zu Genen von *Sodalis glossinidius str. morsitans*. Alle durch RAST vorausgesagten Gene sind essentielle Gene, die in der Transkription, Translation, Replikation, Reparatur und in der Zellwand bzw. -membran Biogenese, im Kohlenhydrat Metabolismus, im Aminosäure Metabolismus und in der Lipidsynthese eine Rolle spielen. Es wurden keine Gene gefunden, die ein besonderes Merkmal des Endosymbionten TTL1 hervorheben würden.

E. Referenzen

Abbot P., Withgott J. H., Moran N. A. (2001). Genetic conflict and conditional altruism in social aphid colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12068-12071

Agrawal V., Roy N. (2008). Contaminating insert degradation by preincubation colony PCR: a method for avoiding false positives in transformant screening. *Anal Biochem.* 375(1):159-61

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990).

Basic local alignment search tool.

J. Mol. Biol. 215:403-10.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169.

Andersson S.G., Kurland C.G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* 6(7):263-8

Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75

Bandi C., Sironi M., Damiani G., Magrassi L., Nalepa C.A. (1995). The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 259:293–99

Baumann P.(2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu.Rev. Microbiol.* 59:155–89

Referenzen

- Baumann P. (1996).** Levels of *Buchnera aphidicola* chaperonin GroEL during growth of the aphid *Schizaphis graminum*. *Curr Microbiol* 32:279–285
- Baumann P., Moran M.A., Baumann L. (2000).** Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The Prokaryotes*, Springer, New York
- Bieth E., Cahoreau C., Cholin S., Molinas C., Cerutti, Rochiccioli P., Devauchelle G. and Tauber M. (1997).** Human growth hormone receptor: cloning and expression of the full-length complementary DNA after site-directed inactivation of a cryptic bacterial promoter, *Gene* 194 97–105
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T.; Burland V., Riley M., ColladoVides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., et al. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277:1453–1474.
- Beckwith J.R., Zipser D., eds. (1970).** The Lactose Operon. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*
- Boucher, D. G., James, S. & Kresler, K. (1984).** The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 315-347
- Buchner P. (1965).** Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. New York, Interscience
- Challacombe J.F., Bruce D., Detter J.C., Green L., Land M., Munk C., Lindler L.E., Nikolich M.P., Brettin T.** US DOE Joint Genome Institute, Complete sequence of chromosome of *Yersinia pseudotuberculosis*
- Charles H., Godfray J (2004).** "Parasitoids". *Current Biology Magazine* 14 (12): R456
- Chen D.Q., Montllor C.B., Purcell A.H. (2000).** Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomol. Experim. Appl.* 95: 315-323

Referenzen

Chu G., Vollrath D., and Davis R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-1585

Clark M.A., Baumann L., Thao M.L., Moran N.A., Baumann P. (2001). Degenerative minimalism in the genome of a psyllid endosymbiont. *J Bacteriol.* 183(6):1853-61.

Clark M.A., Moran N.A., Baumann P. (1999). Sequence evolution in bacterial endosymbionts having extreme base compositions. *Mol Biol Evol.* 16(11):1586-98.

Clark J.M., Swika R.L. (1977). *Experimental biochemistry*, vol. 2nd edition, W.H. Freeman and Company, San Francisco

Collins J., Hohn B. (1978). Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(9): 4242–4246

Dale C., Young S.A., Haydon D.T., Welburn S.C. (2001). The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98, 1883–1888

Dale C., Jones T., Pontes M. (2005). Degenerative evolution and functional diversification of type-III secretion systems in the insect endosymbiont *Sodalis glossinidius*. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 758–766

Dale C., Plague G.R., Wang B., Ochman H., Moran N.A. (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 12397–12402

De Bary A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose, Verlag von Karl J. Trübner, Straßburg

DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R. (1989). Phylogentic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243, 1360-1363

Referenzen

Douglas A.E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol Rev Camb Philos Soc* 64:409-434

Douglas A.E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annu Rev Entomol.* 43:17-37

Eichhorn O. (1969). Natürliche Verbreitungsareale der Weistannen-Wollläuse (Gattung Dreyfusia) und die Möglichkeit ihrer biologischen Bekämpfung. *Journal of Applied Entomology* 63, 113-131

Fares M.A., Ruiz-Gonzalez M.X., Moya A., Elena S., Barrio E.(2002). Endosymbiotic bacteria: GroEL buffers against deleterious mutations. *Nature* 417:398

Fukatsu T, Nikoh N, Kawai R, Koga R. (2000). The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2748–58

Gillespie D.E., Rondon M.R., Williamson L.L., Handelsmann J. (2005). Molecular Microbial Diversity: Chapter 11 – Metagenomic libraries from uncultured microorganisms. *Taylor and Francis Group*, New York

Graur D., and Li W.-H. (2000). Fundamentals of molecular evolution, 2nd ed., chapter 4. Sinauer, Sunderland.

Haferkamp I, Schmitz-Esser S, Linka N, Urbany C, Collingro A, Wagner M, Horn M, Neuhaus HE. (2004). A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to chlamydiae. *Nature* 432: 622-625.

Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5: 245–249

Referenzen

Handelsman J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669–685

Havil N.P., Foottit R.G. (2007). Biology and Evolution of Adelgidae. *Annu Rev Entomol* 52: 325-349

Horn M. (2008). Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 62: 113-131.

Horn M., Collingro A., Schmitz-Esser S., Beier C.L., Purkhold U., Fartmann B., Brandt P., Nyakatura G.J., Droege M., Frishman D., Rattei T., Mewes H.W., Wagner M. (2004). Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 304(5671):728-30.

Ioannou P.A., Amemiya C.T., Garnes J., Kroisel P.M., Shiyuza H., Chen C., Batzer M.A., de Jong P.J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics* 6,84-89

Kim U.J, Shizuya H., de Jong P.J., Birren B., Simon M.I. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.* 20(5): 1083–1085

Komaki K., Ishikawa H. (1999). Intracellular bacterial symbionts of aphids possess many genomic copies per bacterium. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 717–722.

Kopczynski E.D., Bateson M.M. and Ward D.M. (1994). Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:746-748

Kuykendall L.D. and Elkan G.H (1976). Rhizobium japonicum derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. *Appl Environ Microbiol.* 32(4): 511–519.

Referenzen

- Lambert J.D., Moran N.A. (1998).** Deleterious mutations destabilize ribosomal RNA in endosymbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8):4458-62
- Lind P.A., Andersson D.I. (2008).** Whole-genome mutational biases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(46):17878-83
- McCutcheon J.P., Moran N.A. (2007).** Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:19392–97
- Mebis D. (1994).** Anemonefish symbiosis: Vulnerability and resistance of fish to the toxin of the sea anemone. *Toxicon*, Volume 32, Issue 9, Pages 1059-1068
- Moran N.A., McCutcheon J.P., Nakabachi A. (2008).** Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu. Rev. Genet.* 42:165-90
- Moran N.A., Tran P., Gerardo N.M. (2005).** Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8802–10
- Moran N.A., Russell J.A., Koga R., Fukatsu T. (2005).** Evolutionary relationships of three new species of enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (6), 3302-3310
- Moran N.A., Dale C., Dunbar H., Smith W.A., Ochman H.(2003).** Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta: Hemiptera: Cicadellinae) form a distinct clade with a small genome. *Environ Microbiol.* 5(2):116-26.
- Moran N.A. (2002).** Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* 108:583–586
- Moran N.A., Mira A. (2001).** The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biol.* 2(12)

Referenzen

Moran N.A., Telang A. (1998). Bacteriocyte-associated symbionts of insects: a variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. *Bioscience* 48:295-304

Moran N.A. (1996). Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2873-2878.

Muller H.J. (1964). *Mutat Res* 1: 2-9

Munson M.A., Baumann P., and Kinsey M.G. (1991). Buchnera gen. nov. and Buchnera aphidicola sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *Int J Syst Bacteriol* 41: 566–568

Nakabachi A., Yamashita A., Toh H., Ishikawa H., Dunbar H.E., Moran N.A., Hattori M. (2006). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont Carsonella. *Science.* 314(5797):267

O'Connor M. (1989). Construction of large DNA segments in Escherichia coli. *Science* 244, 1307-1312.

Oliver K.M., Russell J.A., Moran N.A., Hunter M.S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):1803-7

Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., and Olsen G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9:1-55.

Pääbo S., Irwin S.D.M. and Wilson A.C. (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry,* 265(8): 4718-4721

Perotti M.A., Clarke H.K., Turner B.D., Braig H.R. (2006). *Rickettsia* as obligate and mycetomic bacteria. *FASEB J.* 20:2372–74

Referenzen

- Pfeiffer S. (2008).** Phylogenetic analysis of bacterial endosymbionts of the spruce gall adelgid (*Adelges abietis*) & the silver woolly adelgid (*Adelges nordmannianae*). Diplomarbeit, Department für mikrobielle Ökologie, Fakultät für Lebenswissenschaften, Universität Wien
- Profft J. (1937).** Beiträge zur Symbiose der Aphiden und Psylliden. *Z. Morphol. Oekol. Tierre* 32:289–326
- Puritch G.S., Petty J.A. (1971).** Effect of Balsam Woolly Aphid, *Adelges piceae* (Ratz.), Infestation on the Xylem of *Abies grandis* (Doug.) Lindl. *Journal of Experimental Botany*. 22:946-952
- Razin S.V., Loudinkova E.S., Trifonov E.N. and Scherrer K. (2001).** Non-clonability correlates with genomic instability: a case study of a unique DNA region, *J Mol Biol* 307 481–486
- Rice P., Longden I., Bleasby A. (2000).** EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16(6): 276-277.
- Rispe C., Delmotte F., van Ham R.C., Moya A. (2004).** Mutational and selective pressures on codon and amino acid usage in *Buchnera*, endosymbiotic bacteria of aphids. *Genome Res.* 14(1):44-53
- Rocha E.P., Danchin A. (2002).** Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet.* 6:291-4
- Rosati G., (2006).** Extrusive bacterial ectosymbiosis of ciliates. *Prog Mol Subcell Biol.* 41:97-115
- Sambrook J., Russell D.W., (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Referenzen

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467

Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407, 81–86.

Shields K.S.H., Hirth R.T. (2005). Bacterial endosymbionts of *Adelges tsugae* Annand: potential targets for biocontrol? In *Third Symposium on Hemlock Woolly Adelgid in the Eastern United States, Asheville, North Carolina, February 1–3, 2005*, ed. B Onken, R Reardon, pp. 357–59. Morgantown, WV: USDA, For. Serv.

Shuldiner A.R., Nirula A. and Roth J. (1989). Hybrid DNA artifact from PCR of closely related target sequences. *Nucleic Acids Research*, 17:4409

Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., Pace N. R. (1985). Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1379-1384

Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. (1999). *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:71–102

Steffan A.W. (1968). Evolution und Systematik der Adelgidae. *Journal of Pest Science.* 43: 262-275

Stürzer-Gilbert C. (1982). Studies on taxonomy, development and damages of the balsam wooly apid, *Dreyfusia nordmannianae* (Eckst.) in the area of Seefeld-Leutasch (the Northern Tyrol). *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz. Germany, F.R.* 55: 161-164

Referenzen

Tamas I., Wernegreen J.J., Nystedt B., Kauppinen S.N., Darby A.C., Gomez-Valero L., Lundin D., Poole AM., Andersson S.G. (2008). Endosymbiont gene functions impaired and rescued by polymerase infidelity at poly(A) tracts.

Proc Natl Acad Sci USA 105(39):14934-9

Tindall K.R., Kunkel T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 27(16):6008-13

Toenshoff E.R. (2004). Identifizierung der Endosymbionten der Tannentrieblaus (*Dreyfusia nordmanniannae*) & Untersuchung zur Ultrastruktur von Endosymbionten der Akanthamöben, Diplomarbeit, Department für mikrobielle Ökologie, Fakultät für Lebenswissenschaften, Universität Wien

Toh H., Weiss B.L., Perkin S.A., Yamashita A., Oshima K., Hattori M. and Aksoy S. (2006). Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* 16 (2), 149-156

Unterman B.M., Baumann P., McLean D.L. (1989). Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. *J Bacteriol.* 171:2970–2974

Valdivia R.H, Heitman J. (2007). Endosymbiosis: the evil within. *Curr Biol.* 17(11):R408-10

Vidal M., Cairo J., Mateu M.G. and Villaverde A. (1991). Molecular cloning and expression of the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus C1 in *E. coli* effect on bacterial cell viability, *Appl Microbiol Biotechnol* 35 pp. 788–792

von Dohlen C.D., Moran N.A. (2000). Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biol. J. Linn. Soc.* 71:689–717

Referenzen

Wang G.C.-Y., Wang Y. (1996). The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology*, 142: 1107-1114

Werren J.H., Baldo L., Clark M.E., (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 6(10):741-51

White R. G., and M. C. Timbury, (1973). Parasitism: the mechanisms of pathogenicity, p. 35-47. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa.

Wixon J. (2001). Reductive evolution in bacteria: *Buchnera sp.*, *Rickettsia prowazekii* and *Mycobacterium leprae*. *Comp Funct Genom* 2: 44-48

Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271

Woese C.R., Fox G.E., Zablen L., Uchida T, Bonen T., Pechman K, Lewis B.J, Stahl D. (1975). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254, 83 - 86

Yokobata K., Trenchak B., Jong P.J. (1990). Rescue of unstable cosmids by in vitro packaging. *Nucleic Acid Research* 19, 403-404

Zchori-Fein E., Perlman S.J. (2004). Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol.Ecol.* 13:2009–16

G. Anhang

G.1 Abkürzungen

| | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| μ | mikro (10^{-6}) |
| A | Adenin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAC | Bacterial Artificial Chromosome |
| bp | Basenpaar |
| C | Cytosin |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukletidtriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EtOH | Ethanol |
| G | Guanin |
| g | Gramm |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunden |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HCl | Chlorwasserstoff (Salzsäure) |
| kb | Kilobasen (10^3) |
| L | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| m | Meter |
| m | milli (10^{-3}) |
| M | molar |
| mb | Megabasen (10^6) |

Anhang

| | |
|-------------------|---|
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minuten |
| mol | Mol |
| n | nano (10 ⁻⁹) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid (Natronlauge) |
| ORF | offener Leserahmen |
| p | pico (10 ⁻¹²) |
| Pa | Pascal |
| PAC | P1 Artificial Chromosome |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFGE | Pulsfeldgelelektrophorese |
| ph | potentia Hydrogenii |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenplymorphismus |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| rRNS | ribosomale Ribonukleinsäure |
| S | Untereinheit |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunden |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNS | Transfer-Ribonukleinsäure |
| U | Units (Einheiten) |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid |
| α | alpha |
| β | beta |
| λ | lambda |

G.2 Zusammenfassung

Symbiotische Beziehungen zwischen Prokaryoten und Eukaryoten sind in der Natur weit verbreitet. Eine solche symbiotische Beziehung findet man auch bei Insekten. Die ökologischen und evolutionären Auswirkungen dieser prokariotischen Insektenendosymbionten auf ihren Wirt sind vielfältig. Sie beeinflussen den Wirt in der Ernährung, Reproduktion und der Abwehr gegen Umweltstress. Viele dieser Insekten-assoziierten Symbiosen mit Prokaryoten sind so eng, dass einer ohne den anderen nicht überleben würde. In vielen Fällen können diese Endosymbionten im Labor nicht kultiviert werden. In dieser Arbeit wurde eine metagenomische rekombinate DNS Methode verwendet, um die gammaproteobakteriellen Endosymbionten TTL1 und TTL4 der Tannentrieblaus (*Adelges nordmannianae*) zu charakterisieren. *Adelges nordmannianae* wurde im 19. Jahrhundert nach Europa eingeschleppt und ist ein gefährlicher Pflanzenschädling, der Tannenwälder und Christbaumkulturen befällt. Eine metagenomische Fosmid-Bibliothek, bestehend aus 14.208 Fosmid-Klonen, wurde auf Genomfragmente der beiden Insektensymbionten TTL1 und TTL4 mittels PCR untersucht. Als Einstiegspunkte in die metagenomische Fosmid-Bibliothek dienten die 16S und 23S rRNS Gene der beiden Symbionten. Von TTL1 wurden acht Fosmide, sieben mit dem 16S rRNS Gen und ein Fosmid mit dem 23S rRNS Gen gefunden und isoliert. Drei ausgewählte Fosmide wurden sequenziert. Das daraus resultierende 85,5 kb große zusammenhängende Genomfragment von TTL1 wurde annotiert und analysiert. Von dem bakteriellen Symbionten TTL4 wurde kein Genomfragment sowohl mit dem 16S rRNS als auch mit dem 23S rRNS Gen gefunden. Die Rekonstruktion eines solchen endosymbiotischen Genomes gibt Aufschlüsse über die biochemische Abhängigkeit der Symbiose und der biologischen Rolle, die der Symbiont spielt. Ebenfalls bekommt man Einsichten in die evolutionäre Beziehung, die Reduktion und Veränderung des Genomes von bakteriellen Symbionten in Insekten. Erste Auswertungen des 85,5 kb großen Genomfragmentes des Symbionten TTL1 zeigten, dass TTL1 eine ähnliche Genomstruktur wie andere sekundäre Symbionten von Insekten besitzt, und im Vergleich zu bekannten primären Symbionten ein wenig reduziertes Genom hat, was ein möglicher Hinweis auf eine evolutionsgeschichtlich junge Symbiose zwischen der Tannentrieblaus und TTL1 ist. Die Analyse dieses

Genomfragmentes gab auch erste Einblicke in ein Genom von bislang uncharakterisierten Symbionten.

G.3 Summary

Symbiotic interactions between eukaryotes and prokaryotes are widespread in nature. Such symbiotic associations are also found in insects. Prokaryotic insect endosymbionts have diverse evolutionary and ecological effects on their hosts. They affect the host in nutrition, reproduction and defence against environmental stress. Many of the insect associated symbioses with prokaryotes are so closely that the one would not survive without the other. In many cases such endosymbionts cannot be cultivated on laboratory media. In this thesis a metagenomic recombinant DNA method was used to characterize gammaproteobacterial endosymbionts TTL1 and TTL4 of the silver fir woolly aphid (*Adelges nordmanniane*). The silver fir woolly adelgid *Adelges nordmanniane* was introduced into Europe in 19th century. *Adelges nordmanniane* is a serious pest of fir forests and Christmas tree plantations. A metagenomic fosmid library, consisting of 14.208 fosmid clones, of the two insect endosymbionts TTL1 and TTL4 was screened with PCR on genome fragments of the symbionts. The 16S and the 23S rRNA genes served as points of entry into the metagenomic fosmid library. Eight fosmids with genome fragments of the endosymbiont TTL1, seven with the 16S rRNA gene and one with the 23S rRNA gene were found and isolated. Three selected fosmids were sequenced. The resulting 85.5 kb large contiguous genomic fragment was annotated and analyzed. In the case of the endosymbiont TTL4 no genetic fragments with the 16S rRNA and the 23S rRNA gene were found in the fosmid library. The reconstruction of such endosymbiotic genomes gives insights into the biochemical dependence of the symbiosis and the biological role of the symbiont. It is also possible to get insights into the evolutionary relationship, the reduction and the change in the genomes of bacterial symbionts in insects. First analyses of the 85,5 kb large genomic fragment of the symbiont TTL1 showed that the genome structure is similar to other secondary symbionts. The genome is also less reduced than the genome of primary insect symbionts. This is a potential hint that the symbiosis between the silver fir woolly aphid and the symbiont TTL1 is evolutionary young. The Analysis of this genome fragment gives first insights in a genome of so far uncharacterized symbionts.

G.4 Curriculum vitae

Name: Thomas Penz

Geburtsdatum: 18.01.1983

Geburtsort: Wolfsberg

Staatsbürgerschaft: Österreich

Schulische Ausbildung:

1989 – 1993: Volksschule Eberndorf / Kärnten

1993 – 1999: Stiftsgymnasium St. Paul / Kärnten

1999 – 2002: BG und BRG Völkermarkt / Kärnten

2003: Grundwehrdienst Goiginger Kaserne Bleiburg

2003: Studium der Mikrobiologie und Genetik an der Universität Wien

2008: Diplomarbeit am Department für Mikrobielle Ökologie, Wien

Wissenschaftliche Publikationen:

Schmitz-Esser S, Haferkamp I, Knab S, Penz T, Ast M, Kohl C, Wagner M, Horn M. (2008). Lawsonia intracellularis encodes a functional rickettsia-like ATP/ADP translocase for host exploitation. *J. Bacteriol.* 190: 5746-5752.

G.5 Danksagung

Diese Diplomarbeit wurde im Zeitraum von 01.04.2008 bis 31.10.2008 am Department für Mikrobielle Ökologie (DOME) an der Universität Wien unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Wagner durchgeführt.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank:

- Herrn Prof. Dr. Michael Wagner für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Department durchführen zu dürfen und für sein besonderes Engagement die Gruppe zu leiten
- Herrn Prof. Dr. Matthias Horn für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen, für seine Unterstützung, seine Ratschläge, sein Vertrauen in mich und für das Angebot einer PhD-Stelle
- Elena Tönshoff für das, dass sie immer Zeit hatte, niemals die Geduld verlor, für ihre mitreisende Begeisterung zur Wissenschaft und ihre kritische Sichtweise Ergebnissen gegenüber
- Stephan Schmitz-Esser für seine Antworten, seine Hilfe, für das, dass er sich stets Zeit nimmt und für sein Angebot mit ihm zusammenzuarbeiten
- Christian Baranyi für die Morgenstunden im Labor, seine hervorragende Unterstützung und seinen Humor
- Basti für die Gespräche und die Laufrunden
- Ilias für die Diskussionen und seine Art
- Ein Dankeschön auch an alle Mitglieder der Chlamydiengruppe (Jacqueline, Diana, Susi, Silvia, Barbara, Karin, Lena und Albert) und allen anderen DOME-Mitgliedern für die gute Arbeitsatmosphäre

Anhang

Meinen Freunden:

- Sabrina für ihre unendliche Geduld mit mir, für ihre moralische Unterstützung und für das, dass sie immer für mich da ist
- Anna und Kani für ihre langjährige aufrichtige Freundschaft
- Gabi und Franz für ihre Menschlichkeit und Herzlichkeit

Meiner Familie:

- Meinen Eltern Harald und Josefine für den finanziellen Rückhalt, für ihr Vertrauen und die moralische Unterstützung auf meinem Weg