



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Entwicklung eines Oligonukleotid-Mikroarrays für
Diversitätsanalysen von Genen der dissimilatorischen
Bisulfitreduktase in einem sauren Moorsystem

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser:	Manuel Hofer
Matrikel-Nummer:	0106778
Studienrichtung:	Molekulare Biologie
Betreuer:	Prof. Michael Wagner

Wien, Mai 2009

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte und Werke ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

A. Einleitung	7
A.1 Der Schwefelkreislauf	7
A.2 Sulfatreduzierende Mikroorganismen	9
A.2.1 Klassifizierung und Phylogenie der sulfatreduzierenden Mikroorganismen ..	9
A.2.2 Habitate der sulfatreduzierenden Mikroorganismen	11
A.2.3 Ökologische Aspekte der sulfatreduzierenden Mikroorganismen	13
A.3 Die dissimilatorische Sulfatreduktion – die Sulfatatmung	15
A.4 Dissimilatorische (Bi-) Sulfit-Reduktase	16
A.5 Natürliche Feuchtgebiete und ihr Einfluss auf das Klima	17
A.6 Detektion und Identifikation von Mikroorganismen in Umweltproben	20
A.7 Oligonukleotid-Mikroarrays für mikrobielle Studien	21
A.8 Ziele dieser Arbeit	22
B. Material und Methoden	23
B.1 Das Schlöppnerbrunnen Moor	23
B.2 Allgemeine Materialien und Techniken	24
B.2.1 Verwendete Software	24
B.2.2 Technische Geräte	24
B.2.3 Verwendete Gegenstände	25
B.2.4 Verwendete Chemikalien	26
B.2.5 Verwendete Molekularbiologische Kits	27
B.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	28
B.3.1 Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese	28
B.3.2 Puffer und Lösungen für die RNS-Extraktion	30
B.3.3 Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen	31
B.3.4 Antibiotika-Lösungen	31
B.3.5 Puffer und Lösungen für die Plasmid-Miniprep	32
B.3.6 Puffer und Lösungen für Mikroarrayanalysen	32
B.4 Verwendete Klone und Organismen	33
B.5 Oligonukleotid-Sondendesign	34
B.5.1 <i>dsrAB</i> Sondendesign	34
B.5.2 Kontrollsonden	35
B.6 Mikroarray-Herstellung	35
B.6.1 Spotten der Oligonukleotid-Sonden	35
B.6.2 Reduzieren der freien Aldehydgruppen	36
B.7 Synthese der fluoreszenzmarkierten <i>dsrAB</i> -, 16S rRNS- und NTT-mRNS für die Mikroarray-Validation	37
B.7.1 Anzucht und Miniprep der Klone	37
B.7.2 In-vitro Amplifizierung von DNS der Referenzorganismen	38
B.7.3 Synthese und Markierung der RNS via <i>in-vitro</i> -Transkription	41
B.7.4 Optimierung der Ziel-RNS Synthese	43
B.7.5 Chemische Fragmentierung der fluoreszenzmarkierten RNS	44
B.7.6 Bestimmung der Fragmentlänge	45
B.8 Mikroarray-Hybridisierung	45
B.8.1 PolyA-Prähybridisierung	46
B.8.2 Strippen der Objektträger	46
B.8.3 Optimierung der Sensitivität durch Prähybridisieren und Strippen	47
B.8.4 Hybridisierung mit Kontroll-RNS	47
B.8.5 Hybridisierung mit <i>dsrAB</i> -RNS	48
B.8.6 Optimierung des Arrays durch Testen verschiedener Hybridisierungspuffer	48

B.8.7 Ermittlung der optimalen Stringenz durch Änderung der Formamid-Konzentration.....	49
B.8.8 Ermittlung der Mikroarray Sensitivität (Ermittlung der optimalen RNS-Menge für die Sondenevaluierung).....	50
B.9 Scannen und Datenauswertung	50
B.9.1 Scanner und Scannsoftware	50
B.9.2 Ermittlung der optimalen Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer	51
B.9.3 Ermittlung der besten Signalberechnungsmethode und den dazugehörigen Schwellenwerten	51
B.9.4 Evaluierung des <i>dsrAB</i> -FGA-Chips mit fluoreszenzmarkierten <i>dsrAB</i> -Genamplifikaten geeigneter Referenzklonen.....	52
C. Ergebnisse	53
C.1 Analyse der fluoreszenzmarkierten <i>dsrAB</i> -, 16S rRNS- und NTT-mRNS.....	53
C.1.1 Optimierung der <i>in-vitro</i> -Transkription	53
C.1.2 Fragmentieren der fluoreszenzmarkierten RNS	54
C.2 Mikroarray-Hybridisierung	56
C.2.1 Optimierung des Hybridisierungspuffers	56
C.2.2 Optimierung der Sensitivität durch Prähybridisieren und Strippen	57
C.2.3 Qualitätskontrolle der gespotteten Objektträger durch PolyA-Cy5 Prähybridisierung.....	58
C.2.4 Einstellung der Stringenz durch die Formamid-Konzentration	59
C.2.5 Optimierung der Sensitivität durch Ermittlung der optimalen hybridisierten RNS-Menge.....	61
C.2.6 Optimierung der Signalauswertung durch Testen verschiedener Berechnungsvarianten.....	63
C.2.7 Auswertung der Mikroarray-Evaluierung durch hybridisierung <i>dsrAB</i> -Genamplifikaten geeigneter Referenzklone.....	64
D. Diskussion.....	67
D.1 Sensitivität des <i>dsrAB</i> -Mikroarrays.....	67
D.2 Spezifität des <i>dsrAB</i> -Mikroarrays	68
D.3 Evaluierung des habitatspezifischen <i>dsrAB</i> -FGA-Chips	69
D.4 Ausblick	73
E. Zusammenfassung	75
F. Literaturverzeichnis	77
G. Anhang	91
H. Abkürzungsverzeichnis.....	97
I. Danksagung	99
J. Curriculum vitae.....	101

A. Einleitung

A.1 Der Schwefelkreislauf

Die Grundlage des bekannten Lebens basiert auf eng miteinander verbundenen Materialflüssen. Schwefel (S) gehört gemeinsam mit Kohlenstoff (C), Stickstoff (N) und Phosphor (P) (Wiberg 1985) zu den häufigsten Elementen auf unserer Erde. Große Vorkommen an Schwefel sind in der Erdkruste und in Sedimenten als Pyrit (FeS_2) und Gips (CaSO_4) sowie in gelöster Form als Sulfat (SO_4^{2-}) im Meerwasser zu finden. Aufgrund eines großen Bereichs an verschiedenen Oxidationsstufen des Schwefels von -2 (komplett reduziert) bis +6 (komplett oxidiert) sowie der chemischen und biologischen Umwandlung der Intermediate gestaltet sich der Schwefelkreislauf als sehr komplex (Abbildung A1).

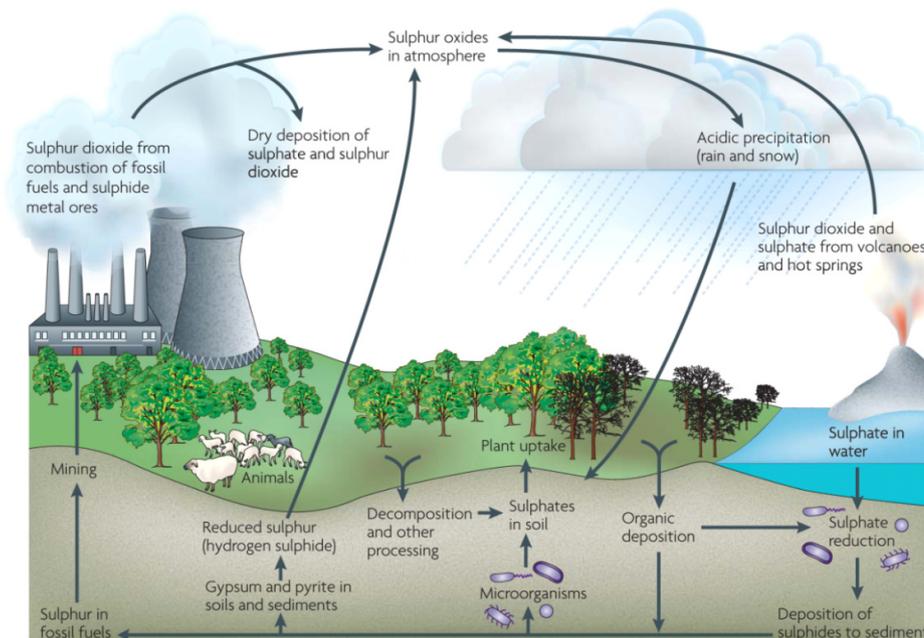


Abbildung A1: Der Schwefelkreislauf. Die größten Schwefelvorkommen auf der Erde sind Eisensulfid (Pyrit; FeS_2) und Gips (CaSO_4), enthalten in Gestein und Sedimenten (7.8×10^{18} g Schwefel) sowie Sulfat im Meerwasser (1.28×10^{18} g Schwefel). Schwefel, ein essentielles Element für Leben, wird von Mikroorganismen und Pflanzen als Sulfat aufgenommen. Die Verbrennung von fossilen Brennstoffen und die Aktivität von Vulkanen setzen große Mengen an Schwefeldioxid in die Atmosphäre frei, welches mit Wasser zu Schwefelsäure und weiter zu saurem Regen reagiert. Mikroorganismen spielen im Schwefelkreislauf eine wichtige Rolle, vor allem im Recycling von Schwefelverbindungen. Abbildung übernommen von Muyzer und Stams (2008).

Zu den wichtigsten Schwefelintermediaten gehören Sulfat (SO_4^{2-}) [+6], elementarer Schwefel (S^0) [-2], Sulfit (SO_3^{2-}) [+6], Thiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) [-2, +6], Tetrathionat ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) [+5, 0] und Sulfid (S^{2-}) [-2]. Eine große Rolle in der Transformation von Schwefelverbindungen spielen Mikroorganismen (Abbildung A2). Dabei wird Sulfat als Nährstoff aufgenommen, reduziert und in schwefelhaltige Aminosäuren und Enzyme wie Methionin und Cystein eingebaut. Weitere wichtige Bestandteile des Schwefelkreislaufs sind Oxidations- und Reduktionsreaktionen, wie die Sulfidoxidation durch chemolithotrophe Schwefelbakterien oder Sulfatreduktion durch sulfatreduzierende Bakterien (SRB), wodurch Energie für den Stoffwechsel erzeugt werden kann. Da sowohl Bakterien als auch Archaea Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor verwenden können, gebrauche ich in dieser Studie den Oberbegriff sulfatreduzierende Mikroorganismen (SRM).

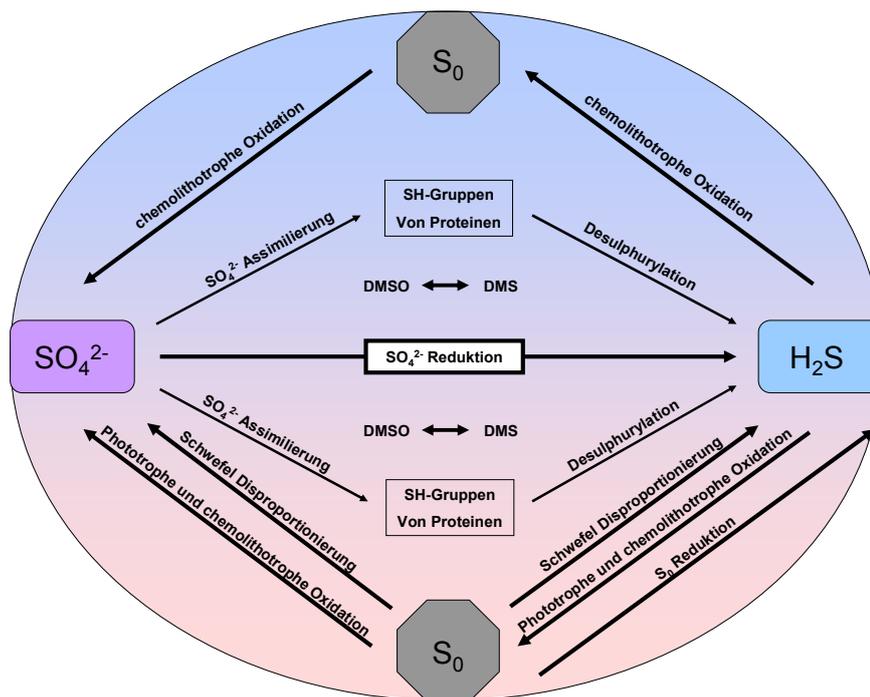


Abbildung A2: Schwefeltransformation. Sulfatreduzierende Bakterien haben eine Schlüsselrolle im Schwefelzyklus und nutzen Sulfate (SO_4^{2-}) als terminalen Elektronenakzeptor für den Abbau von organischen Materialien unter der Produktion von Schwefelwasserstoff (H_2S). Organische Schwefelverbindungen wie Dimethylsulphoxid (DMSO) können durch Mikroorganismen zu Dimethylsulfid (DMS) umgewandelt werden. Abgeändert nach Madigan (2000).

SRM sind in anaeroben Habitaten weit verbreitet, wo sie unter Ausschluss von Sauerstoff Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor für den Abbau von organischen Materialien verwenden. Bei diesem Prozess entsteht Sulfid, welches wiederum von Mikroorganismen verwendet werden kann. So wird Sulfid unter aeroben Bedingungen von chemolithotrophen Schwefelbakterien wie *Thiobacillus* und *Beggiatoa* spp. oder unter anaeroben Bedingungen von phototrophen Schwefelbakterien wie *Chlorobium* spp. zu elementarem Schwefel und Sulfat oxidiert. Die Umwandlung von elementarem Schwefel zu Sulfid nennt man Schwefelreduktion und wird von einer speziellen Gruppe von Mikroorganismen (zum Beispiel *Desulfuromonas* spp.) durchgeführt. Des Weiteren spielt die Schwefel-Disproportionierung (z.B. *Desulfocapsa sulfoexigens*) in der Schwefel-Transformation eine wichtige Rolle, da hier elementarer Schwefel sowohl als Elektronendonator als auch Elektronenakzeptor genutzt wird und so Sulfat und Sulfid entstehen (Finster, Liesack et al. 1998). SRM spielen aber nicht nur im Schwefelkreislauf eine wichtige Rolle, sondern auch im Kohlenstoffkreislauf. So konnte gezeigt werden, dass die organische Kohlenstoff-Mineralisierung in Meeressedimenten bis zu 50% durch SRM katalysiert werden (Jorgensen 1982).

A.2 Sulfatreduzierende Mikroorganismen

A.2.1 Klassifizierung und Phylogenie der sulfatreduzierenden Mikroorganismen

Die Basis der modernen phylogenetischen Studien bildet die ribosomalen RNS (Fox, Stackebrandt et al. 1980; Woese 1987). Das Gen der kleinen bakteriellen ribosomalen Untereinheit steht dabei meist im Mittelpunkt der phylogenetischen Sequenzanalyse, da es zu der Grundausstattung jeder heute lebender Zelle gehört, und in allen Organismen die gleiche Funktion erfüllt. In der mikrobiellen Ökologie bildet die vergleichende Sequenzanalyse einen wichtigen Bestandteil und eine der häufigsten Nachweismethoden.

Der polyphyletische Ursprung einiger SRM deutet auf falsch klassifizierte SRM hin. So wurden einige SRM Spezies einer genaueren taxonomischen Untersuchung unterzogen (Kuever, Konneke et al. 2001; Loubinoux, Valente et al. 2002). Die vergleichenden Sequenzanalyse, basierend auf der 16S rRNS, kann im Fall der SRM durch die Verwendung eines funktionellen Gens als phylogenetischer Marker unterstützt werden. Im Fall der SRM werden Gene der konservierten, das bedeutet dieses Gen besitzt einen hohen evolutionären Erhaltungsgrad, dissimilatorischen (Bi-) Sulfid-Reduktase (*dsrAB*) als phylogenetisches Markermolekül verwendet.

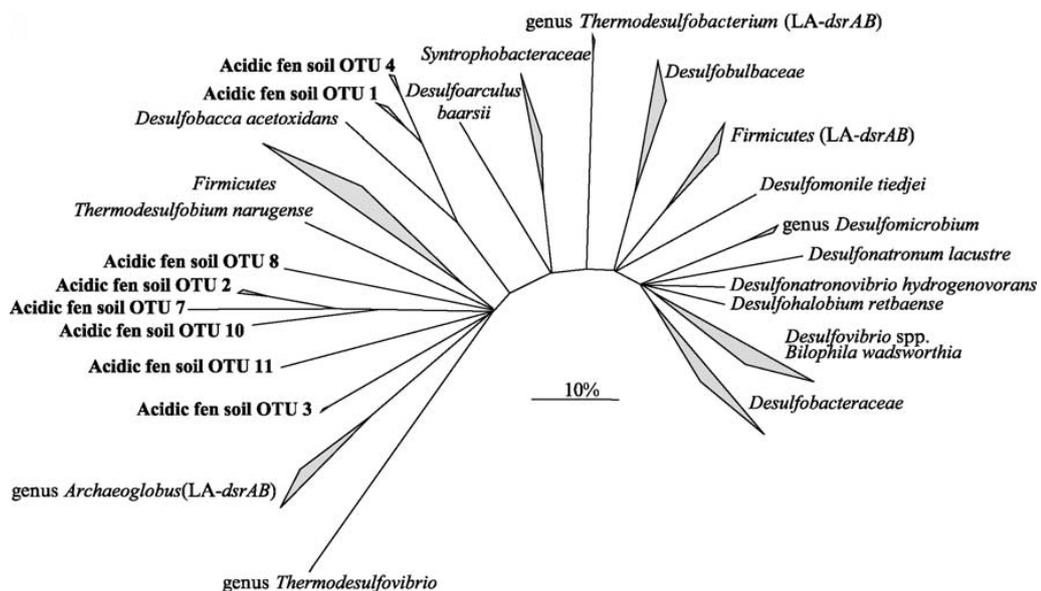


Abbildung A4: Protein Konsensus Baum basierend auf der DsrAB (basierend auf Distanzmatrix-Analysen). Zeigt die Zugehörigkeit noch unkultivierter und tief gefächerter Linien zu den sulfat- oder sulfidreduzierender Bakterien aus einem sauren Niedermoor. Der Balken zeigt 10% Sequenzabweichung. Abbildung übernommen von Wagner (2005).

A.2.2 Habitate der sulfatreduzierenden Mikroorganismen

Die SRM sind nicht nur sehr früh in der erdgeschichtlichen Entwicklung entstanden, sondern haben sich im Laufe der Zeit zu wahren Überlebenskünstlern entwickelt. So haben sie sich perfekt an verschiedene Umweltbedingungen anpassen können und sind deshalb in vielen unterschiedlichen Habitaten zu finden. SRM sind ubiquitär verbreitet und nehmen vor allem in anaeroben Habitaten und Übergängen von

anoxischen zu oxischen Zonen eine wichtige Rolle ein. So wurden SRM in hydrothermalen Tiefsee-Spalten (Jeanthon, L'Haridon et al. 2002), sehr tief gelegenen Goldminen (Baker, Moser et al. 2003), marinen Sedimenten am Peruanischen Kontinentalrand (Schippers and Neretin 2006), Ölfeldern (Nilsen, Beeder et al. 1996), Süßwassersedimenten (Sass, Wieringa et al. 1998), Kohlenwasserstoff-Quellen (Knittel, Boetius et al. 2003; Kniemeyer, Musat et al. 2007) und Kläranlagen (Ramsing, Kuhl et al. 1993; Wawer, Jetten et al. 1997; Dar, Kuenen et al. 2005; Ben-Dov, Brenner et al. 2007; Dar, Yao et al. 2007) detektiert. SRM kommen nicht nur oft in der Umwelt vor, sondern sind auch in der Lage in Habitaten mit extremen Bedingungen zu leben. So konnten sie in Habitaten mit extremen pH-Werten, wie sauren Bergwerk-Entwässerungen (Sen 2001) und sauren Vulkanseen (Koschorreck, Wendt-Potthoff et al. 2003), die einen pH-Wert von 2 erreichen können, oder basischen Seen (Geets, Borremans et al. 2006), die einen pH von bis zu 10 erreichen können, detektiert werden.

Die wohl besten Bedingungen für die Sulfat-Reduktion bieten jedoch marine Sedimente aufgrund der hohen Sulfat-Konzentration (28 mM) und des anoxischen Milieus. So konnte gezeigt werden, dass bis zu 50% des organischen Kohlenstoffs von SRM umgesetzt werden (Jorgensen 1982). In Hinblick auf die SRM gehören marine Sedimente wohl zu den meist untersuchten Ökosystemen (Teske, Wawer et al. 1996; Boschker, Nold et al. 1998; Knoblauch and Jorgensen 1999; Sahm, Knoblauch et al. 1999; Sahm, MacGregor et al. 1999; Ravensschlag, Sahm et al. 2000; Dhillon, Teske et al. 2003; Musmann, Ishii et al. 2005; Webster, Watt et al. 2006; Wilms, Sass et al. 2006; Finke, Vandieken et al. 2007; Leloup, Loy et al. 2007). Konträr zu den marinen Sedimenten wird die Kohlenstoff-Mineralisierung in Süßwasser-Sedimenten nicht von SRM, sondern von methanogenen Archaea dominiert. Ein Grund hierfür ist die im Vergleich zu Meerwasser sehr niedrige Sulfat-Konzentration (10 bis 200 μM) (Ingvorsen, Zeikus et al. 1981). Jedoch kann sogar hier in Ausnahmefällen die dissimilatorische Sulfat-Reduktion bis zu 20% der anaeroben Mineralisierung bewerkstelligen (Savvichev, Rusanov et al. 2003). Zu solchen Süßwasser-Habitaten mit SRM-Aktivität trotz geringer Sulfat-Konzentration gehören Grundwassersysteme, Kläranlagen, heiße Quellen und noch viele andere anaeroben Wassersysteme (Ramsing, Kuhl et al. 1993; Schramm, Santegoeds et al. 1999; Lehman, Roberto et al.

2001; Orphan, Hinrichs et al. 2001; Ito, Okabe et al. 2002; Castro, Newman et al. 2005; Dillon, Fishbain et al. 2007).

Einige SRM sind identifiziert worden, die in Symbiose leben, wie zum Beispiel mit marinen Oligochaeten (Dubilier, Mulders et al. 2001; Blazejak, Erseus et al. 2005), Polychaeten (Cottrell and Cary 1999) oder Archaea (Boetius, Ravensschlag et al. 2000; DeLong 2000; Orphan, Hinrichs et al. 2001). SRM wurden weiter in der Rhizosphäre von Seegrass in Salzmooren nahe der Wurzeln gefunden (Kusel, Pinkart et al. 1999; Nielsen, Finster et al. 2001; Bahr, Crump et al. 2005). Abgesehen von Habitaten mit extremen pH-Werten gibt es einige SRM, die Ökosysteme besiedeln, deren Salzgehalt sehr hoch ist (Foti, Sorokin et al. 2007; Kjeldsen, Loy et al. 2007). *Desulfohalobium retbaense* und *Desulfovermiculus halophilus* sowie die Stämme EtOH3 und Benz sind kultivierte SRM und repräsentieren die halotolerantesten Sulfat-Reduzierer, die bis heute beschrieben wurden. Diese halotoleranten Bakterien haben ihr optimales Wachstum bei Salzkonzentrationen von 100 g/l NaCl und können selbst bei 230 – 240 g/l NaCl noch wachsen (Ollivier, Caumette et al. 1994; Beliakova, Rozanova et al. 2006).

Im Unterschied zu SRM in marinen Ökosystemen ist über SRM in terrestrischen Habitaten nur wenig bekannt. Einige Studien befassen sich mit SRM in regelmäßig überfluteten Gebieten. Durch den ständigen Wassereintrag herrschen dort zum Teil anaerobe Bedingungen. Zu solchen Gebieten gehören zum Beispiel Reisfelder (Ouattara, Patel et al. 1999; Wind, Stubner et al. 1999; Stubner and Meuser 2000; Scheid and Stubner 2001) und Moorsysteme (Alewell and Giesemann 1996; Alewell and Novak 2001; Loy, Kusel et al. 2004).

A.2.3 Ökologische Aspekte der sulfatreduzierenden Mikroorganismen

Schwefelsäure gehört zu den technisch wichtigsten und mit ca. 150 Millionen Tonnen pro Jahr zu den meist produzierten Chemikalien weltweit. Heutzutage wird in vielen industriellen Prozessen Schwefelsäure eingesetzt. Bei diesen Prozessen entstehen meist stark sulfathaltige Abwässer. In diesen Abwässern findet durch SRM Sulfat-Reduktion statt und dabei kommt es zur Produktion von Sulfid, welches

umwelttechnisch problematisch und unerwünscht ist. Zusätzlich ist Schwefelwasserstoff sehr giftig, umweltgefährdend, korrosiv und übel riechend. So verursacht die Sulfatreduktion in der Erdölindustrie Probleme mit Korrosion der Leitungen, Tanks und des technischen Equipments (Magot, Caumette et al. 1992; Magot, Ravot et al. 1997). Des Weiteren kann es zu gesundheitlichen Problemen beim Personal kommen.

Sulfat-Reduktion kann jedoch auch gezielt biotechnologisch zum Umweltschutz verwendet werden. So werden SRM in der Reinigung von schwermetallhaltigem Grundwasser und Abwasser erfolgreich eingesetzt. Diese Reinigung basiert auf den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften von Metallsulfat und Metallsulfid (Hulshoff Pol, Lens et al. 1998). Metallsulfate wie Cadmium-, Kobalt-, Kupfer-, Eisen-, Nickel- und Zinksulfat sind in wässriger Lösung löslich. Die dazugehörigen Metallsulfide hingegen besitzen eine schwache Löslichkeit und können so präzipitiert, abgetrennt und weiter aufgereinigt werden (White and Gadd 2000; Boothman, Hockin et al. 2006; Geets, Vanbroekhoven et al. 2006). Diesen Prozess nützt man zum Beispiel für das Aufreinigen von Abwasser in der Minenindustrie. Oft wird durch die Zugabe von Substraten als Elektronendonator wie Ethanol, Methanol oder wasserstoffreichen Gasen die Sulfat-Reduktion unterstützt. Manche SRM haben sogar die Fähigkeit arsenhaltige Verbindungen als Arsenmineral zu binden (Demergasso, Guillermo et al. 2007) oder Erdölderivate wie Naphthalin und andere aromatische Hydrogenkarbonate in kontaminierten Ökosystemen abzubauen (Rabus, Fukui et al. 1996; Weiner and Lovley 1998; Hayes and Lovley 2002; Kniemeyer, Fischer et al. 2003; Miranda-Tello, Fardeau et al. 2003; Miranda-Tello, Fardeau et al. 2003; Morasch, Schink et al. 2004).

Des Weiteren besitzen SRM die Fähigkeit Metall-Moleküle zu methylieren und demethylieren und so ist es möglich, deren Toxizität durch den Einsatz von SRM zu verändern (Muller, Galushko et al. 1999; Safinowski and Meckenstock 2004).

A.3 Die dissimilatorische Sulfatreduktion – die Sulfatatmung

SRM benützen Sulfat als Elektronenakzeptor um Energie für das Wachstum zu gewinnen. Bei genauerem Betrachten der chemischen Eigenschaften von Sulfat und dessen Reduktionsprozesses zu Sulfid erkennt man, wie unvorteilhaft Sulfat als Elektronenakzeptor für Mikroorganismen eigentlich ist. Der E^0 -Wert der Reduktion von Sulfat zu Sulfid liegt bei -516 mV und damit außerhalb des Arbeitsbereiches der intrazellulären Elektronen-Transporter wie Ferredoxin und NADH (E^0 -Wert von -398 mV und -314 mV). Um Sulfat dennoch als Elektronenakzeptor nützen zu können sind zwei Zwischenschritte nötig. Zuerst wird Sulfat mit Adenosin-5'-Phosphat (ATP) durch die ATP-Sulphurylase (EC 2.7.7.4) zu Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat umgewandelt und durch die Pyrophosphatase zu 2-Phosphat hydrolysiert. Der E^0 -Wert der Reduktion von APS zu Sulfit liegt bei -60 mV. Somit ist die Reduktion von APS durch reduziertes Ferredoxin oder NADH möglich. Bei diesem Reduktionsschritt durch die APS-Reduktase (EC 1.8.99.2) entsteht unter anderem Adenosin-5'-Monophosphat (AMP), welches jedoch durch ATP abhängige Adenylat-Kinasen in zwei Moleküle ADP umgewandelt wird. Im nächsten Schritt wird Sulfit zu Hydrogensulfid reduziert. Dieser Prozess hat ein E^0 von -116 mV und wird von dem Enzym dissimilatorische (Bi-) Sulfit-Reduktase (DSR) (EC 1.8.99.3) katalysiert.

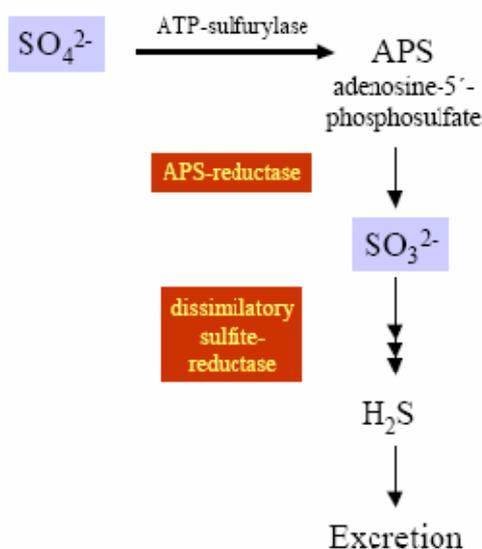


Abbildung A5: Dissimilatorische Reduktion von Sulfat zu Sulfid. Sulfat (SO_4^{2-}) wird mit Adenosin-5'-Phosphat (ATP) durch die ATP-Sulphurylase zu Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) umgewandelt und so für die Reduktion aktiviert. Das entstandene APS wird durch die APS-Reduktase zu Sulfit (SO_3^{2-}) reduziert. Die dissimilatorische (Bi-) Sulfit-Reduktase katalysiert die Übertragung von insgesamt sechs Elektronen auf das Sulfit. Durch diesen Prozess wird Sulfit zu Sulfid weiter reduziert. Abbildung übernommen von Madigan (2000).

Die Dissimilatorische Reduktion von Sulfat zu Sulfid führt zu einer Ausbildung der „*proton motive force*“ an der Membran und weiter zur Produktion von ATP via dem Transmembranprotein ATPase (Odom and Peck 1984; Crane and Getzoff 1996; Madigan 1997). Es konnte durch eine Studie an einem *Desulfovibrio*-Stamm gezeigt werden, dass pro reduziertem Sulfat ein Nettogewinn von 1/4 ATP erzeugt wird (Thauer 2007). Als Elektronendonoren verwenden SRM verschiedene Substrate wie Wasserstoff, kurze Fettsäuren, aromatische Verbindungen, Toluene oder andere organische Verbindungen wie Ethanol (Widdel and Pfennig 1981; Madigan 1997; Dhillon, Teske et al. 2003).

Abgesehen von Sulfat können viele SRM auch andere Elektronenakzeptoren für die anaerobe Respiration nützen. Zu diesen Akzeptoren gehören elementarer Schwefel (Finster, Liesack et al. 1998), Fumarate (Tomei, Barton et al. 1995), Dimethylsulphoxide (Myers and Nealson 1988) und Eisen (III) (Lovley and Klug 1983; Roden and Lovley 1993).

A.4 Dissimilatorische (Bi-) Sulfit-Reduktase

Der letzte und wichtigste Schritt der Energiegewinnung im dissimilatorischen Sulfatreduktions-Weg wird von der DSR katalysiert (Odom and Peck 1984) und wurde bislang in allen Mikroorganismen gefunden, die Sulfat oder Sulfit reduzieren (Molitor, Dahl et al. 1998). Aber nicht nur in SRM wurde die DSR gefunden, sondern auch in so genannten schwefeloxidierenden Bakterien, die sich die DSR zu Nutze machen, um die reverse Reaktion, also die Oxidation von Sulfid zu Sulfit zu katalysieren. Weiter konnte gezeigt werden, dass einige *dsrAB* besitzende und exprimierende Bakterien wie *Pelotomaculum* und *Sporotomaculum* nicht fähig sind, Sulfit und oder Sulfat als Elektronenakzeptor zu nützen, obwohl sie den SRM evolutionär sehr nahe stehen (Brauman, Muller et al. 1998; Imachi, Sekiguchi et al. 2002; de Bok, Harmsen et al. 2005; Imachi, Sekiguchi et al. 2006). Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung von Organosulfonaten als Akzeptor in der anaeroben Respiration von *Bilophila wadsworthia* (Cook, Laue et al. 1998). Dennoch war es Imachi nicht möglich, durch Zugabe von verschiedenen Organosulfonaten das

Bakterium *Pelotomaculum* wachsen zu lassen (Imachi, Sekiguchi et al. 2006). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ihre Fähigkeit Sulfat oder Sulfit zu reduzieren während der Adaption an sulfatarme Umweltbedingungen verloren gegangen oder das richtige Substrat noch nicht gefunden worden ist.

Bei der DSR handelt es sich um ein Enzym mit einem heterotetrameren Kern in einer $\alpha_2\beta_2$ Proteinstruktur (Postgate, Kent et al. 1984). Die Alpha- und Beta-Untereinheiten werden von den in einem Operon liegenden (Hipp, Pott et al. 1997) Genen *dsrA* und *dsrB* codiert. Diese Gene zeigen eine ca. 60% Nukleotid Ähnlichkeit (Dahl, Kredich et al. 1993; Karkhoff-Schweizer, Huber et al. 1995; Hipp, Pott et al. 1997; Molitor, Dahl et al. 1998; Baker, Moser et al. 2003) und sind wahrscheinlich durch Genduplikation aus einem ursprünglichen *dsr* Gen entstanden (Wagner, Roger et al. 1998). In der Aminosäuren-Sequenz aller DsrAB ist ein hoch konserviertes (Cys-X₅-Cys)-X_n-(Cys-X₃-Cys) Motiv zu finden (Klein, Friedrich et al. 2001). Bei diesem Motiv handelt es sich um ein typisches sirohaem-[4Fe4S] bindendes Motiv. Damit gehört die Sulfit-Reduktase gemeinsam mit der assimilatorischen Sulfit- und Nitrit-Reduktase zu einer Proteingruppe mit einem Sirohaem-Cofaktor als prothetische Gruppe (Crane, Siegel et al. 1995; Crane and Getzoff 1996).

Die meisten SRM, die bislang untersucht worden sind, besitzen nur eine Kopie des *dsrAB* im Genom. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *Pyrobaculum aerophilum*, welches nicht zu den SRM sondern zu den Sulfitreduzierenden Mikroorganismen gehört, zwei verschiedenen *dsrAB* Kopien im Genom enthält (Fitz-Gibbon, Ladner et al. 2002).

A.5 Natürliche Feuchtgebiete und ihr Einfluss auf das Klima

In unserer Zeit spielt die Gefahr der globalen Erwärmung und des so genannten Treibhauseffekts eine immer wichtigere Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Feuchtgebiete wie das Torfmoor 3 bis 7% des weltweit freigesetzten Treibhausgases Methan produzieren (Fung 1991). Obwohl solche Gebiete nur 3% der Erdoberfläche ausmachen (Clymo 1987), beherbergen sie bis zu 30% der in der Erde gebundenen Kohlenstoff- und Stickstoffvorkommen (Gorham 1991). Solche Feuchtgebiete

werden regelmäßig auf natürliche Weise überflutet und bieten so ein perfektes Ökosystem für anaerobe Mikroorganismen (Horn, Matthies et al. 2003). Es ist bekannt, dass die Emission von Methan aus Feuchtgebieten das Klima beeinflusst und umgekehrt. So verursacht eine höhere Temperatur auch eine erhöhte Aktivität der Mikroorganismen und häufiger Regen eine Vergrößerung der anaeroben Gebiete, was wiederum zu gesteigerter Emission von Methan führt (Gauci, Matthews et al. 2004).

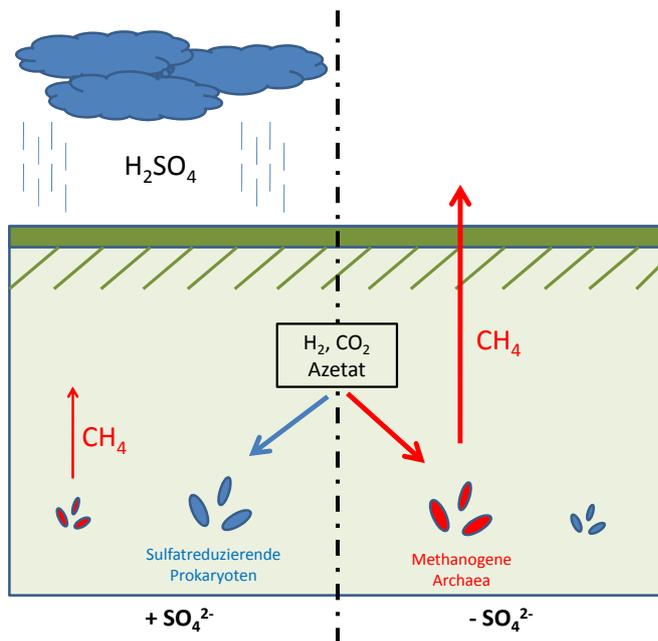


Abbildung A6: Schematische Abbildung des Konkurrenzkampfes zwischen methanogenen Archaea und SRM um die Nährstoffe in einem anoxischen Feuchtgebiet mit und ohne die Präsenz von Sulfat. Durch den Sulfat Eintrag in Form von Sauren Regen, sind SRM in der Lage Wasserstoff, Kohlendioxid und Azetat abzubauen. Wodurch die Emission von Methan durch Methanogenen Archaea reduziert wird.

Aufgrund des hohen Einflusses von Feuchtgebieten auf das Klima und die globale Erwärmung gibt es Untersuchungen mit dem Ziel die Methanemission zu reduzieren. (Lovley and Klug 1983; Gauci, Matthews et al. 2004). Eine Entdeckung zeigt, dass eine paradoxe Situation in Gebieten mit erhöhter Schwefelbelastung vorliegt. Durch den erhöhten Eintrag von Sulfat, meist durch sauren Regen, konkurrieren SRM und methanogenen Archaea um Substrate wie Acetat und Wasserstoff (Abbildung A6). So resultiert aus der Verschmutzung von Feuchtgebieten durch sauren Regen und somit dem Vorhandensein von Sulfat als Elektronenakzeptor eine vorteilhafte Situation für die SRM und eine verringerte Emission vom Methan. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass schon eine Konzentration von 60 bis 105 μM Sulfate die Methanogenese entscheidend inhibieren kann (Lovley and Klug 1983).

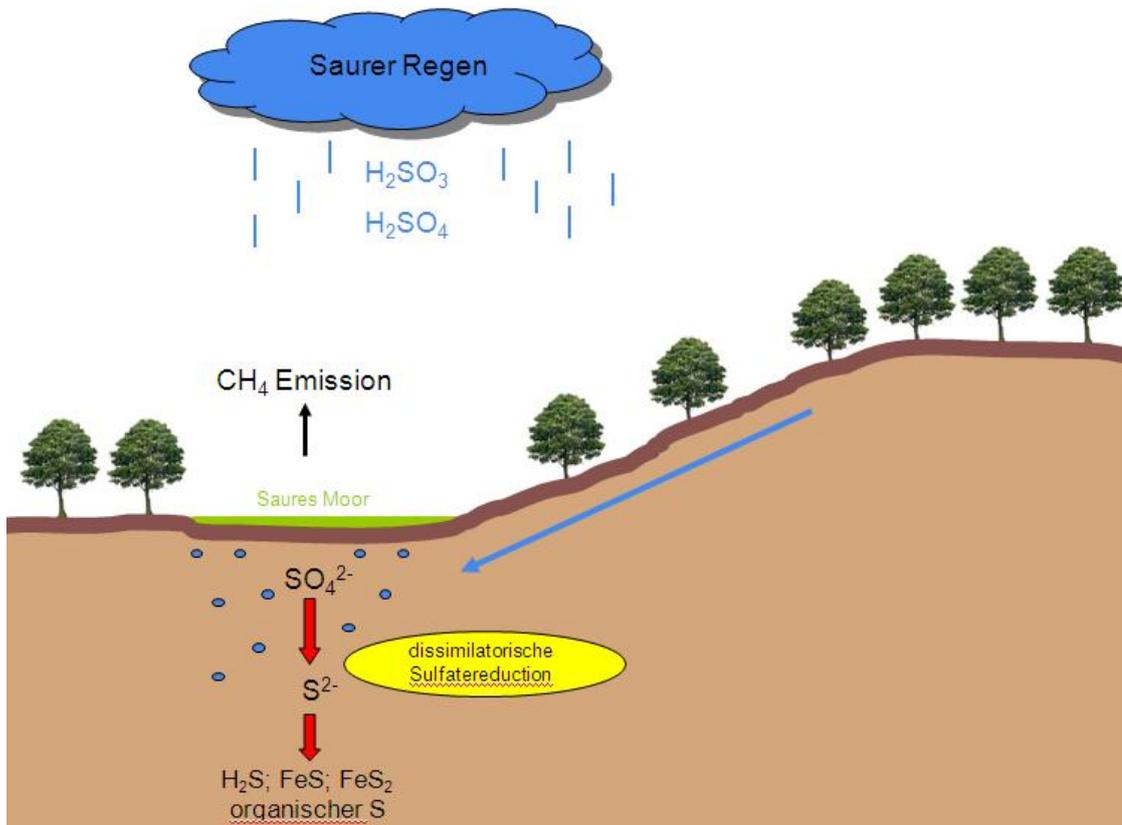


Abbildung A7: Das Modellsystem Schlöppnerbrunnen. Zu sehen sind der Schwefeleintrag, vorwiegend durch Sauren Regen, sowie der Schwefelkreislauf im Einzugsgebiet Lehstenbach, Fichtelgebirge (Bayern), Deutschland. Das durch den Sauren Regen eingebrachte Sulfat wird durch Schneeschmelzen und starken Regen von höher gelegenen Gebieten in das Niedermoor transportiert.

Durch geobiologische Isotopenanalyse der $\delta^{34}S$ -Werte und ^{35}S -Markierungs-Muster wurde in einem sauren Moorsystem im Norden Bayerns dissimilatorische Reduktion von Sulfat nachgewiesen (Alewell and Giesemann 1996; Alewell and Novak 2001; Loy, Lehner et al. 2002). Biochemische Messungen der Moore im Fichtelgebirge von Juli 2001 bis Juli 2004 haben ergeben, dass die obersten 5-10 cm der Erdschicht regelmäßig austrocknen und dadurch Sauerstoff eine maximale Tiefe von 25 cm erreicht. Unterhalb von 30 cm handelt es sich dort permanent um ein anoxisches Habitat (Schmalenberger, Drake et al. 2007).

Durch die erhöhte industrielle Verbrennung von Braunkohle wurde eine große Menge an Schwefeldioxid in die Atmosphäre freigesetzt. Dieses Schwefeldioxid reagiert mit Wasser unter der Entstehung von Schwefelsäure und in weiterer Folge kommt es zu saurem Regen. Obwohl sich der Eintrag von Sulfat durch sauren Regen

stark reduziert hat, werden weiterhin Schwefelverbindungen durch starken Regenfall und Schneeschmelzen aus höher gelegenen Regionen in das Einzugsgebiet geschwemmt (Abbildung A7).

Die angeführten Umstände machen dieses saure Moorsystem namens Schlöppnerbrunnen I und Schlöppnerbrunnen II zu einem idealen Gebiet um SRM in natürlichen Feuchtgebieten zu untersuchen und es wurde deshalb für diese Studie ausgewählt.

A.6 Detektion und Identifikation von Mikroorganismen in Umweltproben

Die Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften in Umweltproben birgt zwei große technische Probleme: (i) die sehr niedrige Konzentration von Ziel-Genen und (ii) und dessen große Variabilität.

Es gibt verschiedene Methoden um Mikroorganismen in Umweltproben zu analysieren. Diese können in kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige Methoden gruppiert werden.

Eine erfolgsversprechende Technologie bei der kultivierungsunabhängigen Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften stellt die DNA Mikroarray-Technik dar. So wird diese Technik bereits für verschiedene Umweltsanwendungen verwendet, wie zum Beispiel Genexpressionsanalysen (Tao, Bausch et al. 1999), Identifikation und Genotypisierung von Bakterien (Cho and Tiedje 2001) sowie für die Detektion von funktionellen Genen (Wu, Thompson et al. 2001).

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung eines Mikroarrays ist die spezifische und zugleich sensitive Detektion vieler verschiedener Sequenzen des Ziel-Gens.

A.7 Oligonukleotid-Mikroarrays für mikrobielle Studien

Ein Mikroarray besteht aus einer genauen Anordnung von Sonden (Oligonukleotiden, DNS-Fragmenten, Genomischer DNS und Proteinen), aufgetragen und fixiert auf einer soliden Oberfläche. Bei der Oligonukleotid-Mikroarray Technologie handelt es sich um eine miniaturisierte, parallele Detektions- und Quantifikationsmethode von Nukleinsäuren, die eine sehr hohe Durchsatzrate an Proben erlaubt. Diese Methode wurde das erste Mal zur Detektierung von *Arabidopsis thaliana* Expressionsmustern eingesetzt (Schena, Shalon et al. 1995). Die Oligonukleotid-Mikroarray Technologie basiert auf dem Fundament der komplementären Basenpaarung, bekannt als Hybridisierung, und wurde das erste Mal 1975 von Ed Southern beschrieben. Das Hybridisierungssystem besteht aus zwei Partnern, wobei der eine bekannt ist und der andere durch Hybridisierung identifiziert wird. Der eigentliche Durchbruch dieser Methode gelang erst durch die Entwicklung von Techniken, die es erlaubten Sonden mit hoher Dichte auf unporöse Träger aufzutragen. Heutige Mikroarrays zeigen großes Potential in der Untersuchung von diversen Umweltproben und werden in vielen Forschungsgebieten wie Pathogen-Untersuchungen von Trinkwasser (Lemarchand, Masson et al. 2004), humane, veterinärmedizinische und botanische Diagnostik (Mehta, O'Driscoll et al. 2007; Merk and Martin 2008) sowie in der mikrobiellen Ökologie (Loy, Lehner et al. 2002; Loy, Schulz et al. 2005) und der industriellen Mikrobiologie eingesetzt. Gerade in den letzten acht Jahren sind viele neue Anwendungsgebiete in Publikationen beschrieben worden, wobei technische und bioinformatische Erneuerungen das Potential dieser Technik noch verbessern werden.

Die Herstellung eines Mikroarrays, angefangen von der *de novo*-Entwicklung bis zur finalen Anwendung (Untersuchung von unbekanntem Umweltproben), ist ein sehr komplexer und zeitaufwendiger Prozess, der in dieser Studie näher beschrieben wird.

A.8 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es einen Oligonukleotid-Mikroarray, basierend auf dem funktionellen *dsrAB* Gen, zur Untersuchung von SRM in den sauren Niedermooren Schlöppnerbrunnen I & II zu entwickeln. Diesbezüglich waren das Testen eines neuen Sondensatzes (i), die Entwicklung einer neuen Methodik zu Synthetisierung der Ziel-RNS (ii) und die Optimierung der Hybridisierungs- und Waschbedingungen (iii) wichtige Bestandteile.

- I. Das Testen und Validieren des neuen Sondensatzes basierend auf einer *dsrAB* Sequenzdatenbank, aufbauend auf einer früheren Studie (Loy, Kusel et al. 2004) erfolgte durch Hybridisieren mit Ziel-RNS ausgewählter und spezifischer Referenzen.
- II. Die Methodik zur Synthese von Ziel-RNS ausgehend von Umwelt-DNS der SRM für die Hybridisierung wurde adaptiert.
- III. Um eine gute Spezifität und Sensitivität des Mikroarrays zu gewährleisten wurden die optimalen Hybridisierungsbedingungen in dieser Arbeit ermittelt.

B. Material und Methoden

B.1 Das Schlöppnerbrunnen Moor

Das Einzugsgebiet des Lehstenbach befindet sich im Fichtelgebirge, im Nordosten Bayerns. Dieses Gebiet umfasst 4.2 km², liegt in einer Höhe von 694-877 m über dem Meeresspiegel und 90% der Waldfläche besteht aus norwegischen Fichten (*Picea abies*, Karst). Die Hochlanderde des Einzugsgebietes entstand aus verwittertem Granitgestein und bildet heute vorwiegend Cambisol und Cambic Podzol. Dieses Gebiet besteht zu ca. 30% aus Sümpfen und Mooren bei einer Jahresdurchschnittstemperatur von 5 °C und einem Jahresniederschlag von 900-1160 mm. Das Schlöppnerbrunnen Moor besteht aus zwei Niedermoores, dem Schlöppnerbrunnen I (SbI) (50°08'14"N, 11°53'07"E) und Schlöppnerbrunnen II (SbII) (50°08'38"N, 11°51'41"E).

Bei dem untersuchten Habitat SbI handelt es sich um ein mesotrophes Niedermoor (Paul 2003), hauptsächlich von Moosen der Gattung *Sphagnum* und Kiefern bewachsen. Die Erdschicht besteht aus wenig zersetztem Torf und ist, bis auf wenige Ausnahmen, ganzjährig mit Wasser gesättigt. Das Schlöppnerbrunnen Moor II ist nahezu vollkommen mit Gras der Gattung *Molinia caerulea* (L. Moench), *Eriophorum vaginatum* (L.), *Carex canescens* (L.) and *Juncus effuse* (L.) bewachsen und ganzjährig mit Wasser gesättigt.



Abbildung A8: Das Untersuchungsgebiet Schlöppnerbrunnen II im Mai 2007.

B.2 Allgemeine Materialien und Techniken

Alle während dieser Arbeit verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit Reinstwasser (im folgenden H_2O_{UHQ}) hergestellt (Biocel Millipore, MilliQ, Billerica, USA). Alle Chemikalien, außer anders angegeben, wurden in p.a. Qualität verwendet. Zum Schutz vor Kontaminationen wurden alle Lösungen und Puffer, außer anders vermerkt, zwanzig Minuten bei 121 °C und einem Bar Überdruck autoklaviert (Varioclav 135S, H+P, München, Deutschland).

B.2.1 Verwendete Software

Tabelle B1: Verwendete Software

Programm	URL	Referenz
Mfold	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/old/rna/	(Zuker 2003)
DNA / RNA / Protein / Chemical Molecular Weight Calculator	http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html	Chang Bioscience
ARB-software-package	http://www.ARB-home.de/	(Ludwig, Strunk et al. 2004)
Basic Local Alignment Search Tool	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	(Altschul, Gish et al. 1990)
Oligonucleotide Properties Calculator	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	(Kibbe 2007)
Commoligo	zhouj@ornl.gov	(Li, He et al. 2005)

B.2.2 Technische Geräte

Tabelle B2: Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Bead beater Fast Prep FP 120	Savant Instruments Inc. Holbrook, NY
DNS Sequenzierer Applied Biosystems 3130	Applied Biosystems Lincoln, USA
Energieeinheit für Gel Elektrophorese: PowerPac Basic	Biorad, München, Deutschland
Gel Dokumentationsdystem: Media System FlexiLine 4040	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
Gel Elektrophorese: Sub-Cell® GT	Biorad, München, Deutschland
Gel Wanne: Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray (15×15 cm)	Biorad, München, Deutschland
Heizblock: VWR Digital Heat block	VWR international, West Chester, PA, USA
Laminar: flow hood Safe 2010 Model 1, 2	Holten, Jouan Nordic, Allerød, Denmark
Magnetrührer: RCT basic Variomag® Maxi	IKA® Werke GmbH, Schwabach, Deutschland Variomag®, Dayton Beach, FL, USA
Mikroarray Lesegerät: GenePix Personal 4100A	Axon Instruments, Union City, USA
Mikroarray Spotter: MicroGrid 600	Genomic Solutions Inc. Ann Arbor, USA

Material und Methoden

Mikrowelle MD6460	Microstar
PCR thermocyclers: iCycler iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Mastercycler gradient	Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter WTW inoLab Level 1	Wissensch. Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Photometer: NanoDrop® ND-1000 NanoDrop® ND-3300	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Pipetten: Pipetman® P2 – P1000 Eppendorf Research® pipettes 1 – 1000 µl	Gilson international, Wien, Austria Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage: Biocel Millipore MilliQ	Billerica, USA
Thermo TWISTER comfort	QUANTIFOIL Instruments GmbH, Jena, Deutschland
Thermoblock	VWR, USA
Transilluminator: UST-30M-8E (312 nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad: DC10 Thermo GFL Typ 1004	Haake, Karlsruhe, Deutschland Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Wasserdampf Hochdruckautoklave: Varioclav 25T Varioclav 135S	H+P, München, Deutschland H+P, München, Deutschland
Zentrifugen: Mikro 22 R Rotina 35 S	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

B.2.3 Verwendete Gegenstände

Tabelle B3: Verwendete Gegenstände

Gebrauchsgegenstand	Hersteller
Reaktionsgefäß (RG), verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben DURAN®, Verschiedene Größen	Schott Glas, Mainz, Deutschland
Microtiterplatten: Microtiterplates Microseal TM 96, V-form Thermo-Fast® 96 QPCR plates U96 MicroWell Plates, 0,5 ml	MJ Research, Waltham, MA, USA Peqlab Biotechnology GmbH, Deutschland Nunc TM Serving life science, Roskilde, Dänemark
Microseal Folien: Microseal "A" film Microseal® "F" film Microseal® "B" film	MJ Research, Waltham, MA, USA Biorad, München, Deutschland Biorad, München, Deutschland
PCR tubes, 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Röhrchen, konischer Boden verschiedene Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Spitzen, verschiedene Größen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
HybriWell Sealing System HBW 2222	Grace Bio-Labs, Inc., Bend, USA
Microarray VSS-25 Silylated Slides	CEL Associates, Inc., Pearland, Texas, USA

B.2.4 Verwendete Chemikalien

Tabelle B4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Agarose, electrophoresis Grade	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA Cambrex
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Borsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Di-methylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol absolut	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidium bromid (EtBr)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylene-di-amine-tetra-acetic acid (EDTA), di-sodium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Fluorescein Calibration Dye	Biorad, München, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-propanol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Lysozym	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol (PCI)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat (KAc)	J. T. Baker, Deventer, Holland
Proteinase K	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat (Na-acetate)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natrium dodecyl Sulphat (SDS)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxide (NaOH)	J. T. Baker, Deventer, Holland
Natrium-Di-Hydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	J. T. Baker, Deventer, Holland
SYBR® Green I	Cambrex Bio Science, Rockland, Inc., Rockland, ME, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Oxoid LTD., Hampshire, England
X-Gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Yeast extract	Oxoid LTD., Hampshire, England
10X Taq Buffer with KCl	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
2X RNA Loading Dye	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
Chloroform / Isoamyl-Alkohol (CIA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Cy3™ UTP	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Cy5™ UTP	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Denhard's solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Deoxyribonuclease I (Dnase I)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dnase I Reaktions Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
dNTP Mix	Fermentas International Inc., Ontario, Canada

Material und Methoden

Formamid (FA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Glykogen	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
Magnesiumchlorid $MgCl_2$	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Phenol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Poly-Ethylene-Glycol 6000 (PEG)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
RiboRuler™ RNA Ladders, High Range	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
Rnase Away	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
RNAasin	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
T3-RNS-Polymerase	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
T3-RNS-Polymerase 5X Transkription Puffer	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
Tetra-Methyl-Ammoniumchlorid (TMAC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
Zinksulfat $ZnSO_4$	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

B.2.5 Verwendete Molekularbiologische Kits

Tabelle B5: Verwendete Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
Power Soil™ DNA Kit	MOBio Lab. Inc., Salana Beach, CA, USA
QIAquick PCR purification kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning®	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas International Inc., Ontario, Canada
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNA Power Soil Kit	MOBio Lab. Inc., Salana Beach, CA, USA
RNeasy Min Elute Cleanup Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

B.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

TE Puffer

Tris	10 mM
EDTA	5 mM
pH 8.0 (mit HCl eingestellt)	

PBS

PBS Stammlösung (Na_xPO₄)

NaH ₂ PO ₄	200 mM
Na ₂ HPO ₄	200 mM
pH 7.2 -7.4 und pH 8.0	

(Der pH wurde durch das richtige Verhältnis von NaH₂PO₄ zu Na₂HPO₄ eingestellt.)

1 x PBS

NaCl	130 mM
PBS Stammlösung	10 mM
H ₂ O _{UHQ}	ad 1000 ml
pH 7.2-7.4	

3 x PBS

NaCl	390 mM
PBS Stammlösung	30 mM
H ₂ O _{bidist}	ad 1000 ml
pH 7.2 -7.4	

B.3.1 Lösungen und Standards für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE Puffer

50 x TAE

Tris	2 M
Natriumacetat	500 mM
EDTA	50 mM
pH 8,0 mit Eisessig einstellen	

1 x TAE

50 x TAE	20 ml
----------	-------

H₂O_{DEPC} ad 1000 ml

TBE Puffer

10 x TBE

Tris 890 mM

Borsäure 890 mM

EDTA 20 mM

H₂O_{UHQ} ad 1000 ml
pH 8.3 – 8.7 (45 °C)

1 x TBE

10 x TBE 100 ml

H₂O_{UHQ} ad 1000 ml

Auftragspuffer

Ficoll 25% (w/v)

Bromphenolblau 0.5% (w/v)

Xylencyanol 0.5% (w/v)

EDTA 50 mM

Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in H₂O_{UHQ}

Ethidiumbromid-Färbelösung

EtBr-Stammlösung 1:10000 in H₂O_{UHQ} verdünnen

SYBR Green I-Lösung

SYBR Green I-Stammlösung

SYBR Green I 10000 x Konzentrat in DMSO

SYBR Green I-Färbelösung

SYBR Green I-Stammlösung 1:10000 in H₂O_{DEPC} verdünnen

DNS-Längenstandards (KbL)

250-10000 bp DNS Leiter (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas International Inc., Ontario, Canada)

RNS-Längenstandards (KbL)

100-1000 bp RNS Leiter (RiboRuler™ RNA Ladder, Low Range, ready-to-use, Fermentas International Inc., Ontario, Canada)

200- 6000 bp RNS Leiter (RiboRuler™ RNA Ladder, High Range, ready-to-use, Fermentas International Inc., Ontario, Canada)

B.3.2 Puffer und Lösungen für die RNS-Extraktion

Hexadecyltrimethylammonium Bromid (CTAB) Extraktionspuffer 1

PBS Stammlösung pH 8.0	200 mM
NaCl	100 mM
CTAB	0.2% wt/vol
EDTA	50 mM
DTT	1 mM

Der Puffer wurde autoklaviert und das DTT erst vor Gebrauch zugegeben.

Hexadecyltrimethylammonium Bromid (CTAB) Extraktionspuffer 2

CTAB	0.6% wt/vol
Natrium-Acetat	50 mM
DTT	1 mM

Dem Puffer wurden 100 µl DEPC zugegeben und es wurde 24 Stunden im Abzug gerührt. Danach wurde der Puffer autoklaviert und das DTT vor Gebrauch zugegeben.

Polyethylenglykol (PEG) Lösung

PEG 6000	20% wt/vol
NaCl	2.5 M

Dem Puffer wurden 100 µl DEPC zugegeben und es wurde 24 Stunden im Abzug gerührt sowie anschließend autoklaviert.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)

Phenol pH 8.0 - Chloroform - Isoamylalkohol 25 : 24 : 1 v/v

Chloroform-Isoamylalkohol (CIA)

Chloroform - Isoamylalkohol 24 : 1 v/v

Kaliumacetat Lösung

KAc 7.5 M
H₂O_{DEPC}

B.3.3 Nährmedien zur Anzucht von *E.coli*-Stämmen

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Trypton 10.0 g/l
Hefeextrakt 5.0 g/l
NaCl 5.0 g/l
H₂O_{UHQ} ad 1000 ml
pH-Wert auf 7.0 – 7.5 einstellen

B.3.4 Antibiotika-Lösungen

Die verwendeten Antibiotika-Stammlösungen wurden steril filtriert (0.22 µm Porengröße, Merck) und bei -20 °C aufbewahrt. Die Flüssigmedien mit Antibiotika-Stammlösungen wurden bei Bedarf frisch hergestellt und sofort verwendet.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin 100 mg/ml
H₂O_{UHQ}

Die Kanamycin-Stammlösung wurde in das bereits autoklavierte LB-Medium mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Chloramphenicol-Stammlösung

Chloramphenicol	170 mg/ml
EtOH _{abs}	

Die Chloramphenicol-Stammlösung wurde in EtOH_{abs} gelöst und dem bereits autoklavierten LB-Medium mit einer Endkonzentration von 170 µg/ml zugegeben.

B.3.5 Puffer und Lösungen für die Plasmid-Miniprep

P1 Puffer

Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

NaOH/SDS Lösung

H ₂ O _{UHQ}	8 ml
NaOH (2 M)	1 ml
10% SDS	1 ml

Kaliumacetat/Acetat Lösung

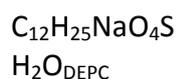
KCl (5 M)	6 ml
H ₂ O _{UHQ}	2.85 ml
Eisessig	1.15 ml

B.3.6 Puffer und Lösungen für Mikroarrayanalysen

20 x SSC Lösung

NaCl	3.0 M
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2H ₂ O	0.3 M
H ₂ O _{DEPC}	
Mit 1 M HCl auf pH 7.0 eingestellt	

10% SDS Lösung



0.35 M

B.4 Verwendete Klone und Organismen

Tabelle B6: Verwendete Klone

Name	Klon	insert	Resistenz	Referenz	Accession-Nummer-Klon	Kloning kit
ntt1	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	ATP/ADP translocase gene	Amp, Kan	(Schmitz-Esser, Linka et al. 2004; Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2006)	BX908798 REGION: 351721	TOPO TA
ntt4	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE26	ATP/ADP translocase gene	Amp, Kan	(Schmitz-Esser, Linka et al. 2004; Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2006)	BX908798 REGION: 623880	TOPO TA
ntt5	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE27	ATP/ADP translocase gene	Amp, Kan	(Schmitz-Esser, Linka et al. 2004; Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2006)	BX908798 REGION: 1602411	TOPO TA
B59	<i>Desulfohalobium retbaense</i>	16S rRNS	Kan	(Zhilina, Zavarzin et al. 1997)	X99235	TOPO XL
B18	<i>Desulfonema limicola</i>	16S rRNS	Amp, Kan	(Fukui, Teske et al. 1999)	U45990	TOPO TA
B50	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	16S rRNS	Amp, Kan	(Stackebrandt, Sproer et al. 1997)	Y11574	TOPO TA
dsrSbII-2	Schlöppnerbrunnen II Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167483	TOPO XL
dsrSbII-3	Schlöppnerbrunnen II Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167467	TOPO XL
dsrSbII-9	Schlöppnerbrunnen II Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167477	TOPO XL
dsrSbII-36	Schlöppnerbrunnen II Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167469	TOPO XL
dsrSbII-39	Schlöppnerbrunnen II Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167472	TOPO XL
dsrSbII-40	Schlöppnerbrunnen II Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167465	TOPO XL
dsrSbI-54	Schlöppnerbrunnen I Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167478	TOPO XL
dsrSbI-60	Schlöppnerbrunnen I Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167466	TOPO XL
dsrSbI-64	Schlöppnerbrunnen I Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167474	TOPO XL
dsrSbI-75	Schlöppnerbrunnen I Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167476	TOPO XL
dsrSbI-82	Schlöppnerbrunnen I Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167482	TOPO XL
dsrSbI-88	Schlöppnerbrunnen I Klon	<i>dsrAB</i>	Kan	(Loy, Kusel et al. 2004)	AY167475	TOPO XL

B.5 Oligonukleotid-Sondendesign

B.5.1 *dsrAB* Sondendesign

Die dem Sondendesign zugrunde liegende Sequenzdatenbank besteht aus 97 Korrektur gelesenen *dsrAB* Sequenzen. Alle Sequenzen wurden durch die Erstellung von *dsrAB* Gen-Bibliotheken aus Schlöppnerbrunnen-Erde gewonnen (Loy, Kusel et al. 2004; Schmalenberger, Drake et al. 2007). Diese 97 Sequenzen wurden mit Hilfe von DOTUR v1.53 und der "furthest neighbor OTU" (Operational Taxonomic Units) - Methode basierend auf 90% *DsrAB* Sequenzidentität in 41 OTU's unterteilt.

Die Sonden wurden mit Hilfe des ARB-Software-Package (Ludwig, Strunk et al. 2004) designt. Ausgehend von einem PT-Server mit 97 Schlöppnerbrunnen-*dsrAB* Sequenzen und den Kriterien, dass jede Sonde 30 bp lang sein und einen GC-Wert von 40-70 haben muss, wurden mit ARB-Probe-Design 200 mögliche Sonden ausgewählt. Diese Sonden wurden mit Probe-Match und dem ARB-Editor *in-silico* bezüglich ihrer Spezifität evaluiert und die Sondenzahl auf 146 reduziert. Um für alle Sonden ein ähnliches Hybridisierungsverhalten zu gewährleisten, wurden die thermodynamischen Eigenschaften aller Sonden in MFOLD (Zuker 2003) mit den Settings 37 °C, 1 M Na, 0 M Mg und 0.0001 M Strang berechnet. Die berechnete freien Energien (ΔG -Werte) lagen zwischen 35.7 und 46.2 kcal/mol, bei einem Durchschnitt von 41.0 kcal/mol. Durch die Änderung der Länge der Sonden mit ARB-Prob-Match und MFOLD wurden die Sonden auf ΔG -Werte von $41.0 \pm 1,5$ kcal/mol optimiert. Eine weitere *in-silico*-Untersuchung der Sonden beruhte auf der Überprüfung von eventuellen revers-komplementären Sequenzen und der Möglichkeit einer Bildung von so genannten Haarnadelstrukturen. Dies wurde mit dem Programm Oligonucleotides Properties Calculator überprüft und ergab Werte zwischen -8.4 und 0.6 kcal/mol.

Die Sonden wurden mit einem 5'-T-Spacer mit einer Länge von 30 Nukleotiden und einer endständigen 5' C6-Amino-Modifikation bestellt (Microsynth AG, Balgach, Schweiz). Es wurden je 20 μ l pro Sonde (100 pmol/ μ l in 50% DMSO) in eine 384-well Mikrotiterplatte aliquotiert.

B.5.2 Kontrollsonden

Des Weiteren wurden zwölf Kontrollsonden mit dem Programm CommOligo (He, Wu et al. 2005; Li, He et al. 2005) designiert. Es wurden, ausgehend von den Genen *NTT1*, *NTT4* und *NTT5*, von *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 (BX908798) und des 16S rRNA-Gens von *Desulfohalobium retbaense* (X99235), *Desulfonema limicola* und *Desulfotomaculum thermobenzoicum* (Y11574), je zwei Sonden pro Gen entwickelt. Um ein ähnliches Hybridisierungsverhalten wie die *dsrAB* Sonden zu erhalten wurde die Kontrollsonden mit ähnlichen ΔG -Werten (ΔG -Wert = 40.9 ± 0.5) entwickelt.

B.6 Mikroarray-Herstellung

B.6.1 Spotten der Oligonukleotid-Sonden

Die synthetisierten Oligonukleotide wurden mithilfe eines MicroGrid 600 (Genomic Solutions Inc. Ann Arbor, USA) bei 20 °C und 55% Luftfeuchtigkeit auf Aldehyd beschichtete Glasobjektträger VSS-25 (CEL Associates, Inc., Pearland, Texas, USA) in Triplikaten als Blöcke nebeneinander gespottet.

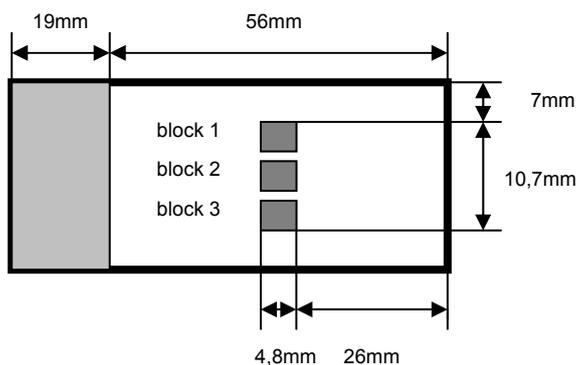


Abbildung B1: Schematische Darstellung der gespotteten Sonden auf dem Glasobjektträger.

Die Objektträger wurden vor dem Gebrauch mit gefilterter Druckluft von Staub befreit. Als Spotting-Puffer wurde 50% DMSO verwendet, um das Austrocknen der

Proben während eines bis zu neun Stunden langen Spotting-Laufs zu verhindern. Um einen einheitlichen Spot zu gewährleisten, wurden vor jedem Lauf zwanzig Pre-Spots vorgeschaltet und nach insgesamt 70 Spots die Nadel wieder aufgefüllt. Des Weiteren wurden eine Verzögerung vor jedem Spot von 0.25 Sekunden und eine Verweilzeit von zwei Sekunden in den Wells der Mikrotiterplatten eingestellt. Die so gespottete DNS wurde für 24 Stunden in Dunkelheit und bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert um eine effektive Bindung der Sonden auf der Aldehydschicht zu garantieren.

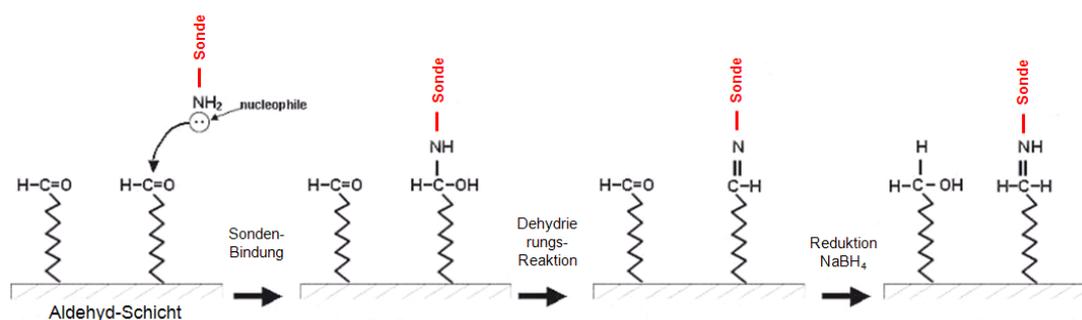


Abbildung B2: Schematische Darstellung der Bindung der Oligonukleotide auf dem Aldehyd modifizierten Glasobjektträger mit nachfolgender Reduktion der freien Aldehydgruppen durch Natriumborhydrit (NaBH_4).

B.6.2 Reduzieren der freien Aldehydgruppen

Die 24 Stunden lang inkubierten Objektträger wurden noch in feuchtem Zustand in einen dafür vorgesehenen Objektglashalter transferiert und zwei Minuten in 0.2% SDS-Lösung bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt um Salze und ungebundene Sonden zu entfernen. Anschließend wurde dieser Schritt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ wiederholt, um das SDS zu entfernen. Nach fünf-minütiger Abtropfzeit der Objektträger wurden diese fünf Minuten in frisch zubereiteter Natriumborhydrid-Lösung inkubiert, um alle aktiven Aldehydgruppen zu reduzieren. Diese Reduktion wurde durch Eintauchen für fünf Sekunden in eiskaltes, 100% Ethanol gestoppt. Ohne Unterbrechung folgten zweimal eine Minute Waschen in 0.2% SDS Lösung und anschließend zweimaliges waschen für eine Minute in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

Die Objektträger wurden durch zwei Minuten langes Zentrifugieren bei 1500 rpm getrocknet und bis zum Gebrauch dunkel und trocken in einer Objektträger-Box aufbewahrt.

0.2% SDS Lösung

10% SDS Lösung	20 ml
H ₂ O _{DEPC}	980 ml

100% Ethanol

vorgekühlt auf – 20 °C

Natriumborhydrid Lösung

NaBH ₄	1 g
1 x PBS	300 ml
Ethanol 100%	100 ml

B.7 Synthese der fluoreszenzmarkierten dsrAB-, 16S rRNS- und NTT-mRNS für die Mikroarray-Validation

B.7.1 Anzucht und Miniprep der Klone

Die Klone dsrSblI-2, dsrSblI-75 und ntt5 lagen nicht als Plasmid vor und mussten daher aus Glycerinstocks, die bei -80 °C gelagert wurden, zuerst in Flüssig-Medium angeimpft und später als Plasmide isoliert werden. Für die Anzucht der Zellen wurden je 5 ml LB-Medium autoklaviert und vor Gebrauch die Antibiotika-Stammlösung zugegeben. Das LB-Medium wurde angeimpft und anschließend bei 37 °C inkubiert. Um die jeweiligen Plasmide von den *E. coli* Zellen zu trennen, wurde eine Miniprep durchgeführt. Dazu wurden je 4 ml der gewachsenen Übernachtskulturen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Puffer P1 völlig resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurde NaOH/SDS-Lösung

zugegeben und vermischt. Die Proteine wurden durch Zugabe von Kaliumacetat/Acetat-Lösung auf Eis gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und der Überstand in ein neues RG überführt. In diesem Überstand wurde durch Zugabe von Isopropanol die Plasmid-DNS gefällt und via Zentrifugation pelletiert. Das Plasmid Pellet wurde einmal mit Ethanol gewaschen und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{UHQ}}$ gelöst. Die Plasmid-Lösungen wurden bis zu weiterem Gebrauch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

B.7.2 In-vitro Amplifizierung von DNS der Referenzorganismen

Alle DNS-Regionen, die für diese Studie von Relevanz sind, wurden via Polymerase-Kettenreaktion und den jeweiligen spezifischen Primerpaaren laut Tabelle B11 hergestellt.

Standard Reaktionsmix für eine PCR:

MgCl ₂	4 μl
Puffer (10x)	5 μl
dNTP-mix	5 μl
Vorwärts Primer	0.5-1 μl (250 nM Endkonzentration)
Rückwärts Primer	0.5-1 μl (250 nM Endkonzentration)
BSA (100x)	0.25 μl
Taq DNS Polymerase (5u/ml)	0.3 μl
Matrizen-DNS	1 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{UHQ}}$	ad 50 μl

Jeder PCR-Mix wurde in einem RG hergestellt das gleichzeitig in einem Kälteblock gekühlt wurde. Mit Ausnahme der Matrizen-DNS wurden alle Reagenzien in einer speziell dafür vorgesehenen PCR-Arbeitsstation pipettiert, um jegliche Kontaminationen zu vermeiden. Es wurden je 49 μl des Reaktions-Mix in PCR-RG aliquotiert und kurz vor Beginn die Matrizen-DNS dazu pipettiert. Mit jeder PCR wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, indem eine Kontroll-PCR ohne Matrizen-DNS hergestellt wurde. Jedes PCR-Produkt wurde anschließend durch eine 1%

Gelelektrophorese auf die korrekte Länge überprüft, mit Hilfe des QIAquick PCR purification kit aufgereinigt und die DNS-Konzentration mit dem Fotometer (ND 1000) bei 260 nm vermessen.

Einbringen der T3-Promotorsequenz via PCR

Die T3-Promotorsequenz des Vorwärtsprimers wird während der Reaktion in das PCR-Produkt eingebaut.

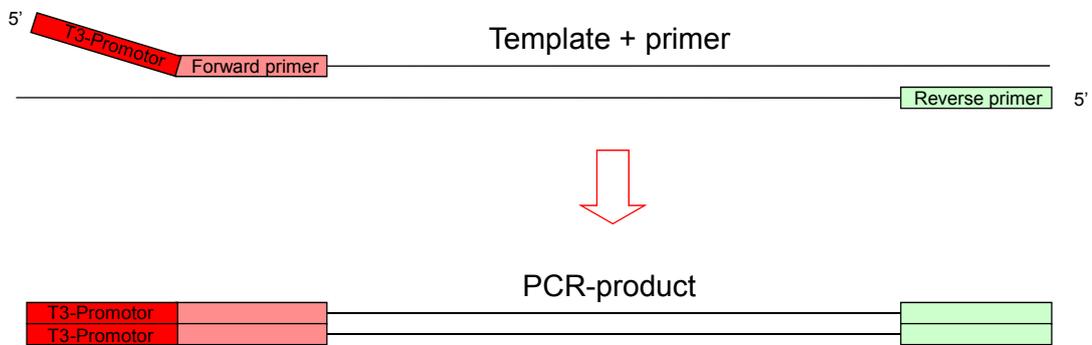


Abbildung B3: Schematische Darstellung des Einbauvorgangs der T3-RNS-Polymerase Promotorsequenz via PCR. Der Vorwärtsprimer beinhaltet eine 5' T3-Promotorsequenz die durch die Amplifizierung via PCR doppelsträngig in der Ziel-DNA eingebaut wird.

Für die *in-vitro*-Amplifizierung der *dsrAB*-DNS wurde die jeweilige Plasmid-Miniprep 1:500 mit H₂O_{UHQ} verdünnt und je 1 µl als Matrizen-DNS eingesetzt. *Annealing*-Temperatur und *Elongations*-Zeit wurden wie in Tabelle B10 angegeben eingehalten. Als Primer wurden je 0.5 µl Vorwärtsprimer-Mix (T3-DSR1F-mix) und Rückwärtsprimer-Mix (DSR4Rmix), wie in Tabelle B11 gezeigt, eingesetzt.

Tabelle B10: Bedingungen der T3-*dsrAB*-PCR

PCR Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)	Wiederholungen der Zyklen
Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	40	30
<i>Annealing</i>	52	40	
<i>Elongation</i>	72	120	
<i>Final Elongation</i>	72	10	1

Tabelle B11: Verwendete Primer für die T3-*dsrAB*-PCR

Primer Mix	T [°C]	Primer	Sequenz (5' - 3')	Referenz
T3- <i>DSR1F</i> mix	52	T3- <i>DSR1F</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG ACS CAC TGG AAG CAC G	(Wagner et al., 1998)
		T3- <i>DSR1Fa</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG ACC CAY TGG AAA CAC G	(Loy et al., 2004)
		T3- <i>DSR1Fb</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG GGC CAC TGG AAG CAC G	(Loy et al., 2004)
		T3- <i>DSR1Fc</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG ACC CAT TGG AAA CAT G	(Zverlov et al., 2005)
		T3- <i>DSR1Fd</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG ACT CAC TGG AAG CAC G	(Zverlov et al., 2005)
		T3- <i>DSR1Fe</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG GTT CAC TGG AAA CAC G	Loy, unpublished
		T3- <i>DSR1Ff</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG AGC CAC TGG AAA CAC G	Loy, unpublished
		T3- <i>DSR1Fg</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG GGC CAC TGG AAA CAT G	Loy, unpublished
		T3- <i>DSR1Fh</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG GGC TAT TGG AAG CAC G	Loy, unpublished
DSR4R mix	52	DSR4R	GTG TAG CAG TTA CCG CA	(Wagner et al., 1998)
		DSR4Ra	GTG TAA CAG TTT CCA CA	(Loy et al., 2004)
		DSR4Rb	GTG TAA CAG TTA CCG CA	(Loy et al., 2004)
		DSR4Rc	GTG TAG CAG TTK CCG CA	(Loy et al., 2004)
		DSR4Rd	GTG TAG CAG TTA CCA CA	(Zverlov et al., 2005)
		DSR4Re	GTG TAA CAG TTA CCA CA	(Zverlov et al., 2005)
		DSR4Rf	GTA TAG CAR TTG CCG CA	Loy, unpublished
		DSR4Rg	GTG AAG CAG TTG CCG CA	Loy, unpublished

T3-16S rRNS PCR

Für die Herstellung der T3-16S-rRNS und T3-NTT-DNS wurden je ein µl 1:100 verdünnte Plasmid-Lösung als Matrizen-DNS in die PCR eingesetzt. Für die Herstellung der T3-16S-rDNS wurden 0.5 µl des Vorwärtsprimers T3-BACT8F und Rückwärtsprimers 630R verwendet (Tabelle B13). Für die Herstellung der T3-NTT1-DNS wurde das Primerpaar T3-NTT1F – NTT1R, für T3-NTT4-DNS das Primerpaar T3-NTT4F-NTT4R und für die T3-NTT5-DNS das Primerpaar T3-NTT5F-NTT5R verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Primer und Länge der erwarteten Produkte wurden auch die *Elongations*-Zeit und *Annealing*-Temperatur der T3-16S-PCR laut Tabelle B12 und der T3-NTT PCR laut Tabelle B14 geändert.

Tabelle B12: Bedingungen der T3-16S rRNS-PCR

PCR Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)	Wiederholungen der Zyklen
Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	40	30
Annealing	52	40	
Elongation	72	90	
Final Elongation	72	10	1

Tabelle B13: Verwendete Primer für die T3-16S rRNS-PCR

Primer	T [°C]	Sequenz (5' - 3')	Referenz
T3-BACT8F	52	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAG TTT GAT YMT GGC TC	(Juretschko, Timmermann et al. 1998)
630R	52	CAKAAAGGAGGTGATCC	(Juretschko, Timmermann et al. 1998)

Tabelle B14: Bedingungen der T3-NTT-PCR

PCR Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)	Wiederholungen der Zyklen
Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	40	30
Annealing	55	40	
Elongation	72	90	
Final Elongation	72	10	1

Tabelle B15: Verwendete Primer für die T3-NTT-PCR

Primer	T [°C]	Sequenz (5' - 3')	Referenz
T3-NTT1F	55	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGT CGC AAG ATG CGA AA	(Schmitz-Esser, Linka et al. 2004)
NTT1R	55	TTAGCTAGTAGCTATTTTC	(Schmitz-Esser, Linka et al. 2004)
T3-NTT4F	55	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGA GTA AAA CAA ACC AG	(Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2004)
NTT4R	55	TTATTTTTTATAAAAGC	(Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2004)
T3-NTT5F	55	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGA AAA ATC AAC AAA AT	(Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2006)
NTT5R	55	TTATCCATGGGAAGCTTC	(Haferkamp, Schmitz-Esser et al. 2006)

B.7.3 Synthese und Markierung der RNS via *in-vitro*-Transkription

Die Polynukleotid-RNS wurde via *in-vitro*-Transkription hergestellt. Dazu wurde das T3-PCR-Produkt als Matrize verwendet. Die T3-RNS-Polymerase bindet an die T3-Promotor-Sequenz, die durch die PCR inkorporiert wurde, und beginnt die DNS Sequenz abzulesen und RNS zu synthetisieren. Bei dieser Reaktion wurde die RNS mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 markiert, indem Cy3-UTP zu unmarkierten UTP beigegeben wurde. Bei der *in-vitro*-Transkription wurden jeweils 400 ng DNS eingesetzt und bis zu 8 µg RNS transkribiert.

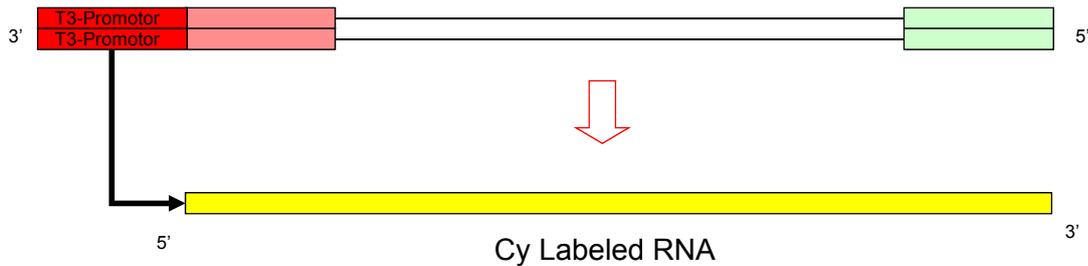


Abbildung B4: Schematische Darstellung des Synthese- und Labeling-Vorgangs der Kontroll- und Ziel-RNS via *in-vitro*-Transkription. Die T3-RNS-Polymerase bindet die DNA am Promotor, liest von 3' → 5' und produziert makierte RNS von 5' → 3'.

Standard-Reaktions-Mix für eine *in-vitro*-Transkription:

5x T3 RNS Polymerase Puffer	4 µl
100 mM DTT	0 – 2 µl
40 U/µl RNasin	0.5 µl
10 mM ATP	1 µl
10 mM CTP	1 µl
10mM GTP	1 µl
10 mM UTP	0.5 – 0.75 µl
5 mM Cy3'5-UTP	0.5 – 1 µl
400 ng <i>dsrAB</i> T3-DNS	2 – 3 µl
20 U/µl T3 RNS Polymerase	2 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 20 µl

Der Reaktions-Mix wurde gekühlt vorbereitet und als letztes die T3-RNS-Polymerase zugegeben. 400 ng des T3-PCR-Produkts wurden in ein 0.2 ml RG transferiert, der Reaktions-Mix zugegeben, kurz im Vortex gemischt, kurz zentrifugiert und bei 37 °C für fünf Stunden inkubiert. Durch das anschließende Abkühlen der Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Um die störende Matrizen-DNS zu verdauen, wurden je 2 µl DNase I Puffer und 2 µl DNase I (1 U/µl) zugegeben, die Lösung 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA (25 mM) wieder gestoppt. Es wurde nun die RNS durch Auffüllen mit TE Puffer auf 100 µl, der Zugabe von 10 µl NaCl (5 M) und 300 µl eiskaltem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die ausgefallene RNS wurde abzentrifugiert (14000 rpm, 30 Minuten) mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen.

Im Anschluss wurden die RNS-Lösungen mit dem Photometer quantifiziert und 3 µl für die spätere Gelelektrophorese aufbewahrt. Die RNS wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Natriumchlorid Lösung

NaCl	5 M
H ₂ O _{DEPC}	

B.7.4 Optimierung der Ziel-RNS Synthese

Da ein zu hohes Verhältnis von Cy3-UTP / UTP die Ausbeute an RNS verringern und ein zu niedriges Verhältnis eine nicht ausreichende Markierung zu Folge haben kann (Stoffels, Ludwig et al. 1999), wurden für die Optimierung der *in-vitro*-Transkription verschiedene Verhältnisse getestet (Tabelle B16). Bereits bei einer Konzentration von 50% Cy3-UTP ist eine Verringerung der RNS-Ausbeute von 75 Prozent zu beobachten (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003). Ein weiter Versuch, die *in-vitro*-Transkription zu optimieren, war die Zugabe von Dithiothreitol in einer Endkonzentration von 10 mM. Dithiothreitol ist eine chemische Verbindung, die in der Lage ist, Sekundärstrukturen der RNS zu verringern und daher das vorzeitige verlassen der T3-RNS-Polymerase von der DNS zu verhindert.

Tabelle B16: Optimierung der *in-vitro*-Transkription

	DTT[100mM]	Cy3-UTP [5mM]	UTP [10mM]
ohne Cy3-UTP			1 µl
50% Cy3-UTP		1 µl	0,5 µl
30% Cy3-UTP		0,5 µl	0,75 µl
mit DTT	2 µl	1 µl	0,5 µl

Zur Optimierung wurde der oben beschriebene IVT-Mix mit den jeweiligen Änderungen aus Tabelle B16 hergestellt, je 400 ng dsrSbl-60-T3-PCR-Produkt eingesetzt und bei den vorgegebenen Bedingungen transkribiert. Anschließend

wurde die RNS gereinigt, gefällt und in 25 µl H₂O_{DEPC} suspendiert. Sowohl die Quantität als auch das Verhältnis des eingebauten Cy3-UTP zu UTP wurde mit dem ND-1000 bestimmt. Zur Bestimmung der entstandenen RNS Menge aus der *in-vitro*-Transkription und zur Ermittlung der Konzentration von eingebauten Cy3-UTP wurde je 1 µl des Produkts mit dem ND-1000 vermessen. Es wurde für jede *in-vitro*-Transkription-Variante (Tabelle B16) ein *Full-Scale* UV-VIS Absorptions-Spektrum von 220-750 nm gemessen.

Berechnungsformel der Cy3-UTP Einbaurate des ND-1000 in pmol/µl.

$$\text{Cy3 [pmol/µl]} = (\text{OD550}/0.15) * (324) / (\text{OD260} * 40)$$

OD550 = optische Dichte bei 550nm

OD260 = optische Dichte bei 260nm

B.7.5 Chemische Fragmentierung der fluoreszenzmarkierten RNS

Da die Fragmentierung der Ziel-RNS zu einer durchschnittlichen Länge von 50 Nukleotiden die Hybridisierungs-Effizienz deutlich erhöht (Hughes, Mao et al. 2001), wurde die RNS chemisch mittels Zinksulfat fragmentiert.

Um die RNS zu fragmentieren, wurde sie mit H₂O_{DEPC} auf eine Konzentration von 80 ng/µl verdünnt und davon 50 µl in ein RG überführt. Dazu wurden 1.43 µl Tris-HCl (pH 7) und 5.71 µl ZnSO₄ (100mM) zugegeben und 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Fragmentierung wurde durch Zugabe von 1.43 µl EDTA (500 mM) und 1 µl RNasin gestoppt.

Puffer und Lösungen für die Fragmentierung

1 M Tris/HCl

Tris

1 M

H₂O_{DEPC}

Mit 1 M HCl auf pH 7.4 eingestellt

Zinksulfat Lösung

ZnSO₄

100 mM

H₂O_{DEPC}

B.7.6 Bestimmung der Fragmentlänge

Es wurden von zwei aufgereinigten IVT-Produkten je ca. 150 ng vor und nach der Fragmentierung entnommen und 60 Minuten bei 120 V auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt. Die RNS wurde durch Färben mit EtBr oder SybrGreen sichtbar gemacht.

B.8 Mikroarray-Hybridisierung

Alle Hybridisierungen wurden in einem Thermotwister (QUANTIFOIL Instruments GmbH, Jena, Deutschland) auf Stufe drei (200 rpm) unter der Verwendung eines Hybriwells (HBW2222; Grace Bio-Labs, Inc., Bend, USA) durchgeführt. Aufkleben, Befüllen und Verschließen der Hybriwells wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Thermotwister wurde 30 Minuten vor der Hybridisierung eingeschaltet, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten. Jeder Objektträger mit aufgeklebtem Hybriwell wurde fünf Minuten vor der Verwendung in den temperierten Thermotwister eingelegt, um beides auf die richtige Temperatur vorzuwärmen. Nach der Hybridisierung wurde der Mikroarray aus dem Thermotwister herausgenommen, das Hybriwell zügig entfernt und ohne Unterbrechung in ein 50 ml Greiner-Röhrchen, gefüllt mit dem jeweiligen Waschpuffer, transferiert und durch leichtes Schwenken gewaschen. Anschließend wurde er Mikroarray durch Zentrifugieren in einem 50 ml Greiner-Röhrchen (1500 rpm, zwei Minuten) getrocknet und in Dunkelheit gelagert.

B.8.1 PolyA-Prähybridisierung

Jeder verwendete Mikroarray-Objektträger wurde vor der eigentlichen Verwendung PolyA-prähybridisiert. Das Prähybridisieren dient zum Abwaschen weiterer ungebundener Sonden von dem Objektträger, der Qualitätsprüfung des Mikroarrays, aber auch der späteren Normalisierung der einzelnen Sonden. In dem Prähybridisierungspuffer ist ein Cy5-PolyA-Probe enthalten, das den PolyT-Spacer der Sonden bindet und mit Hilfe eines Scanners detektierbar ist. Die PolyA-Probe besteht aus Cy5 markierter DNS und einer Länge von 12 Adeninen.

Dazu wurden je 60 µl des Prähybridisierungspuffers in das Hybriwell pipettiert und zwei Stunden bei 42 °C hybridisiert. Anschließend wurde der Objektträger zweimal in je 50 ml eiskaltem H₂O_{UHQ} gewaschen und durch Zentrifugieren getrocknet. Jeder trockene Objektträger wurde sofort mit dem GenePix 4100A Mikroarrayscanner im Cy5-Kanal bei der Photomultiplier-Einstellung von 420 gemessen.

Prähybridisierungspuffer

20 x SSC	300 µl
10% (w/v) SDS	10 µl
Formamide	0 µl
100x Denhardt's reagent	10 µl
Cy5-PolyA (0.5 pmol/µl)	33 µl
H ₂ O _{bidist}	ad 1000 µl

B.8.2 Strippen der Objektträger

Um das hybridisierte Cy5-PolyA wieder zu entfernen wurden alle Objektträger zweimal in 98 °C heißem Strippingpuffer gewaschen. Dazu wurden je zwei Greiner-Röhrchen mit 50 ml Strippingpuffer befüllt und fünfzehn Minuten vor Gebrauch in ein 98 °C vorgewärmtes Wasserbad gegeben. Jeder Objektträger wurde nun 90 Sekunden unter leichtem Schwenken in dem ersten Greiner-Röhrchen gewaschen und dieser Vorgang ohne Unterbrechung in dem zweiten Greiner-Röhrchen fortgesetzt. Am Ende wurden alle Objektträger noch für eine Minute in einem mit

eiskaltem H₂O_{DEPC} gefüllten 50 ml Greiner-Röhrchen gewaschen, durch zwei minütiges Zentrifugieren mit 1500 rpm getrocknet und in Dunkelheit gelagert.

Strippingpuffer

20% (w/v) SDS	50 ml
EDTA (500mM)	2 ml
Tris/HCl (1 M)	10 ml
H ₂ O _{UHQ}	ad 1000 ml

B.8.3 Optimierung der Sensitivität durch Prähybridisieren und Strippen

Um das Prähybridisieren und Strippen für den *dsrAB*-FGA zu testen, wurden je 400 ng *dsrSbl-60* RNS hybridisiert, mit und ohne vorherige Prähybridisierung. Anschließend wurden die Signal zu Hintergrund (SRB) Werte der *perfect-match*- (PM) Sonden bestimmt und miteinander verglichen.

B.8.4 Hybridisierung mit Kontroll-RNS

Jeder RNS Target-Hybridisierung wurde 5,3 µl Kontrollsonden-Mix zugefügt, um später die Sondersignale zur Hybridisierungseffizienz Normalisieren zu können. Dieser Kontrollsonden-Mix wurde laut Tabelle B17 hergestellt und in 5.3 µl Aliquots in 0.2 µl RG bei -20 °C gelagert.

Tabelle B17: Kontrollsonden-Mix

Sample ID	Dye 1	Dye1 [pmol/ul]	[ng/ul]	[ng] /slide	[µl]	für 50 slides [ng]
b18	Cy3	4.15	65.8	100	1.52	76
ntt1	Cy3	4.02	58.1	50	0.86	43.1
b59	Cy3	2.95	60.5	10	0.17	8.3
ntt4	Cy3	5.14	63.1	5	0.08	4
ntt5	Cy3	4.14	60.9	1	0.02	0.8
					MQ	332.1

B.8.5 Hybridisierung mit *dsrAB*-RNS

Es wurden je 100 ng (50-70 ng/ μ l) der jeweiligen *dsrAB*-RNS in ein kurz davor aufgetautes Kontrollsonden-Mix-RG pipettiert, durch die Zugabe von 53 μ l Hybridisierungspuffer I (siehe B.7.6) (15% Formamid) gemischt und mit H₂O_{DEPC} auf 60 μ l aufgefüllt. Die Mischung wurde kurz gevortext, abgespinnt, eine Minute bei 65 °C erwärmt (Eppendorf Incubator) und sofort in das vorgeheizte Hybriwell pipettiert. Wenn nicht anders angegeben wurde die *dsrAB*-RNS bei Standardbedingungen 16 Stunden bei 55 °C und 15% Formamid hybridisiert. Der Objektträger wurden nacheinander je fünf Minuten in Waschpuffer I und Waschpuffer II und eine Minute in eiskaltem H₂O_{DEPC} gewaschen, durch Zentrifugieren getrocknet und anschließend gescannt.

Waschpuffer I

20 x SSC	100 ml
10% SDS	10 ml
H ₂ O _{DEPC}	ad 1000 ml

Waschpuffer II

20 x SSC	5 ml
H ₂ O _{DEPC}	ad 1000ml

B.8.6 Optimierung des Arrays durch Testen verschiedener Hybridisierungspuffer

Um die Hybridisierung zu optimieren wurden zwei verschiedene Hybridisierungspuffer getestet. Dazu wurden 400 ng *dsrSbl-60* RNS einmal mit Hybridisierungspuffer I (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003) und einmal mit Hybridisierungspuffer II (Adamczyk, Hesselsoe et al. 2003) hybridisiert.

Hybridisierungspuffer I

20 x SSC	300 μ l
10% (w/v) SDS	10 μ l

Formamide	0-330 µl
100x Denhardt's reagent	10 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 1000 µl

Hybridisierungspuffer II

20 x SSC	300 µl
10% (w/v) SDS	10 µl
Formamide	0-330 µl
100x Denhardt's reagent	50 µl
Na ₂ HPO ₄ (0.2 M)	250 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 1000 µl

B.8.7 Ermittlung der optimalen Stringenz durch Änderung der Formamid-Konzentration

Um optimale stringente Bedingungen für die Hybridisierung der Sonden mit *dsrAB*-RNS zu gewährleisten, wurde eine Formamid-Reihe durchgeführt. Ausgehend von einem Hybridisierungspuffer mit 0% FA wurde die Konzentration in 10% -Schritten bis 60% FA gesteigert. Der grob ermittelte optimale Bereich (10 bis 25%) wurde weiters genauer in 5% FA-Schritten untersucht.

Pro Fa-Konzentration wurde je ein Objektträger mit 400 ng *dsrSbII-3* RNS 16 Stunden bei 55 °C hybridisiert, gewaschen, getrocknet und gescannt. Dazu wurden 6 µl der RNS-Lösung vorgelegt und mit 54 µl des entsprechenden Hybridisierungspuffers versetzt.

Tabelle B18: Zusammensetzung des HP bei verschiedenen FA Konzentrationen

FA%	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
MQ [µl]	580	530	480	430	380	330	280	230	180	130
20x SSC [µl]	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
10% SDS [µl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100x Denhard [µl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
FA [µl]	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450

B.8.8 Ermittlung der Mikroarray Sensitivität (Ermittlung der optimalen RNS-Menge für die Sondenevaluierung)

Die Sensitivität des Mikroarrays wurde durch Hybridisierung verschiedener Mengen und verschiedener Mengenverhältnisse von Kontrollsonden-RNS und Ziel-RNS bestimmt. Es wurde eine Mischung der Kontrollsonden-RNS hergestellt und davon eine Verdünnungsreihe gemacht (Tabelle B19). So wurden vier Objektträger hybridisiert, je ein Objektträger mit der unverdünnten, 1 zu 10, 1 zu 100 und 1 zu 1000 verdünnten Mischung. Des Weiteren wurden vier Objektträger mit der unverdünnten Kontroll-Sonden-Mischung hybridisiert, jedoch diesmal mit zusätzlich je 1000 ng, 100 ng, 10 ng und 1 ng dsrSbII-3 RNS.

B.9 Scannen und Datenauswertung

B.9.1 Scanner und Scannsoftware

Die hybridisierten Objektträger wurden mit einem GenePix 4100A Mikroarray-Scanner mit einer Auflösung von 10 µm ausgewertet. Dabei wurde das Cy5-Signal bei 635 nm und das Cy3-Signal bei 532 nm gemessen. Alle aufgenommenen Fluoreszenz-Bilder wurden als multilayer-TIFF-Images gespeichert und mit der GenePix Pro 5.0 Analyse Software ausgewertet. Zur statistischen Auswertung und zur Präsentation der Daten wurde Microsoft Excel 2007 verwendet. Spots, die durch Artefakte in den Spots selbst oder in der näheren Umgebung gestört waren, wurden nicht zur weiteren Berechnung herangezogen. Da jede Sonde pro Objektträger als Triplikat vorlag, wurde aus diesen drei Werten der Durchschnitt gebildet und die Standardabweichung berechnet. Alle Objektträger wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 100% Laserleistung und einer Photomultiplier-Einstellung von 1000, 750 und 500 gescannt.

B.9.2 Ermittlung der optimalen Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer

Dazu wurde bei jeder FA-Konzentration der Mittelwert aller SBR-Werte der PM-Sonden ermittelt und dieser Wert jeweils durch die einzelnen SBR-Werte der höchsten Falsch-Positiven-(FP) Sonden gerechnet. Des Weiteren wurde der Mittelwert der SBR-Werte der PM-Sonden berechnet.

B.9.3 Ermittlung der besten Signalberechnungsmethode und den dazugehörigen Schwellenwerten

Zum Auswerten der Mikroarray-Daten wurden drei übliche Berechnungsvarianten getestet. Die erste Methode berechnet das Verhältnis von Signal zu Hintergrund und wird als SBR (*signal-to-background-ratio*) bezeichnet. Eine zweite Variante beinhaltet zusätzlich die Standardabweichung des Hintergrunds und ist als SSR (*signal-to-standard-deviation ratio*) bekannt. Erst kürzlich wurde eine dritte Möglichkeit der Signalberechnung publiziert (He and Zhou 2008). Bei der Berechnung des SDR (*signal-to-both-standard-deviations ratio*) wird zusätzlich die Standardabweichung des Signals berücksichtigt. Für die Ermittlung der für diesen Mikroarray besten Signal-Berechnungsvariante wurden die Ergebnisse der zwölf hybridisierten Referenzklone herangezogen. Es wurden alle Sonden-Signale in den drei genannten Varianten berechnet und anschließend die Schwellenwerte ermittelt, bei welchen die wenigsten FP- und Falsch-Negativen-(FN) Sonden vorlagen. Bei der Ermittlung des Schwellenwerts durch die SBR-Variante wurde, ausgehend von dem Schwellenwert 10, in Fünferschritten bis 100, bei der SSR-Variante von 50 in Fünzigerschritten bis 700 und bei der SDR-Variante von 2,5 in 0,25 Schritten bis 5 erhöht.

B.9.4 Evaluierung des *dsrAB*-FGA-Chips mit fluoreszenzmarkierten *dsrAB*-Genamplifikaten geeigneter Referenzklonen

Es wurden alle *dsrAB* Referenzklone laut Tabelle B6, auf prähybridisierten Objektträgern hybridisiert, gewaschen und gescannt. Nachdem der SSR-Wert für jeden Spot berechnet wurde, wird der SSR-Wert der Replikate (Block1, Block2, Block3) gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Zur Normalisierung der Signale wurde für jeden Objektträger der Mittelwert aller Kontrollsonden berechnet und jedes Sondersignal als Prozent des Mittelwerts der Kontrollsonden angegeben. Um so wenig FP- und FN-Sonden zu haben wie möglich, wurde der passende Schwellenwert wie in Abschnitt B.8.3 neu berechnet und alle Sonden über diesem Schwellenwert als positiv gewertet.

C. Ergebnisse

Um den entwickelten Mikroarray zu evaluieren wurden verschiedene Optimierungsschritte im Bereich Herstellung der Ziel-RNS, Hybridisierung und Auswertung durchgeführt. Dazu zählen Markierungs- und Fragmentierungsversuche der Ziel-RNS, Stringenz und Sensitivitäts-Tests der Hybridisierung sowie die Ermittlung der optimalen Signal-zu-Hintergrund-Berechnungsmethode und des dazugehörigen Schwellenwerts. Anschließend wurde der Mikroarray unter bestmöglichen Bedingungen mit geeigneten Referenzklonen hinsichtlich potentieller Kreuzhybridisierungsreaktionen evaluiert.

C.1 Analyse der fluoreszenzmarkierten *dsrAB*-, 16S *rRNS*- und *NTT-mRNS*

C.1.1 Optimierung der *in-vitro*-Transkription

Sowohl die *dsrAB*-Ziel-RNS als auch die Kontroll-RNS werden via *in-vitro*-Transkription hergestellt. Durch die Zugabe von Cy3-UTP in den Reaktionsmix baut die T3-RNS-Polymerase mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch Cy3-fluoreszenzmarkierte-UTP in die RNS ein. Da der Einbau von Cy3-UTP via T3-RNS-Polymerase nicht so effektiv verläuft wie der Einbau von UTP, ist das richtige Verhältnis der beiden ausschlaggebend für die Menge der synthetisierten RNS (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003) sowie auch für die Anzahl der eingebauten Cy3-UTP pro RNS-Strang. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Verhältnisse von Cy3-UTP und UTP getestet.

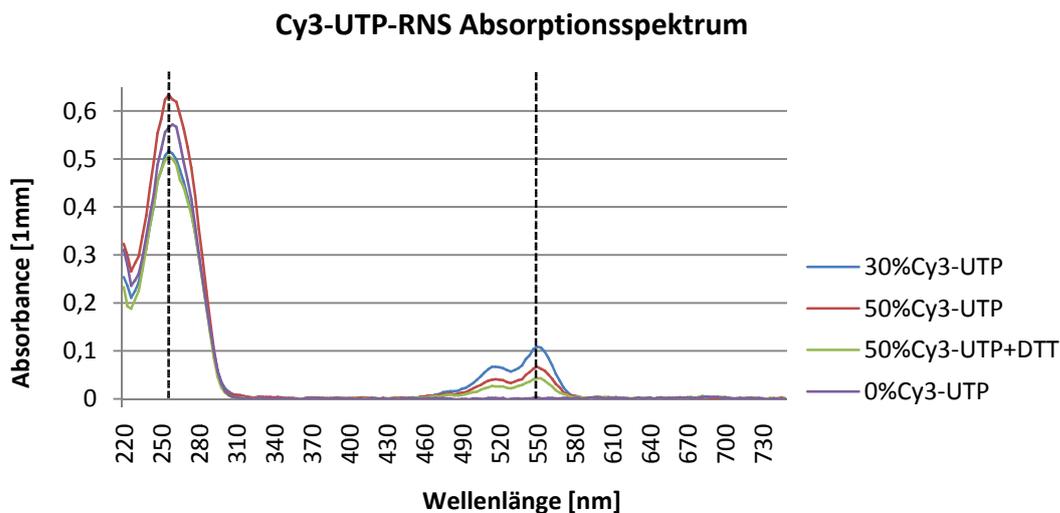


Abbildung C1: Qualitative und quantitative Bestimmung der Cy3-UTP-RNS mit NanoDrop-1000 UV-Vis Spektralphotometer. RNS wird bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Die Konzentration von eingebauten Cy3-UTP wird bei 550 nm berechnet. Die Extinktion wird als 1 mm *Path-Equivalent* angegeben. Gemessen wurden vier Produkte von unterschiedlichen *In-vitro*-Transkriptionen, die sich durch Cy3-UTP-Verhältnis und der Zugabe von DTT unterscheiden. Strichlierte Linien zeigen die Absorption bei der Wellenlänge von 260 bzw. 550nm.

Alle vier *in-vitro*-Transkriptionen lieferten mit einer RNS-Menge von 5.0 bis 6.2 μg gute und vergleichbare Werte. Das meiste Cy3-UTP wurde bei dem Ansatz mit nur 30% Cy3-UTP mit einer Einbaurrate von 0.036 pmol/ng gemessen. Die Einbaurrate bei einem Verhältnis von 50% mit und ohne Zugabe von DTT betrug dagegen mit 0.017 und 0.014 pmol/ng nur die Hälfte. Ausgehend von diesen Werten haben sich die *In-vitro*-Transkription mit einem Verhältnis von Cy3-UTP zu UTP von 30% und die Zugabe von DTT in der Endkonzentration von 10 mM als am Besten herausgestellt und wurden für die weitere Evaluierung verwendet.

C.1.2 Fragmentieren der fluoreszenzmarkierten RNS

Da die Länge der hybridisierten RNS von großer Bedeutung für das Hybridisierungsverhalten ist, wurde das IVT-Produkt chemisch fragmentiert (Hughes, Mao et al. 2001). Bei dieser Methode wird die RNS durch Inkubation mit Zinksulfat an zufälligen Stellen gebrochen und dadurch entstehen Fragmente. Durch die

Änderung der Inkubationszeit. wird die Änderung der durchschnittlichen Fragmentlänge beeinflusst.

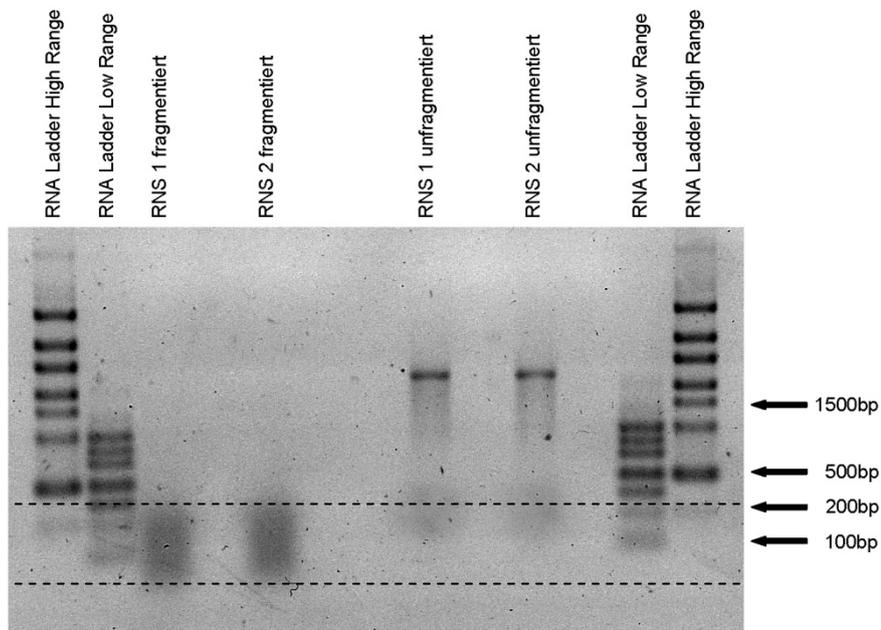


Abbildung C2: 1% Agarose-Gelelektrophorese von fragmentierter und unfragmentierter RNS. Laufzeit 60 Minuten bei 120 Volt. Die RNS wurde durch Inkubieren des Gels in EtBr sichtbar gemacht. Die Pfeile rechts geben die jeweilige Länge der RNS in Basen-Paaren an. Die strichlierte Linie zeigt das fragmentierte Produkt mit einer ungefähren Größe von 200 bis 50 bp.

Die beiden unfragmentierten *dsrAB*-RNS zeigten eine ungefähre Länge von 2.1 kbp. Eigentlich würde man ein ca. 1.9 kbp langes Fragment erwarten, jedoch kann es durch die eingebauten Cy3 UTPs, aufgrund des Größenunterschieds von UTP und Cy3 UTP, zu einer niedrigeren Wanderungsgeschwindigkeit kommen. Die fragmentierte RNS zeigte keine Bande im Bereich von 1.9 kbp, was auf eine vollständige Fragmentierung hinweist. Die Fragmente liegen als "Wolke" im Bereich von 50-200 bp vor.

C.2 Mikroarray-Hybridisierung

C.2.1 Optimierung des Hybridisierungspuffers

In diesem Versuch wurden zwei verschiedene Hybridisierungspuffer anhand der Signalintensität und SBR-Werte der PM-Sonden miteinander verglichen. Des Weiteren wurden die durchschnittlichen Hintergrundsignale gemessen, da der Hintergrund eine entscheidende Rolle bei der Berechnung des SBR und SSR einnimmt. Dazu wurde dsrSbl-60 RNS einmal unter Verwendung von Hybridisierungspuffer I und einmal unter Verwendung von Hybridisierungspuffer II hybridisiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

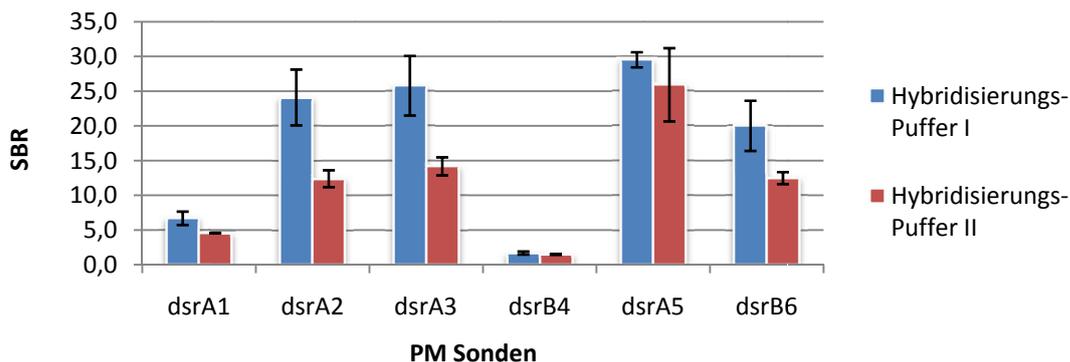


Abbildung C3: Auswirkung der HP-Zusammensetzung auf die Signalintensität. Zu sehen sind die PM-Sonden, die bei der Hybridisierung mit dsrSbl-60 RNS ein Signal geben sollten.

Die Hybridisierung von dsrSbl-60 RNS zeigte mit beiden Hybridisierungspuffern ein positives Signal aller sechs PM-Sonden. Das durchschnittliche Signal bei einer PMT-Einstellung von 500 der PM-Sonden ergab 12229 ± 102 (Median 532) bei der Hybridisierung mit Puffer I. Bei der Verwendung von Puffer II lag das durchschnittliche Sondensignal mit 6801 ± 274 (Median 532) deutlich darunter. Die Messung des Hintergrundsignals aller Sonden ergab einen Durchschnittswert von 677 ± 21 (Median 532) mit Hybridisierungspuffer I und 558 ± 54 (Median 532) mit

Hybridisierungspuffer II. Die berechneten SBR-Werte aller PM-Sonden zeigten mit Puffer I ein um 34% höheres Signal als mit Puffer II (Abbildung C3). Durch die höheren erzielten SBR-Werte der PM-Sonden mit Hybridisierungspuffer I wurde dieser für die weitere Evaluierung verwendet.

C.2.2 Optimierung der Sensitivität durch Prähybridisieren und Strippen

Ein für die Bestimmung des Sonden Signals und somit der Sensitivität wichtiger Faktor des Mikroarray ist das Hintergrundrauschen. Eine übliche Methode zur Verringerung des Hintergrundrauschens in der Mikroarray-Technik ist das Prähybridisieren des Arrays bevor er mit der eigentlichen Probe hybridisiert wird. Der Vorgang der Prähybridisierung beruht auf dem Hybridisieren des Arrays ohne markierte Probe und dessen positiven Einfluss auf das Hintergrundrauschen. In unserem Fall enthält der Prähybridisierungspuffer zusätzlich PolyA-Cy5, welches zur Bestimmung der Spotting-Qualität herangezogen werden kann. Das anschließende Lösen der PolyA-Nukleotide wird als Strippen bezeichnet und hat auch maßgeblichen Einfluss auf das Hintergrundrauschen, da durch die stringenten Bedingungen des Strippens nicht gebundene Sonden von Array entfernt werden. Ungebundene Sonden können die zu analysierende Probe binden und sich während der Hybridisierung lösen was einen negativen Einfluss auf die Signalintensität der Spots und das Hintergrundrauschen hat.

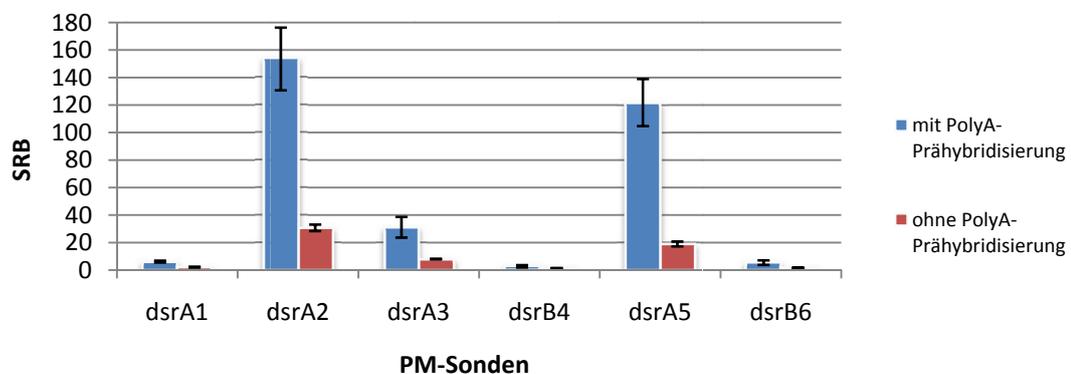


Abbildung C4: Effekt von PolyA-Prähybridisieren auf die Signalintensität. SBR-Werte der PM-Sonden von hybridisierter dsrSb-60 RNS mit und ohne vorheriges Prähybridisieren.

Die durchschnittliche PM-Sonden-Intensität der prähybridisierten Objektträger lag mit 17726 ± 2806 (F532 Median) niedriger als die 22405 ± 1769 (F532 Median) des nicht prähybridisierten Objektträgers. Jedoch zeigte der vorbehandelte Objektträger ein viel niedrigeres Hintergrundsignal (mit Prähybridisieren 331 ± 25 und ohne Prähybridisieren 2154 ± 234 ; B532 Median). Somit zeigten alle gemessenen PM-Sonden ein höheres SBR-Signal mit Prähybridisierung als ohne. Der durchschnittliche SBR-Wert der PM-Sonden lag bei dem prähybridisierten Objektträger mit 53.5 ± 8.14 höher als der der nicht vorbehandelten Objektträger mit 10.4 ± 0.67 . Das entspricht einer Erhöhung des SBR-Werts um mindestens das Fünffache (Abbildung C4). Bei diesem Experiment wurden je drei Mikroarrays mit und ohne vorheriges Prähybridisieren verglichen mit reproduzierbaren Werten (Daten nicht gezeigt).

C.2.3 Qualitätskontrolle der gespotteten Objektträger durch PolyA-Cy5 Prähybridisierung

Da bei der Herstellung des Mikroarray das Spotten der Sonden ein sehr fehleranfälliger Vorgang ist, wurde die Spotting-Qualität jedes Objektträgers vor dem Gebrauch getestet. Dazu war im Prähybridisierungspuffer wie in Kapitel B.8.1 beschrieben PolyA-Cy5 enthalten.

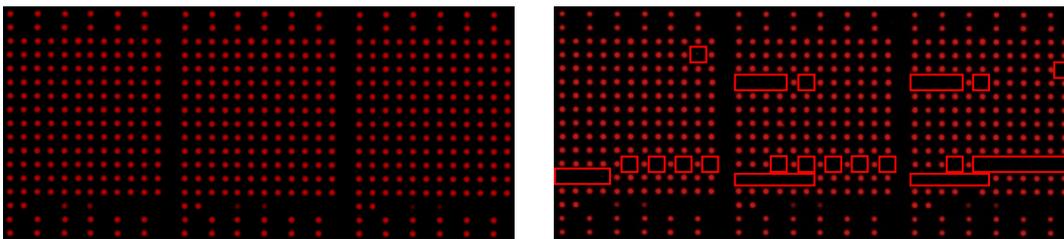


Abbildung C5: Beispiel der Qualitätskontrolle anhand zwei verschiedener Objektträger mit Cy5-Filter aufgenommen. Beide Objektträger wurden mit PolyA-Cy5 hybridisiert. Links sind alle Sonden vorhanden. Rechts ist das Fehlen von mehreren Sonden durch rote Umrahmung gekennzeichnet.

Es wurden jeweils zwanzig Objektträger in einem Spotting-Lauf hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 140 Objektträger gespottet, wovon ca. 60 unbrauchbar waren. In weiteren Spotting-Tests (Daten nicht gezeigt) konnte die Korrelation zwischen der Spotting-Qualität der Objektträger und der

Chargennummer der Objektträger gezeigt werden. Bei dieser Chargennummer handelt es sich um eine Bezeichnung die, die OT eindeutig zu einer Produktionscharge zuordnen. Mit Objektträger einer gewissen Charge war es nicht möglich einen qualitativ guten Mikroarray zu spotten. Um die Ursache dieses Qualitätsverlustes einzelner OT-Chargen zu klären bedarf es weiterer Experimente. Von den gespotteten Objektträgern einer guten Charge konnten ca. 90% verwendet werden.

C.2.4 Einstellung der Stringenz durch die Formamid-Konzentration

Wie bei jeder Hybridisierung sind Sensitivität und Stringenz stark von Faktoren wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur abhängig. Eine weitere Möglichkeit stringente Bedingungen zu erreichen ist die Zugabe von duplexdestabilisierender Agenzien, wie zum Beispiel Formamid (Sambrook 2001). In dieser Testreihe wurde das Hybridisierungsverhalten von PM-Sonden und Nicht-Zielsonden bei verschiedenen Formamid-Konzentrationen untersucht.

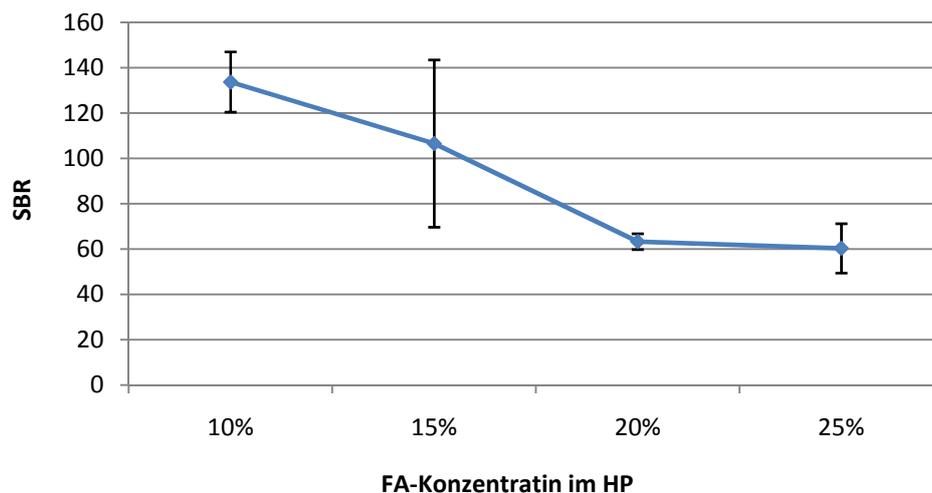


Abbildung C6: Sondensignal bei Änderung der FA-Konzentration. Darstellung des durchschnittlichen PM-Sondensignals als SBR-Wert bei verschiedenen Formamid-Konzentrationen. Hybridisiert wurden 400 ng dsrSbII-3 RNS pro Mikroarray und FA-Konzentration.

Alle gemessenen PM-Sonden zeigten mit zunehmender Formamid-Konzentration ein geringeres Sondensignals (Median F532). Des Weiteren zeigte sich eine Erhöhung des Hintergrundrauschens mit Erhöhung der FA-Konzentration (Daten nicht gezeigt). Der durchschnittliche SBR-Wert der PM-Sonden war mit 134 ± 13.3 bei Hybridisierung mit 10% FA im Hybridisierungspuffer am höchsten und nahm mit steigender FA-Konzentration ab (Abbildung C6). Bei 15% FA im HP sank der durchschnittliche SBR-Wert auf 80%, bei 20% FA auf 47% und bei 25% FA betrug er nur mehr 45% des ursprünglichen Werts.

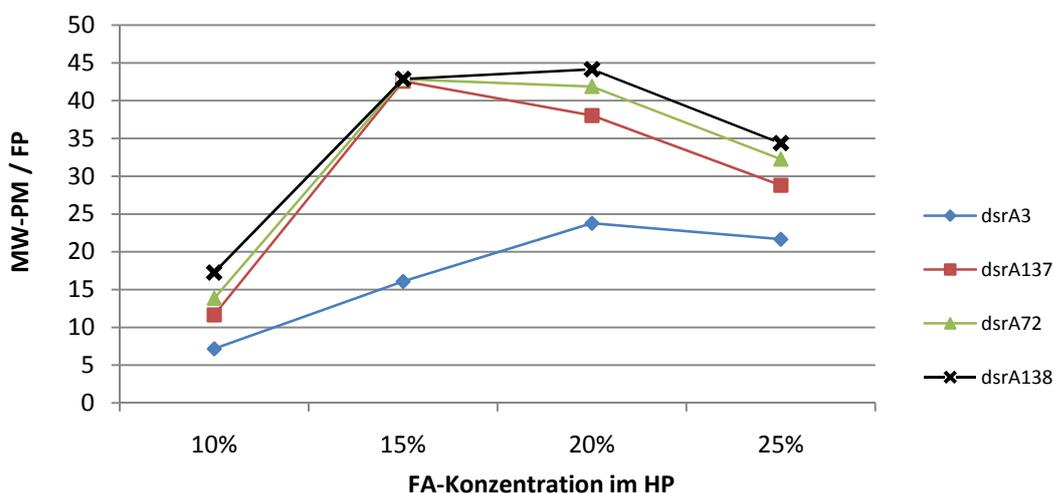


Abbildung C7: Verhältnis der Signalintensität von FP-Sonden zu PM-Sonden bei verschiedenen FA-Konzentrationen. Darstellung des Verhältnisses von der Signalintensität als SBR-Wert einzelner FP-Sonden zum Mittelwert des PM-Sondensignals. Es wurden 400 ng dsrSbII-3 RNS bei verschiedenen Konzentrationen von Formamid hybridisiert.

Bei der Berechnung des Verhältnisses der SBR-Werte der vier höchsten FP-Sonden zum Durchschnitt der PM-Sonden zeigten die Sonden dsrA3 und dsrA138 das höchste Verhältnis bei 20% FA im Hybridisierungspuffer. Dagegen zeigten die Sonden dsrA72 und dsrA137 schon bei 15% FA im Hybridisierungspuffer den höchsten Wert (Abbildung C7). Da die Verhältnisse zwischen FP-Sonden und dem Durchschnittswert der PM-Sonden bei 15 und 20% FA mit 36.1 ± 13.3 und $36.9 \pm 9,1$ sehr ähnlich waren, jedoch der durchschnittliche SBR-Wert der PM-Sonden bei 15% FA um 40% höher

liegt als bei 20% FA, wurde für die weitere Evaluierung des Mikroarray eine Endkonzentration von 15% Formamid im Hybridisierungspuffer verwendet.

C.2.5 Optimierung der Sensitivität durch Ermittlung der optimalen hybridisierten RNS-Menge

Bei der Mikroarray Technologie gibt die Sensitivität die untere Detektiongrenze an bei der es möglich ist ein schwaches Signal noch klar als positiv zu werden. Die hybridisierte Menge an Ziel-RNS hat großen Einfluss auf die Sensitivität, da eine zu geringe Konzentration zu FN-Signalen und eine zu hohe Konzentration zu starkem Hintergrundrauschen führen kann. Um zu testen, bei welcher Menge an Ziel-RNS die besten SBR-Werte detektierbar sind, wurden verschiedene Konzentrationen von Ziel-RNS hybridisiert und ausgewertet.

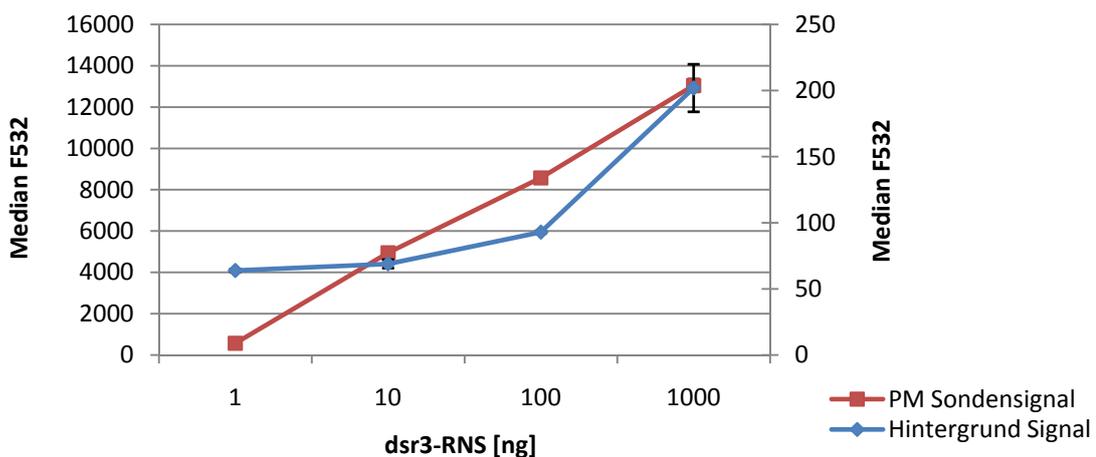


Abbildung C8: Sonden- und Hintergrundsignal bei verschiedenen RNS-Mengen. Darstellung des Hintergrundrauschens und des durchschnittlichen PM-Sonden-Signals bei der Hybridisierung von verschiedenen Mengen von dsrSbII-3 RNS.

Die Hybridisierung von verschiedenen Mengen dsrSbII-3 RNS zeigte einen linearen Anstieg des einzelnen PM-Sonden-Signals (median F532) mit Erhöhung der Einsatzmenge (Abbildung C8). Des Weiteren war ein nicht linearer Anstieg des Hintergrundrauschens zu messen. Bei der Erhöhung der RNS-Menge von 1 ng auf 10 ng war ein Anstieg des Hintergrundrauschens von 8% zu erkennen, bei der Erhöhung

von 10 ng auf 100 ng ein Anstieg von 35%, jedoch bei der Erhöhung von 100 ng auf 1000 ng betrug der Anstieg des Hintergrundrauschens 117% (Abbildung C8).

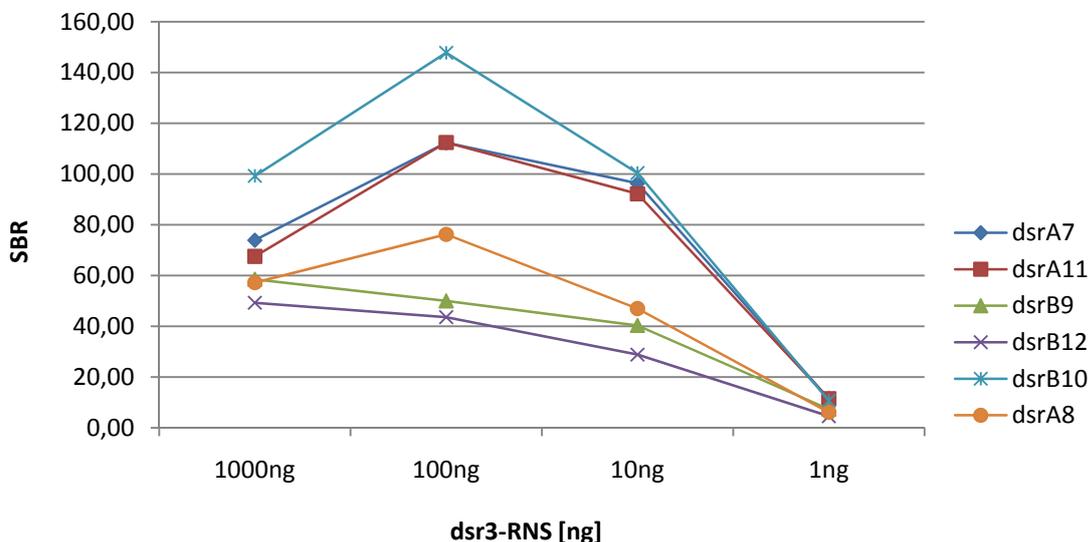


Abbildung C9: Hybridisierung verschiedener Mengen an dsr3-RNS. SRB-Werte von PM-Sonden durch Hybridisierung verschiedener Mengen an dsrSbII-3.

Durch den linearen Anstieg des PM-Sondensignals und das starke Hintergrundrauschen ab einer hybridisierten Menge von 100 ng Ziel-RNS ergibt sich der beste SBR-Wert der Sonden bei einer eingesetzten Menge von 100 ng (Abbildung C9). Da alle Hybridisierungen zusätzlich Kontrollsonden-RNS im Ausmaß von 185 ng enthielten, entspricht 1 ng hybridisierte Ziel-RNS 0.54% der eingesetzten Gesamt-RNS. Die Hybridisierung von 0.54%-Ziel-RNS in einer Mischung mit Nicht-Ziel-RNS ergab bei allen sechs PM-Sonden ein positives Signal ohne das Auftreten von FP- oder FN-Sonden.

Des Weiteren war es möglich, bei der Hybridisierung von verschiedenen Verdünnungen des Kontrollsonden-Mixes laut Tabelle B17 die NTT5-RNS trotz sehr niedrig eingesetzter Menge von 0.01 ng durch die Sonde dsrCONT12 ohne das Auftreten von FP- oder FN-Sonden positiv nachzuweisen.

C.2.6 Optimierung der Signalauswertung durch Testen verschiedener Berechnungsvarianten

In der Mikroarray-Technik gibt es verschiedene Optionen wie man am besten Echt-Positive-Signale vom Hintergrundrauschen trennt. Zu diesem Zeitpunkt existieren drei verschiedene Berechnungsvarianten. Bei der Unterscheidung von Signal und Rauschen spielt hierbei die Festlegung der Schwellenwerte eine entscheidende Rolle.

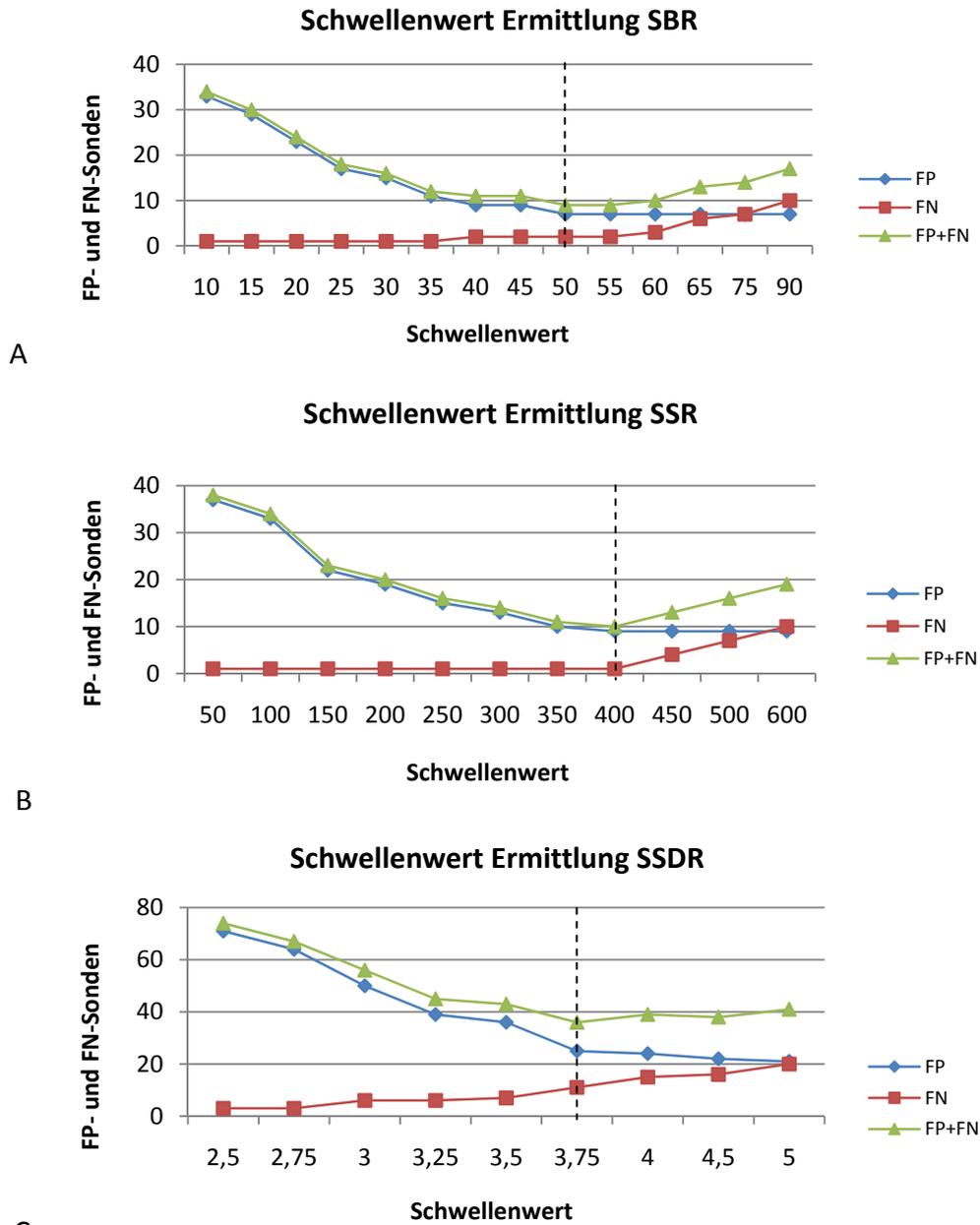


Abbildung C10: Schwelienwert Ermittlung zur Bestimmung positiver Signale. Ergebnisse der Schwelienwertermittlung für drei verschiedene Signalberechnungsvarianten. A. *signal-to-background-ratio*. B. *signal-to-standard-deviation ratio*. C. *signal-to-both-standard-deviations ratio*. Es wurden je 100 ng der zwölf Referenzklon-RNS einzeln auf je einem Mikroarray hybridisiert und gemeinsam ausgewertet. FP = Falsch positive Sonde. FN = Falsch negative Sonde. Strichlierte Linie zeigt den Schwelienwert bei dem die wenigsten FP+FN Signale auftreten.

In allen drei Signalberechnungsvarianten waren durch Erhöhung des Schwellenwerts ein deutliches Sinken der FP-Sondenzahl und ein Anstieg der Anzahl von FN-Sonden zu erkennen. Die SBR-Schwellenwert-Berechnung ergab bei einem Wert von 50 sieben FP- und zwei FN-Sonden. Die Ermittlung des Schwellenwerts durch die SSR-Berechnung ergab bei einem Wert von 400 neun FP- und eine FN-Sonde. Die SDDR-Berechnung ergab einen Schwellenwert von 3.75, jedoch lag die Zahl der FP- mit 25 und elf FN-Sonden deutlich höher als bei den anderen Varianten. Die Varianten SBR und SSR ergaben mit ca. 0.51% und 0.57% (9 bzw. 10 FP+FN bei 1752 hybridisierten Sonden) FP- und FN -Hybridisierungssignale deutlich niedrigere Werte als SDDR mit 2.1% (38 FP+FN bei 1752 hybridisierten Sonden). Die SSR- und SRB-Signalberechnungsvariante ergaben in etwa gleich gute Ergebnisse, wobei die Variante SSR nur eine FN-Sonde zeigte und darum für die weitere Evaluierung des Mikroarray herangezogen wurde.

C.2.7 Auswertung der Mikroarray-Evaluierung durch hybridisierung *dsrAB*-Genamplifikaten geeigneter Referenzklone

Um Aussagen über die Spezifität der einzelnen Sonden treffen zu können, wurde der Mikroarray mit je 100 ng der zwölf Gen-Amplifikaten geeigneter Referenzklone einzeln hybridisiert und ausgewertet.

Da die Auswertung und Evaluierung mit geeigneten Referenzklonen zu dem Kontrollsonden-Mix normalisiert wurde, ist ein neuer Schwellenwert berechnet worden. Die Schwellenwert-Bestimmung gibt das Verhältnis wieder zwischen Sondersignal und Durchschnitt der Kontrollsonden und ergab bei 55% mit neun FP- und drei FN-Sonden den besten Wert (Daten nicht gezeigt) und wurde für die weitere Evaluierung verwendet. Die normalisierten SSR-Wert-Verhältnisse ergaben Werte zwischen 259,3% für die Sonde *dsrA56* mit *dsrSbi-54* RNS und 56,3% für die Sonde *dsrA89* mit *dsrSBI-39* RNS. Diese Differenz um den Faktor 4.6 demonstriert, wie stark Signalintensitäten von Sonden bei der Hybridisierung mit PM-Ziel-Sequenz variiert. Durch das Normalisieren mit dem Kontrollsonden-Mix und dem neuen

Schwellenwert zeigten nun die Sonden *dsrA146*, *dsrA70* und *dsrB67* kein FP-Signal mehr. Das Auftreten von FN-Signalen erhöhte sich jedoch um die Sonden *dsrB81* und *dsrB121*.

Auf dem *dsrAB*-Chip befanden sich 146 spezifische *dsrAB*-Oligonukleotidsonden. Durch Hybridisieren mit zwölf geeigneten Referenzklonen konnten 52 PM-Sonden getestet werden (Abbildung C11). Von 1752 Hybridisierungen verhielten sich 1740 (99.3%) wie prognostiziert. Das bedeutet sie zeigten entweder positive detektierte Signale fehlende Signale wie erwartet. Bei der Hybridisierung von *dsrSbl-60* RNS zeigte die Sonde *dsrA73* ein FP-Signal. Bei der Hybridisierung von *dsrSblI-9* zeigte die Sonde *dsrA77* ein FP-Signal und die Sonde *dsrB80* ein FN-Signal. Das Hybridisieren mit *dsrSbl-88* RNS zeigte ein verhältnismäßig hohes Auftreten von FP- und FN-Signalen. Die Sonden *dsrA1*, *dsrA2*, *dsrA3*, *dsrB4*, *dsrA5*, *dsrB6* und *dsrA73* zeigten alle ein FP-Signal, während die Sonden *dsrB120* und *dsrB121* ein FN-Signal gaben. Da es sich bei allen sechs FP-Sonden der *dsrSblI-88* RNS-Hybridisierung um PM-Sonden von *dsrSbl-60* RNS handelt, liegt die Vermutung nahe, dass hier eine Kontamination der *dsrSblI-88* RNS mit *dsrSbl-60* RNS vorliegt. Ausgehend von dieser Annahme und der Nichtberücksichtigung der Ergebnisse durch die *dsrSblI-88* RNS-Hybridisierung, zeigten lediglich zwei FP-Signale (*dsrA77* und *dsrA73*) und ein FN-Signal (*dsrB80*) von 1606 Hybridisierungen (99.8%) ein nicht prognostiziertes Hybridisierungsverhalten.

D. Diskussion

D.1 Sensitivität des dsrAB-Mikroarrays

In der Mikroarray Technologie spielen mehrere Faktoren für die Sensitivität eine Rolle. So z.B. die Nachweisgrenze die angibt ab welcher Menge hybridisierter Ziel-RNS alle PM-Sonden ein positives Signal liefern, ohne das Auftreten von MM-Sonden-Signalen. In dieser Studie wurden Ziel-RNS Mengen von 1000 ng bis 1 ng hybridisiert um die Nachweißgrenze zu ermitteln. So war es möglich zu zeigen das der entwickelte Mikroarray bei der Hybridisierung von 1 ng dsr3-RNS (equivalent zu 9×10^8 Ziel-RNS Kopien) noch bei allen sechs PM-Sonden ein positives Signal lieferte ohne das Auftreten von MM-Sonden-Signalen. Bei einem weiteren Experiment bei dem ein Kontrollsonden-Mix in verschiedenen Verdünnungen hybridisiert wurde, war es möglich 0.01 ng der Kontrollsonden-Ziel-RNS durch alle PM-Sonden Positiv nachzuweisen, wieder ohne das Auftreten von Signalen der MM-Sonden. Obwohl die Kontrollsonden nach den gleichen Parametern wie die *dsrAB*-Sonden entwickelt wurden muss man dieses Ergebnis kritisch sehen und weiters gibt es nicht die tatsächliche Nachweißgrenze des Arrays an. Die in dieser Studie ermittelte Nachweisgrenze von 1 ng Ziel RNS wurde in einer Hybridisierung von 1 ng Ziel –RNS in einer Mischung von 185 ng Nicht-Ziel-RNS ermittelt und spiegelt deshalb auch nicht die richtige Nachweißgrenze wieder. Wie in dieser Studie gezeigt wurde erhöht das Hybridisieren von mehr als 100 ng RNS erheblich das Hintergrundrauschen und beeinflusst die Nachweisgrenze negativ. So liegt die Nachweisgrenze dieses Array wahrscheinlich unter 1 ng. Um die genaue Nachweisgrenze zu bestimmen bedarf es weiterer Experimente.

In der Mikroarray Technologie ist die Sensitivität auch definiert als die niedrigste relative Häufigkeit einer Zielgruppe in einer untersuchten mikrobiellen Lebensgemeinschaft die noch detektiert werden kann (Bodrossy and Sessitsch 2004). Die Sensitivität von Oligonukleotid Arrays, die wie hier beschrieben durch immobilisierten von Oligonukleotiden einer Länge von 20-30 Nukleotiden auf einem

Glasobjektträger hergestellt werden, bewegt sich in einer Größenordnung von 1-5% (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003; Denef, Park et al. 2003; Tiquia, Wu et al. 2004). Die in dieser Studie erreichte Sensitivität liegt mit 0,54% Ziel-RNS in eine Mischung mit Nicht-Ziel-RNS bei der Hälfte der Sensitivität der zuvor publizierten Oligonukleotid Mikroarrays. Einfluss auf die Nachweisgrenze und die Sensitivität hat die maximale Hybridisierungs-Kapazität einer Sonde. Neben der Konzentration der gebundenen Sonde auf dem Objektträger spielt auch die sekundäre Struktur der Ziel-RNS eine signifikante Rolle. Lange Nukleinsäuremoleküle tendieren zu stabile Sekundärstrukturen auszubilden und so die entsprechende Bindungsstelle der Sonde unzugänglich zu machen. Eine Möglichkeit diesen Effekt zu verringern bietet die Fragmentierung der Probe. Die Fragmentierung von RNS bringt hier einen entscheidenden Vorteil. So kann RNS im Gegensatz zu DNS sehr einfach und völlig zufällig durch chemische Behandlung fragmentiert werden (Hughes, Mao et al. 2001). Die Verwendung von RNS als Ziel-Nukleotid in der Mikroarray-Technologie konnte bereits erfolgreich gezeigt werden (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003) Ein weiterer Vorteil von RNS ist die hohe Ausbeute bei der Markierung via *In-vitro*-Transkription. Auch durch die Synthese der Ziel-RNS via IVT zeigt sich ein Vorteil, da hier nur ein DNS-Strang von der IVT gelesen und synthetisiert wird. Bei diversen herkömmlichen DNS-Markierungsmethoden wie z.B. dem markieren durch das Klenow-Fragment werden beide DNS-Stränge markiert, so auch der zur Sonde identische. Dies kann zu erhöhten Hintergrundsignalen und weiter zu verringerter Sensitivität führen.

D.2 Spezifität des *dsrAB*-Mikroarrays

In der Mikroarray Technologie ist die Spezifität definiert durch die Fähigkeit zwischen PM-Zielen und MM-Zielen zu diskriminieren.

Beim Hybridisierungsverhalten von Oligonukleotid-Sonden mit Ziel-RNS muss man verschiedene Faktoren berücksichtigen. Wie zum Beispiel Position von GC- und AT-Bindungen, weiters sekundäre Strukturen der Sonden und der Ziel-RNS als auch Zahl,

Position und Art der Basenfehlpaarungen (*mismatch*, MM). So stabilisieren GC reiche Sequenzen, im mittleren Bereich der Sonde, die Hybridisierung stärker als dieselbe Anzahl an GC homogen verteilt (Hughes, Mao et al. 2001). Bei MM verhält es sich ähnlich, so zeigen MM in mittleren Bereichen des Sondenproben-Hybrids einen stärker destabilisierenden Effekt als am Rand (Fotin, Drobyshev et al. 1998). Untersucht man nun die zwei Sonden dsrA73 und dsrA77 die beide ein FP-Signal lieferten auf diese Faktoren hin, zeigen beide zu der jeweiligen Referenz-RNS nur schwach gewichtete Fehlpaarungen (*weighted mismatch*, WMM). So zeigt die Sonde dsrA73 bei der Hybridisierung mit dsrSbi-60 RNS und dsrA77 bei der Hybridisierung mit dsrSbII-9 RNS zwar FP-Signale, unterscheidet sich aber nur um 1.5 WMM und 1.8 WMM von der PM-Sequenz. Da beide Sonden sonst keine großen Abweichungen in Bezug auf die oben erwähnten Faktoren zeigen, kann es sein, dass unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen eine Unterscheidung von Oligonukleotiden, die weniger als 1.8 WMM aufweisen, nicht mehr möglich ist. Um die Frage der Spezifität des Mikroarrays zu klären, sollten jedoch Sonden mit unspezifischem Hybridisierungsverhalten wie in Abbildung D.1 gezeigt, neu entwickelt und anschließend erneut validiert werden. Da jedoch für die Detektion der dsrSbi-60 RNS und der dsrSbII-9 RNS noch jeweils sechs weitere PM-Sonden im Sondensatz enthalten sind, können die FP- und FN-Sonden bei weiteren Analysen ausgeschlossen werden.

D.3 Evaluierung des habitatspezifischen dsrAB-FGA-Chips

Um den *dsrAB*-Mikroarray zu validieren wurden 146 Oligonukleotid-Sonden mit einem Referenzset, bestehend aus 12 *dsrAB*-Umweltklonen, hybridisiert. Diese Umweltklone decken insgesamt 52 PM Oligonukleotid-Sonden und somit 36% der am Mikroarray verwendeten Sonden ab. Für die Validierung der restlichen Sonden waren zu diesem Zeitpunkt keine geeigneten Referenzklone vorhanden.

Auffallend bei der Hybridisierung mit dsrSBI-88 RNS war das Auftreten von FP-Signalen. Da es sich bei allen FP-Sondensignalen um PM-Ziele des auch verwendeten

Referenzklons dsrSBI-60 handelt, liegt die Vermutung einer Kontamination nahe. Eine solche Kontamination der dsrSbi-88 RNS durch dsrSbi-60 RNS kann bei der Kultivierung der Klone für die Miniprep entstanden sein. Eine weitere Quelle solch einer Kontamination stellt die Amplifizierung der Matrizen-DNA für die Ziel-RNS-Herstellung dar. Dass es sich in diesem Fall nicht um unspezifische Kreuzhybridisierungen handelt, zeigt die hundertprozentige Übereinstimmung aller FP-Sonden der dsrSbi-88 RNS-Hybridisierung mit den PM-Zielen der dsrSbi-60 RNS. Um sicher zu stellen das es sich hier um eine Kontamination handelt könnte man das PCR Amplifikat der dsrSbi-88 Probenvorbereitung sequenziert und mit der dsrSb60-DNS Sequenz vergleichen.

Ohne die Ergebnisse der dsrSbi-88 RNS zeigten von 1606 individuellen Hybridisierungsreaktionen 1603 (99.8%) erwartete Ergebnis, entweder durch positive detektierte Signale mit PM-Zielen oder fehlende Signale mit MM-Ziel-Sequenzen. Nur drei der Hybridisierungsreaktionen (0.12%) zeigten FP- oder FN-Signale. Im Vergleich mit einem anderen publizierten Oligonukleotid-Mikroarray, der auch auf einem funktionalem Markergen basieren (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003), zeigt dieser Mikroarray ein um das sechs Fache niedrigere Auftreten von Sonden mit FP- oder FN-Signalen. Eine mögliche Erklärung dafür basiert auf der Sondensatz Entwicklung auf dem dieser Mikroarray basiert.

Zu den wichtigsten Schritten bei der Entwicklung eines Mikroarrays gehört die Sondenentwicklung. Die oft unterschiedlichen Schmelztemperaturen der einzelnen Sonden sind dabei das Hauptproblem. Es gibt Techniken, bei denen nur ein oder sehr wenige Oligonukleotide verwendet werden, wie z.B. bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. Hier ist es möglich, die Stringenz der Hybridisierung der Sonde mit der Ziel-DNS durch Veränderung der Temperatur oder der Formamidkonzentration sehr genau einzustellen. Da es sich hier bei diesem Mikroarray um mehr als hunderte verschiedene Oligonukleotide handelt, die alle zeitgleich unter denselben Bedingungen hybridisiert werden, ist die Einstellung der Schmelztemperatur der Sonden nicht einzeln möglich. Aus diesem Grund ist bei der Entwicklung des Sondensatzes darauf zu achten, dass alle Sonden ein möglichst identisches Hybridisierungsverhalten aufweisen. Um ein annähernd identisches Hybridisierungsverhalten aller Sonden zu gewährleisten, wurde der Sondensatz

einem zusätzlichen Feinabgleich unterzogen. Dazu wurden alle Sonden zuerst nach genauen Kriterien, wie Länge von 30 bp und GC-Gehalt von 40-70%, entwickelt. Anschließend wurden die ΔG -Werte aller Sonden bestimmt und in einem zusätzlichen Schritt, durch Hinzufügen oder Entfernen von endständigen Basen an einzelnen Sonden, versucht einen einheitlichen ΔG -Wert zu erreichen. Durch diesen Optimierungsschritt konnte die Standardabweichung vom ΔG -Mittelwert aller Oligonukleotide bei durchschnittlich -41 kcal/mol von 2.4 auf 0.7 verringert werden.

Trotz des Feinabgleichs des SONDENSATZES Sonden auf die mit dem Ziel-Organismus ein zu niedriges Signal liefern und so unter den Schwellenwert fallen, kann solch eine FN-Sonde entweder komplett neu entwickelt und evaluiert werden oder es kann versucht werden die Signalintensität dieser Sonde zu erhöhen. Neben der zuvor beschriebenen Sekundärstruktur der Nukleinsäuremoleküle können auch sterische Hinderungen die maximale Hybridisierungs-Kapazität beeinflussen.

Bei der Hybridisierung von Proben an immobilisierten Sonden kommt es häufig zu sogenannten sterischen Behinderungen (Brown and Anthony 2000). Sterische Behinderungen die die Oligonukleotid-Zugänglichkeit verschlechtern basieren auf zwei verschiedenen Effekten. Dabei kann es aufgrund der soliden Oberfläche des Objektträgers zur Beeinflussung der Hybridisierungseigenschaften der immobilisierten Sonden kommen oder die Zugänglichkeit der Sonden durch Zusammendrängen verschlechtert werden. Es können weniger Zielmoleküle an die Sonden gebunden werden, was das SONDENSIGNAL verschlechtert. Erhöht man die Konzentration der Sonden im Spotting-Puffer, um mehr Oligonukleotide als Bindungspartner zur Verfügung zu stellen, resultiert daraus nicht zwingend eine Erhöhung des SONDENSIGNALS, da diese sterischen Effekte mit Erhöhung der Konzentration zunehmen. Um diesen negativen Effekt zu minimieren und die maximale Hybridisierungs-Kapazität der FN-Sonden zu steigern könnte der dreißig Basen lange Thymin-Sequenz-Spacer zwischen Trägermaterial und Sonde zusätzlich verlängert werden.

D.4 Ausblick

Die Sondenevaluierung führte zu dem Ergebnis, dass drei Sonden für den *dsrAB*-Mikroarray ungeeignet sind und deshalb in Zukunft nicht mehr auf diesem integriert werden. Die bisher ermittelten Ergebnisse der Sondenevaluierung zeigen das große Potential dieses Arrays für die spezifische und sensitive Detektierung von *dsrAB*-Genen. Um die Anwendbarkeit dieses Mikroarrays für die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft der SRM in komplexen Umweltproben zu zeigen, bedarf es jedoch weiterer Experimente.

Um SRM-Diversitäten und deren Umwelteinfluss zu analysieren, ist es wichtig, die Häufigkeit der einzelnen Mitglieder dieser funktionellen Gilde zu bestimmen.

Bereits früher gab es bei der Mikroarray-Technologie Ansätze, die Resultate quantitativ auszuwerten und so die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften abzuschätzen (Cho and Tiedje 2002).

Bei dieser Methode wurden Genfragmente als Sonden verwendet. Diese Sonden wurden jedoch vor der Fixierung am Trägermaterial mit einer bekannten Menge eines bestimmten Referenzgenfragments versetzt. Durch Hybridisieren einer Mischung aus Umweltprobe und Referenz-DNA, jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, und durch Bestimmung des Signalverhältnisses der beiden Fluorophore, konnte die Probe quantifiziert werden. Eine Quantifizierung in dieser Art würde jedoch bei einem Oligonukleotid-Array zu Problemen führen, da kurze Oligonukleotide in ihrer Hybridisierungseffizienz zu variabel sind. Eine Möglichkeit diesen Umstand zu umgehen und diesen *dsrAB*-Mikroarray doch zu semiquantitativen Analysen von mikrobiellen Lebensgemeinschaften nützen zu können, wäre ein zweistufiges Hybridisierungssystem (Bodrossy, Stralis-Pavese et al. 2003). Die Hybridisierung der einfarbig markierten Umweltprobe wäre dabei die erste Stufe und gibt einen Überblick über das Vorhandensein der Organismen und deren grobe Häufigkeitsverteilung. Bei der zweiten Hybridisierung würden nicht nur Umweltproben mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, sondern auch eine auf die erste Hybridisierung abgestimmte Mischung der detektierten Organismen mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert hybridisiert werden. So hätte man zu jedem

detektierten Organismus einen internen Standard in einer anderen Farbe auf einem Array und wäre so in der Lage diese Ergebnisse durch das Verhältnis der jeweiligen Signale zu quantifizieren. Doch auch hier wären die ermittelten Ergebnisse mit Vorsicht zu behandeln, da es bei den verwendeten molekularbiologischen Schritten während der Targetherstellung zu wesentlichen Unterschieden kommen kann. Eine sehr viel versprechende Anwendung dieser semiquantitativen Methode wäre die Beobachtung zeitlich Änderungen einzelner Umweltproben.

E. Zusammenfassung

Sulfatreduzierende Mikroorganismen (SRM) besitzen das *dsrAB*-Gen, welches für die Dissimilatorische (Bi-) Sulfit-Reduktase kodiert und sind deshalb in der Lage Sulfat zu Sulfid zu reduzieren. Dabei wird Sulfat als Elektronenakzeptor verwendet und so Energie für das Wachstum gewonnen. Obwohl SRM schon früh in der erdgeschichtlichen Entwicklung entstanden und ubiquitär verbreitet sind ist wenig über deren Häufigkeit und Aktivität in komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften bekannt. Um SRM genauer zu erforschen wurde während dieser Arbeit ein habitatspezifischer Oligonukleotid-Array für die kultivierungsunabhängige Detektion und Funktionsanalyse ausgewählter SRM entwickelt und validiert. Der zugrunde liegende Sondensatz (146 Sonden) zur Detektion und Identifizierung der verschiedenen *dsrAB*-Gene (unterteilt in 42 OTU's) basiert auf vergleichenden Sequenzanalysen der *dsrAB*-Gene aus einem sauren Niedermoor (Schlössnerbrunnen, Bayern, Deutschland). Die Entwicklung des Mikroarrays beinhaltete verschiedene Optimierungsschritte während der Mikroarrayproduktion, Herstellung der fluoreszenzmarkierten Nukleinsäureproben, Evaluierung der Hybridisierungsbedingungen und der Validierung des Sondensatzes durch Hybridisierung mit geeigneter Referenz-RNS. Bei der anschließenden Evaluierung der *dsrAB*-Oligonukleotid-Sonden, durch Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten *dsrAB*-Genamplifikaten geeigneter Referenzklone, zeigten 99.8% ein erwartetes Hybridisierungsverhalten. Bei der Hybridisierung von nur 1 ng Ziel-RNS war es möglich die RNS mit den korrespondierenden Sonden positiv nachzuweisen, ohne das Auftreten von Falschpositiven- oder Falschnegativen-Hybridisierungsergebnissen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei der Hybridisierung von einer 0.54% Ziel-RNS/Nicht-Ziel-RNS Mischung die Ziel-RNS noch mit allen spezifischen Sonden detektiert werden konnte.

So ist es mit Hilfe dieses Mikroarrays möglich SRM im Habitat Schlössnerbrunnen hoch auflösend binnen 48 h inklusive aller experimentellen Arbeiten zu detektieren.

F. Literaturverzeichnis

- Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schloter, P. Roslev and M. Wagner (2003). "The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function." *Appl Environ Microbiol* 69(11): 6875-87.
- Alewell, C. and A. Giesemann (1996). "Sulfate Reduction in a Forested Catchment as Indicated by $\Delta^{34}\text{S}$ Values of Sulfate in Soil Solutions and Runoff." *Isotopes in Environmental and Health Studies* 32(2): 203 - 210.
- Alewell, C. and M. Novak (2001). "Spotting zones of dissimilatory sulfate reduction in a forested catchment: the 34S-35S approach." *Environ Pollut* 112(3): 369-77.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- Bahr, M., B. C. Crump, V. Klepac-Ceraj, A. Teske, M. L. Sogin and J. E. Hobbie (2005). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh." *Environ Microbiol* 7(8): 1175-85.
- Baker, B. J., D. P. Moser, B. J. MacGregor, S. Fishbain, M. Wagner, N. K. Fry, B. Jackson, N. Speolstra, S. Loos, K. Takai, B. S. Lollar, J. Fredrickson, D. Balkwill, T. C. Onstott, C. F. Wimpee and D. A. Stahl (2003). "Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State." *Environ Microbiol* 5(4): 267-77.
- Beliakova, E. V., E. P. Rozanova, I. A. Borzenkov, T. P. Turova, M. A. Pusheva, A. M. Lysenko and T. V. Kolganov (2006). "[The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil field]." *Mikrobiologiya* 75(2): 201-11.
- Ben-Dov, E., A. Brenner and A. Kushmaro (2007). "Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes." *Microb Ecol* 54(3): 439-51.
- Blazejak, A., C. Erseus, R. Amann and N. Dubilier (2005). "Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (*Oligochaeta*) from the Peru margin." *Appl Environ Microbiol* 71(3): 1553-61.
- Bodrossy, L. and A. Sessitsch (2004). "Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics." *Current Opinion in Microbiology* 7(3): 245-254.
- Bodrossy, L., N. Stralis-Pavese, J. C. Murrell, S. Radajewski, A. Weilharter and A. Sessitsch (2003). "Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs." *Environmental Microbiology* 5(7): 566-582.

- Boetius, A., K. Ravenschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte and O. Pfannkuche (2000). "A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane." *Nature* 407(6804): 623-6.
- Boothman, C., S. Hockin, D. E. Holmes, G. M. Gadd and J. R. Lloyd (2006). "Molecular analysis of a sulphate-reducing consortium used to treat metal-containing effluents." *Biometals* 19(6): 601-9.
- Boschker, H. T. S., S. C. Nold, P. Wellsbury, D. Bos, W. de Graaf, R. Pel, R. J. Parkes and T. E. Cappenberg (1998). "Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers." *Nature* 392(6678): 801-805.
- Brauman, A., J. A. Muller, J. L. Garcia, A. Brune and B. Schink (1998). "Fermentative degradation of 3-hydroxybenzoate in pure culture by a novel strictly anaerobic bacterium, *Sporotomaculum hydroxybenzoicum* gen. nov., sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 1: 215-21.
- Brown, T. J. and R. M. Anthony (2000). "The addition of low numbers of 3' thymine bases can be used to improve the hybridization signal of oligonucleotides for use within arrays on nylon supports." *J Microbiol Methods* 42(2): 203-7.
- Castro, H., S. Newman, K. R. Reddy and A. Ogram (2005). "Distribution and stability of sulfate-reducing prokaryotic and hydrogenotrophic methanogenic assemblages in nutrient-impacted regions of the Florida Everglades." *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2695-704.
- Cho, J. C. and J. M. Tiedje (2001). "Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays." *Appl Environ Microbiol* 67(8): 3677-82.
- Cho, J. C. and J. M. Tiedje (2002). "Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays." *Appl Environ Microbiol* 68(3): 1425-30.
- Clymo, R. S. (1987). "The ecology of peatlands." *Sci. Pro.* 71: 593-614.
- Cook, A. M., H. Laue and F. Junker (1998). "Microbial desulfonation." *FEMS Microbiol Rev* 22(5): 399-419.
- Cottrell, M. T. and S. C. Cary (1999). "Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*." *Appl Environ Microbiol* 65(3): 1127-32.
- Crane, B. R. and E. D. Getzoff (1996). "The relationship between structure and function for the sulfite reductases." *Curr Opin Struct Biol* 6(6): 744-56.
- Crane, B. R., L. M. Siegel and E. D. Getzoff (1995). "Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions." *Science* 270(5233): 59-67.

- Dahl, C., N. M. Kredich, R. Deutzmann and H. G. Truper (1993). "Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes." *J Gen Microbiol* 139(8): 1817-28.
- Dar, S. A., J. G. Kuenen and G. Muyzer (2005). "Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities." *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2325-30.
- Dar, S. A., L. Yao, U. van Dongen, J. G. Kuenen and G. Muyzer (2007). "Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers." *Appl Environ Microbiol* 73(2): 594-604.
- de Bok, F. A., H. J. Harmsen, C. M. Plugge, M. C. de Vries, A. D. Akkermans, W. M. de Vos and A. J. Stams (2005). "The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*." *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 4): 1697-703.
- DeLong, E. F. (2000). "Resolving a methane mystery." *Nature* 407(6804): 577, 579.
- Demergasso, C., C. Guillermo, E. Lorena, J. J. Mur, Pueyo, Pedr, A. s and Carlos (2007). "Microbial Precipitation of Arsenic Sulfides in Andean Salt Flats." *Geomicrobiology Journal* 24: 111-123.
- Denef, V. J., J. Park, J. L. Rodrigues, T. V. Tsoi, S. A. Hashsham and J. M. Tiedje (2003). "Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities." *Environ Microbiol* 5(10): 933-43.
- Dhillon, A., A. Teske, J. Dillon, D. A. Stahl and M. L. Sogin (2003). "Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin." *Appl Environ Microbiol* 69(5): 2765-72.
- Dillon, J. G., S. Fishbain, S. R. Miller, B. M. Bebout, K. S. Habicht, S. M. Webb and D. A. Stahl (2007). "High rates of sulfate reduction in a low-sulfate hot spring microbial mat are driven by a low level of diversity of sulfate-respiring microorganisms." *Appl Environ Microbiol* 73(16): 5218-26.
- Dubilier, N., C. Mulders, T. Ferdelman, D. de Beer, A. Pernthaler, M. Klein, M. Wagner, C. Erseus, F. Thiermann, J. Krieger, O. Giere and R. Amann (2001). "Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm." *Nature* 411(6835): 298-302.
- Finke, N., V. Vandieken and B. B. Jorgensen (2007). "Acetate, lactate, propionate, and isobutyrate as electron donors for iron and sulfate reduction in Arctic marine sediments, Svalbard." *FEMS Microbiol Ecol* 59(1): 10-22.

- Finster, K., W. Liesack and B. Thamdrup (1998). "Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment." *Appl Environ Microbiol* 64(1): 119-25.
- Fitz-Gibbon, S. T., H. Ladner, U. J. Kim, K. O. Stetter, M. I. Simon and J. H. Miller (2002). "Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 984-9.
- Foti, M., D. Y. Sorokin, B. Lomans, M. Mussman, E. E. Zacharova, N. V. Pimenov, J. G. Kuenen and G. Muyzer (2007). "Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes." *Appl Environ Microbiol* 73(7): 2093-100.
- Fotin, A. V., A. L. Drobyshev, D. Y. Proudnikov, A. N. Perov and A. D. Mirzabekov (1998). "Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips." *Nucleic Acids Res* 26(6): 1515-21.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen and C. R. Woese (1980). "The phylogeny of prokaryotes." *Science* 209(4455): 457-63.
- Fukui, M., A. Teske, B. Assmus, G. Muyzer and F. Widdel (1999). "Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *desulfonema*)." *Arch Microbiol* 172(4): 193-203.
- Fung, I., J. John, J. Lerner, E. Matthews, M. Prather, L. P. Steele, and P. J. Fraser. (1991). "Three-dimensional model synthesis of the global methane cycle." *Geophys. Res.* 96: 13033-13065.
- Gauci, V., E. Matthews, N. Dise, B. Walter, D. Koch, G. Granberg and M. Vile (2004). "Sulfur pollution suppression of the wetland methane source in the 20th and 21st centuries." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12583-7.
- Geets, J., B. Borremans, L. Diels, D. Springael, J. Vangronsveld, D. van der Lelie and K. Vanbroekhoven (2006). "DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria." *J Microbiol Methods* 66(2): 194-205.
- Geets, J., K. Vanbroekhoven, B. Borremans, J. Vangronsveld, L. Diels and D. van der Lelie (2006). "Column experiments to assess the effects of electron donors on the efficiency of in situ precipitation of Zn, Cd, Co and Ni in contaminated groundwater applying the biological sulfate removal technology." *Environ Sci Pollut Res Int* 13(6): 362-78.
- Gorham, E. (1991). "Northern Peatlands: Role in the Carbon Cycle and Probable Responses to Climatic Warming." *Ecological Applications* 1(2): 182-195.

- Haferkamp, I., S. Schmitz-Esser, N. Linka, C. Urbany, A. Collingro, M. Wagner, M. Horn and H. E. Neuhaus (2004). "A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to Chlamydiae." *Nature* 432(7017): 622-5.
- Haferkamp, I., S. Schmitz-Esser, M. Wagner, N. Neigel, M. Horn and H. E. Neuhaus (2006). "Tapping the nucleotide pool of the host: novel nucleotide carrier proteins of *Protochlamydia amoebophila*." *Mol Microbiol* 60(6): 1534-45.
- Hayes, L. A. and D. R. Lovley (2002). "Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments." *Microb Ecol* 43(1): 134-45.
- He, Z., L. Wu, X. Li, M. W. Fields and J. Zhou (2005). "Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria." *Appl Environ Microbiol* 71(7): 3753-60.
- He, Z. and J. Zhou (2008). "Empirical evaluation of a new method for calculating signal-to-noise ratio for microarray data analysis." *Appl Environ Microbiol* 74(10): 2957-66.
- Hipp, W. M., A. S. Pott, N. Thum-Schmitz, I. Faath, C. Dahl and H. G. Truper (1997). "Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes." *Microbiology* 143 (Pt 9): 2891-902.
- Horn, M. A., C. Matthies, K. Kusel, A. Schramm and H. L. Drake (2003). "Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat." *Appl Environ Microbiol* 69(1): 74-83.
- Hughes, T. R., M. Mao, A. R. Jones, J. Burchard, M. J. Marton, K. W. Shannon, S. M. Lefkowitz, M. Ziman, J. M. Schelter, M. R. Meyer, S. Kobayashi, C. Davis, H. Dai, Y. D. He, S. B. Stephanians, G. Cavet, W. L. Walker, A. West, E. Coffey, D. D. Shoemaker, R. Stoughton, A. P. Blanchard, S. H. Friend and P. S. Linsley (2001). "Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer." *Nat Biotechnol* 19(4): 342-7.
- Hulshoff Pol, L. W., P. N. Lens, A. J. Stams and G. Lettinga (1998). "Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters." *Biodegradation* 9(3-4): 213-24.
- Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, S. Hanada, A. Ohashi and H. Harada (2002). "*Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium." *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 5): 1729-35.
- Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Loy, Y. L. Qiu, P. Hugenholtz, N. Kimura, M. Wagner, A. Ohashi and H. Harada (2006). "Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with desulfotomaculum cluster I are widely distributed in methanogenic environments." *Appl Environ Microbiol* 72(3): 2080-91.

- Ingvorsen, K., J. G. Zeikus and T. D. Brock (1981). "Dynamics of Bacterial Sulfate Reduction in a Eutrophic Lake." *Appl Environ Microbiol* 42(6): 1029-1036.
- Ito, T., S. Okabe, H. Satoh and Y. Watanabe (2002). "Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions." *Appl Environ Microbiol* 68(3): 1392-402.
- Itoh, T., K. Suzuki and T. Nakase (1998). "Thermocladium modestius gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote." *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3: 879-87.
- Itoh, T., K. Suzuki, P. C. Sanchez and T. Nakase (1999). "Caldivirga maquilangensis gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines." *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3: 1157-63.
- Jeanthon, C., S. L'Haridon, V. Cuffe, A. Banta, A. L. Reysenbach and D. Prieur (2002). "Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus Thermodesulfobacterium." *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 3): 765-72.
- Jorgensen, B. B. (1982). "Mineralization of organic matter in the sea bed[mdash]the role of sulphate reduction." *Nature* 296(5858): 643-645.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H. P. Koops and M. Wagner (1998). "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations." *Appl Environ Microbiol* 64(8): 3042-51.
- Karkhoff-Schweizer, R. R., D. P. Huber and G. Voordouw (1995). "Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR." *Appl Environ Microbiol* 61(1): 290-6.
- Kibbe, W. A. (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W43-6.
- Kjeldsen, K. U., A. Loy, T. F. Jakobsen, T. R. Thomsen, M. Wagner and K. Ingvorsen (2007). "Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah)." *FEMS Microbiol Ecol* 60(2): 287-98.
- Klein, M., M. Friedrich, A. J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L. L. Blackall, D. A. Stahl and M. Wagner (2001). "Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes." *J Bacteriol* 183(20): 6028-35.

- Kniemeyer, O., T. Fischer, H. Wilkes, F. O. Glockner and F. Widdel (2003). "Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium." *Appl Environ Microbiol* 69(2): 760-8.
- Kniemeyer, O., F. Musat, S. M. Sievert, K. Knittel, H. Wilkes, M. Blumenberg, W. Michaelis, A. Classen, C. Bolm, S. B. Joye and F. Widdel (2007). "Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria." *Nature* 449(7164): 898-901.
- Knittel, K., A. Boetius, A. Lemke, H. Eilers, K. Lochte, O. Pfannkuche, P. Linke and R. Amann (2003). "Activity, Distribution, and Diversity of Sulfate Reducers and Other Bacteria in Sediments above Gas Hydrate (Cascadia Margin, Oregon)." *Geomicrobiology Journal* 20: 269-294.
- Knoblauch, C. and B. B. Jorgensen (1999). "Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments." *Environ Microbiol* 1(5): 457-67.
- Koschorreck, M., K. Wendt-Potthoff and W. Geller (2003). "Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina." *Environ Sci Technol* 37(6): 1159-62.
- Kuever, J., M. Konneke, A. Galushko and O. Drzyzga (2001). "Reclassification of *Desulfobacterium phenolicum* as *Desulfobacula phenolica* comb. nov. and description of strain SaxT as *Desulfotignum balticum* gen. nov., sp. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 1): 171-7.
- Kusel, K., H. C. Pinkart, H. L. Drake and R. Devereux (1999). "Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*." *Appl Environ Microbiol* 65(11): 5117-23.
- Lehman, R. M., F. F. Roberto, D. Earley, D. F. Bruhn, S. E. Brink, S. P. O'Connell, M. E. Delwiche and F. S. Colwell (2001). "Attached and unattached bacterial communities in a 120-meter corehole in an acidic, crystalline rock aquifer." *Appl Environ Microbiol* 67(5): 2095-106.
- Leloup, J., A. Loy, N. J. Knab, C. Borowski, M. Wagner and B. B. Jorgensen (2007). "Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea." *Environ Microbiol* 9(1): 131-42.
- Lemarchand, K., L. Masson and R. Brousseau (2004). "Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water." *Crit Rev Microbiol* 30(3): 145-72.
- Li, X., Z. He and J. Zhou (2005). "Selection of optimal oligonucleotide probes for microarrays using multiple criteria, global alignment and parameter estimation." *Nucleic Acids Res* 33(19): 6114-23.
- Loubinoux, J., F. M. Valente, I. A. Pereira, A. Costa, P. A. Grimont and A. E. Le Faou (2002). "Reclassification of the only species of the genus *Desulfomonas*,

- Desulfomonas pigra*, as *Desulfovibrio piger* comb. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 4): 1305-8.
- Lovley, D. R. and M. J. Klug (1983). "Sulfate Reducers Can Outcompete Methanogens at Freshwater Sulfate Concentrations." *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1): 187-192.
- Loy, A., K. Kusel, A. Lehner, H. L. Drake and M. Wagner (2004). "Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages." *Appl Environ Microbiol* 70(12): 6998-7009.
- Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K. H. Schleifer and M. Wagner (2002). "Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment." *Appl Environ Microbiol* 68(10): 5064-81.
- Loy, A., C. Schulz, S. Lucker, A. Schopfer-Wendels, K. Stoecker, C. Baranyi, A. Lehner and M. Wagner (2005). "16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales"." *Appl Environ Microbiol* 71(3): 1373-86.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer (2004). "ARB: a software environment for sequence data." *Nucleic Acids Res* 32(4): 1363-71.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker (1997). "Biology of microorganisms." Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall.
- Magot, M., P. Caumette, J. M. Desperrier, R. Matheron, C. Dauga, F. Grimont and L. Carreau (1992). "*Desulfovibrio longus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an oil-producing well." *Int J Syst Bacteriol* 42(3): 398-403.
- Magot, M., G. Ravot, X. Campaignolle, B. Ollivier, B. K. Patel, M. L. Fardeau, P. Thomas, J. L. Crolet and J. L. Garcia (1997). "*Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells." *Int J Syst Bacteriol* 47(3): 818-24.
- Mehta, J. P., L. O'Driscoll, N. Barron, M. Clynes and P. Doolan (2007). "A microarray approach to translational medicine in breast cancer: how representative are cell line models of clinical conditions?" *Anticancer Res* 27(3A): 1295-300.
- Merk, S. and D. Martin (2008). "[Application of microarray technology for the analysis of gene expression in veterinary medicine]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 121(5-6): 179-88.

- Miranda-Tello, E., M. L. Fardeau, L. Fernandez, F. Ramirez, J. L. Cayol, P. Thomas, J. L. Garcia and B. Ollivier (2003). "Desulfovibrio capillatus sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico." *Anaerobe* 9(2): 97-103.
- Miranda-Tello, E., M. L. Fardeau, J. Sepulveda, L. Fernandez, J. L. Cayol, P. Thomas and B. Ollivier (2003). "Garcicella nitratreducens gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, nitrate- and thiosulfate-reducing bacterium isolated from an oilfield separator in the Gulf of Mexico." *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 5): 1509-14.
- Molitor, M., C. Dahl, I. Molitor, U. Schafer, N. Speich, R. Huber, R. Deutzmann and H. G. Truper (1998). "A dissimilatory sirohaem-sulfite-reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*." *Microbiology* 144 (Pt 2): 529-41.
- Morasch, B., B. Schink, C. C. Tebbe and R. U. Meckenstock (2004). "Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*." *Arch Microbiol* 181(6): 407-17.
- Muller, J. A., A. S. Galushko, A. Kappler and B. Schink (1999). "Anaerobic degradation of m-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate." *Arch Microbiol* 172(5): 287-94.
- Mussmann, M., K. Ishii, R. Rabus and R. Amann (2005). "Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea." *Environ Microbiol* 7(3): 405-18.
- Muyzer, G. and A. J. Stams (2008). "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria." *Nat Rev Microbiol* 6(6): 441-54.
- Myers, C. R. and K. H. Nealson (1988). "Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor." *Science* 240(4857): 1319-1321.
- Nielsen, L. B., K. Finster, D. T. Welsh, A. Donnelly, R. A. Herbert, R. de Wit and B. A. Lomstein (2001). "Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritima* meadows." *Environ Microbiol* 3(1): 63-71.
- Nilsen, R. K., J. Beeder, T. Thorstenson and T. Torsvik (1996). "Distribution of Thermophilic Marine Sulfate Reducers in North Sea Oil Field Waters and Oil Reservoirs." *Appl Environ Microbiol* 62(5): 1793-1798.
- Odom, J. M. and H. D. Peck, Jr. (1984). "Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*." *Annu Rev Microbiol* 38: 551-92.
- Ollivier, B., P. Caumette, J. L. Garcia and R. A. Mah (1994). "Anaerobic bacteria from hypersaline environments." *Microbiol Rev* 58(1): 27-38.

- Orphan, V. J., K. U. Hinrichs, W. Ussler, 3rd, C. K. Paull, L. T. Taylor, S. P. Sylva, J. M. Hayes and E. F. Delong (2001). "Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments." *Appl Environ Microbiol* 67(4): 1922-34.
- Ouattara, A. S., B. K. Patel, J. L. Cayol, N. Cuzin, A. S. Traore and J. L. Garcia (1999). "Isolation and characterization of *Desulfovibrio burkinensis* sp. nov. from an African ricefield, and phylogeny of *Desulfovibrio alcoholivorans*." *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2: 639-43.
- Paul (2003). "Heterogenität der Sulfatreduktion im Einzugsgebiet des Lehstenbachs, Fichtelgebirge. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Bodenökologie der Universität Bayreuth."
- Postgate, J. R., H. M. Kent, R. L. Robson and J. A. Chesshyre (1984). "The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *D. vulgaris*." *J Gen Microbiol* 130(7): 1597-601.
- Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes and F. Widdle (1996). "Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil." *Appl Environ Microbiol* 62(10): 3605-13.
- Ramsing, N. B., M. Kuhl and B. B. Jorgensen (1993). "Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes." *Appl Environ Microbiol* 59(11): 3840-9.
- Ravenschlag, K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jorgensen and R. Amann (2000). "Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments." *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3592-602.
- Roden, E. E. and D. R. Lovley (1993). "Dissimilatory Fe(III) Reduction by the Marine Microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*." *Appl Environ Microbiol* 59(3): 734-742.
- Safinowski, M. and R. U. Meckenstock (2004). "Enzymatic reactions in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation by the sulphate-reducing enrichment culture N 47." *FEMS Microbiol Lett* 240(1): 99-104.
- Sahm, K., C. Knoblauch and R. Amann (1999). "Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine Arctic sediments." *Appl Environ Microbiol* 65(9): 3976-81.
- Sahm, K., B. J. MacGregor, B. B. Jorgensen and D. A. Stahl (1999). "Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment." *Environ Microbiol* 1(1): 65-74.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sass, H., E. Wieringa, H. Cypionka, H. D. Babenzien and J. Overmann (1998). "High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment." *Arch Microbiol* 170(4): 243-51.
- Savvichev, A. S., Rusanov, II, S. K. Iusupov, I. T. Bairamov, N. V. Pimenov, A. Lein and M. V. Ivanov (2003). "[Microbial sulfate reduction in sediments of the coastal zone and littoral of the Kandalaksha bay of the White sea]." *Mikrobiologiya* 72(4): 535-46.
- Scheid, D. and S. Stubner (2001). "Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots." *FEMS Microbiol Ecol* 36(2-3): 175-183.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-70.
- Schippers, A. and L. N. Neretin (2006). "Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR." *Environ Microbiol* 8(7): 1251-60.
- Schmalenberger, A., H. L. Drake and K. Kusel (2007). "High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen." *Environ Microbiol* 9(5): 1317-28.
- Schmitz-Esser, S., N. Linka, A. Collingro, C. L. Beier, H. E. Neuhaus, M. Wagner and M. Horn (2004). "ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to Chlamydiae and Rickettsiae." *J Bacteriol* 186(3): 683-91.
- Schramm, A., C. M. Santegoeds, H. K. Nielsen, H. Ploug, M. Wagner, M. Pribyl, J. Wanner, R. Amann and D. de Beer (1999). "On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge." *Appl Environ Microbiol* 65(9): 4189-96.
- Sen, A. M. (2001). "Acidophilic Sulphate Reducing Bacteria: Candidates for Bioremediation of Acid Mine Drainage Pollution." Thesis, Univ. Wales.
- Stackebrandt, E., C. Sproer, F. A. Rainey, J. Burghardt, O. Pauker and H. Hippe (1997). "Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov." *Int J Syst Bacteriol* 47(4): 1134-9.
- Stoffels, M., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1999). "rRNA probe-based cell fishing of bacteria." *Environ Microbiol* 1(3): 259-71.
- Stubner, S. and K. Meuser (2000). "Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses." *FEMS Microbiol Ecol* 34(1): 73-80.

- Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner and T. Conway (1999). "Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media." *J Bacteriol* 181(20): 6425-40.
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer and N. B. Ramsing (1996). "Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments." *Appl Environ Microbiol* 62(4): 1405-15.
- Thauer, R. K., Stackebrandt, E. & Hamilton, W. A. (2007). *Sulphate-Reducing Bacteria. Environmental and Engineered Systems*, Edited by Larry L. Barton and W. Allan Hamilton
- Tiquia, S. M., L. Wu, S. C. Chong, S. Passovets, D. Xu, Y. Xu and J. Zhou (2004). "Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples." *Biotechniques* 36(4): 664-70, 672, 674-5.
- Tomei, F. A., L. L. Barton, C. L. Lemanski, T. G. Zocco, N. H. Fink and L. O. Sillerud (1995). "Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 14(3): 329-336.
- Wagner, M., A. Loy, M. Klein, N. Lee, N. B. Ramsing, D. A. Stahl and M. W. Friedrich (2005). "Functional marker genes for identification of sulfate-reducing prokaryotes." *Methods Enzymol* 397: 469-89.
- Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau and D. A. Stahl (1998). "Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration." *J Bacteriol* 180(11): 2975-82.
- Wawer, C., M. S. Jetten and G. Muyzer (1997). "Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase large-subunit gene of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples." *Appl Environ Microbiol* 63(11): 4360-9.
- Webster, G., L. C. Watt, J. Rinna, J. C. Fry, R. P. Evershed, R. J. Parkes and A. J. Weightman (2006). "A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries." *Environ Microbiol* 8(9): 1575-89.
- Weiner, J. M. and D. R. Lovley (1998). "Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment." *Appl Environ Microbiol* 64(2): 775-8.
- White, C. and G. M. Gadd (2000). "Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms." *FEMS Microbiol Lett* 183(2): 313-8.
- Wiberg, H. u. (1985). "Lehrbuch der anorganischen Chemie." Berlin, Walter de Gruyter.

- Widdel, F. and N. Pfennig (1981). "Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov." *Arch Microbiol* 129(5): 395-400.
- Wilms, R., H. Sass, B. Kopke, J. Koster, H. Cypionka and B. Engelen (2006). "Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters." *Appl Environ Microbiol* 72(4): 2756-64.
- Wind, T., S. Stubner and R. Conrad (1999). "Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots." *Syst Appl Microbiol* 22(2): 269-79.
- Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." *Microbiol Rev* 51(2): 221-71.
- Wu, L., D. K. Thompson, G. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje and J. Zhou (2001). "Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment." *Appl Environ Microbiol* 67(12): 5780-90.
- Zhilina, T. N., G. A. Zavarzin, F. A. Rainey, E. N. Pikuta, G. A. Osipov and N. A. Kostrikina (1997). "*Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium." *Int J Syst Bacteriol* 47(1): 144-9.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." *Nucleic Acids Res* 31(13): 3406-15.

G. Anhang

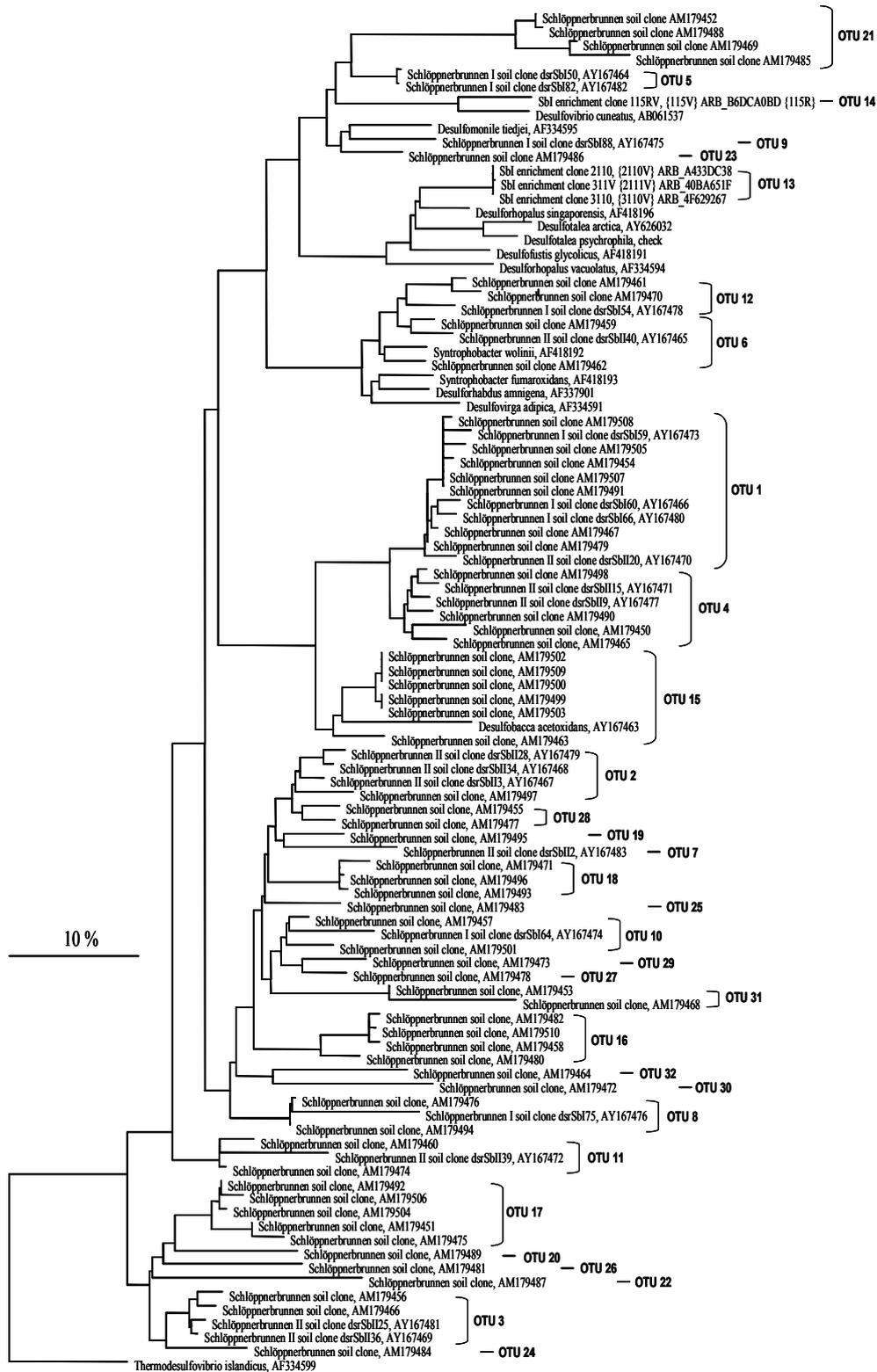


Abbildung G1: Phylogenetischer Konsensus Baum für *dsrAB* Aminosäuren-Sequenzen basierend auf *dsrAB* Sequenzen länger als 1500 Basen von Schloppnerbrunnen I und II Moor-Proben. Die Klammern geben die Zugehörigkeit der einzelnen Sequenzen zu OTUs (basierend auf Dotur-Analysen). Bar = 10% abgeschätzte Sequenz Divergenz.

Tabelle G1: Thermodynamische Eigenschaften der Sonden vor und nach der Optimierung

vor Optimierung		nach Optimierung	
MEDIAN	-41.0	MEDIAN	-41.2
MEAN	-41.0	MEAN	-41.1
SD	2.4	SD	0.7
MIN	-46.2	MIN	-42.4
MAX	-35.7	MAX	-38.5
Sondenlänge	30.0	Sondenlänge	27 - 34

Tabelle G2: *dsrAB* Sonden

Probe	Perfekter Ziel Organismus	Sonden Sequenz 5'-3'	dG 1	dG 2	Länge	%GC
dsrA1	dsrSbl-60, dsrSbl-66, AM179479, AM179467, dsrSbl-20, dsrSbl-59, AM179507, AM179505, AM179491, AM179508, AM179454	TCAGTTCGGCGAAGGTGGGTTCAGTTCAT	-40.8	-1.4	30	53
dsrA2		AAGGTGGGTTCAGTTCATCGGTGGTGGTG	-40.7	-0.3	30	57
dsrA3		TTCATCGGTGGTGGTCCCGAGGAAGATCAT	-40.1	-0.4	30	53
dsrB4		GTTGTCTTTGATGATGGCGGCAAGAACTTGT	-41.4	-1.0	32	44
dsrA5		CCAGGATGGGGCGTCCGATCCAGGAG	-41.5	-2.2	28	71
dsrB6		GGGGGCCAATATCAGTTATACGGTCAGCC	-39.6	-1.0	30	57
dsrA7	dsrSbl-3, dsrSbl-34, dsrSbl-28	ACGGTTATCTCTGGGTGCCGAGACCATTT	-40.0	-2.3	30	53
dsrA8		GCACGCGCATGGAAGCGACGCAATCG	-41.6	-4.6	27	67
dsrB9		CTCGAAACTCGGGGAAGAATGTCGTGCTT	-40.7	-0.4	30	53
dsrB10		ACGCCGGCGCCAGGTTCTCGTGATACTT	-42.4	-2.1	29	62
dsrA11		GGGACAGCCCGCAGCTTGATCTTGAACCT	-41.7	-1.7	30	57
dsrB12		AGTTCTTCTTCAATCGGAGGCAGGAACCTGT	-41.8	-1.8	33	45
dsrA13	AM179497	CAATCATTGGGACAACCGGCACACTTGATTTT	-40.5	-2.1	32	44
dsrA14		GCTGGTATAAAACCATCCCGCCGATGGTT	-40.0	-7.2	30	53
dsrA15		GTGCATGTTGGTCAATCCGGATCCGTGCTT	-40.8	-1.2	30	53
dsrA16	AM179495	TGAAAGCCGGCTCAAGTTCGGGTGGGTT	-42.1	-3.3	30	57
dsrA17		GCCCAAATCGAATCCCGCCCTCGCAAGTT	-41.1	-0.5	29	59
dsrA18		GCGCCATACCGACGCAACACGAAGGCGT	-42.2	-4.9	28	64
dsrA19	dsrSbl-2	TCGTAGGCGAGAGATCGCAAACGTGCTTTT	-40.5	-1.6	30	50
dsrB20		TACTCGCCGATCTGGTCTTTTGGACCTT	-40.5	-5.5	30	53
dsrA21		CACGCAGTCCGGTGTCAATCGCGAGTTT	-41.5	-2.2	30	53
dsrA22	AM179496, AM179471, AM179493	CTCGAGTAGAACCCAGCCCGGTTGGTT	-41.8	-2.6	29	62
dsrA23		CATCGGAAATTGCTCGCTACGTCACTGT	-40.4	-1.6	30	53
dsrA24		TGAAAGGTGGGCTCAACTGGTCCGTGGTT	-41.5	-2.4	30	57
dsrA25	AM179468, AM179453	CGGCGTATTCGGCGACCTTCTCATCGTTTT	-41.0	-5.5	30	53
dsrA26		CACGGATGGTGTGGAAGCGCCACGTT	-42.0	-4.2	28	64
dsrA27		GTGGAAGCGCCACGTTGGGAATTCTT	-41.4	-2.0	29	59
dsrA28	AM179483	CGCCTTGGCAAACCTCCTGAAACGCGGGTT	-41.5	-2.8	29	59
dsrA29		GTGCACGTTGGTCAACCCGAACCGTTG	-41.5	-1.8	28	64
dsrA30		CGCAGATGGTGCGAATGGCGTCACTGGTG	-41.9	-5.3	29	62
dsrA31	AM179510, AM179482, AM179458	CTCCTTGAAGGTGGGCTCGAGCTCATCGG	-40.2	-2.3	29	62
dsrA32	AM179510, AM179482, AM179458	TCGGCATCCACTGCACCTTGAACCTGAACTT	-41.0	-2.1	31	48
dsrA33		TTGACACGCAGCGTATGGAAGTGCAGCGAC	-41.8	-3.4	29	59
dsrA34		CTCATCCTGGTAGGTCGCGTCAAGTCGTC	-41.1	-0.6	30	60
dsrA35	AM179480	GAGGTGCAATCCCGCGGGTCAAGCTCC	-42.3	-1.4	28	71
dsrA36		CTCATCCTGGTAGCTGCGCGTCAAGTCGTC	-41.9	-0.1	30	60
dsrA37	AM179501, AM179457	GCGTGCACACGCTTTCTTGATGTCGAG	-41.6	-1.8	30	53
dsrA38		GACAGCGTGCACACGCTTTCTTGATGT	-40.9	-1.6	30	53
dsrA39	dsrSbl-64	ATACTCATCCAGAATCCACACGCGTTTC	-39.8	0.6	31	48
dsrB40		CCGCAGCTCCTGCTTGAGCGTTCGATCT	-41.8	-5.0	29	62
dsrA41		GCGTGGGCGAGCATCGCACACATCCTT	-41.6	-2.3	28	64

Anhang

dsrA42	AM179478	CTTGAAGGCAGGCTCCAGCTCAGAGGTCTT	-40.3	-0.8	30	57
dsrA43		GTAGGCGCGGGTGAGGTCATCGCACAGTT	-41.8	-2.0	29	62
dsrA44		ACGCGCATGGTATGAAAGTGCCGACCTT	-41.3	-8.3	29	55
dsrA45	AM179473	GCATGTTTCGTCAGGCCGATCCGTGACGTT	-42.2	-3.8	30	53
dsrA46		CGTGATGCGATCGCACATCTCGAGCGTGT	-41.6	-3.7	29	59
dsrA47		ACTTGTAAAGGAAAAGGCGGACGGTGACGTT	-40.0	-3.0	30	50
dsrA48	AM179472	GTCATTGGGGCACCCCGCGCCTTGAATT	-42.1	-3.1	29	62
dsrA49		GAGAAGGTGGGCTCCAGTTGATCCGTTCCG	-41.5	-0.3	30	60
dsrA50		TGGTGTGAAAGTGGGCGACCTCGGGGAATT	-41.6	-1.6	30	57
dsrA51	AM179464	GTAATGCATCGTCAGATCGTAGGTCAGGTTGA	-41.2	-1.3	32	50
dsrA52		GGAGGTGTAGAACCAGGCGCTGGGCTGGT	-41.9	-3.2	29	66
dsrA53		CTCACCTGGGCCTGGTCGATCTGGATGTT	-40.4	-0.6	30	57
dsrA54	dsrSbl-54, AM179461,	AGTCGGAACGCGCGATCGATGCGACGC	-41.6	-4.3	27	67
dsrA55	AM179470	CTGGTATTCTGCGTCAGGTCGTAATGATGT	-40.4	-2.0	32	47
dsrA56		TCGCAACGGGACATTCCAGGCAGCCCT	-41.4	-2.6	28	61
dsrA57	dsrSbl-40, AM179459	AGAAAACAGGCTCGAGCTGGTCGGTAGTCCG	-40.9	-2.3	30	57
dsrA58		GGTCCTCAAGTTGGATCCCGAGCCGCCGA	-42.4	-0.5	29	66
dsrA59		GCGCAAGACTTTCGTGTCGTAGTACTTGCT	-39.7	-3.9	30	50
dsrA60	AM179462	CCACAGATCGCACAGACCAGGATGACTTT	-41.6	-2.2	30	57
dsrA61		TCCAGGCAACTTCCGGAGTCTGAGGTT	-41.0	-2.4	30	57
dsrA62		GCGTCAGATCATAGATGATGTCCTGCGTGTT	-39.9	-2.3	31	48
dsrA63	dsrSbl-36, AM179466,	TTCTCCGGGAGTCCGAGTACCGGCCGA	-41.9	-3.6	28	68
dsrA64	dsrSbl-25	CAGTCATTGGGACAGGCCGACCTTGAT	-40.4	-1.7	29	59
dsrB65	dsrSbl-36, dsrSbl-25	CGCGCACCGTATAGAGCGCTTCTCCCGT	-41.1	-4.2	28	64
dsrB66		GATTTACAGAGATTCGGGATGCGCGTGTT	-39.8	-0.7	30	50
dsrB67		GATATCGCATATCTCCCGATGTGGTCCGTT	-40.2	-4.8	31	52
dsrA68	AM179456	AAGCGCGTAGGCCGCCACTTCTTATGG	-41.7	-6.8	29	62
dsrA69		GATGCAGGCCCACTACATCGTCCCGGT	-40.4	-1.3	28	64
dsrA70		ATAGACCATGCACCTGTCGGGAGAGGTT	-41.2	-3.3	30	57
dsrA71	dsrSbl-15, dsrSbl-9,	CTTGACGGGAAAGACGGCCGGTGCATATC	-40.7	-2.1	30	57
dsrA72	dsrSbl-15, dsrSbl-9,	ATGGTGTCTAGCAGGCGTATTTCGACGCG	-41.2	-3.5	29	59
dsrA73	dsrSbl-9, AM179498,	CTTCCAGACGCCGATGACGCTCATATCGGC	-42.0	-5.0	30	60
dsrA74	AM179490					
dsrA74	dsrSbl-9, AM179498,	TCCGGCAGGTCGGAGTAACGGCCGATGAT	-42.0	-4.0	29	62
dsrA75	AM179465					
dsrA75	dsrSbl-9, AM179498,	CCCGCAGGGCCTTGGTGGTGTAGAACCAG	-41.4	-5.0	29	66
dsrA76	AM179490					
dsrA76	AM179465, AM179450	GAAGCAGGGCTCCAAGTATCGGTTGGTGGT	-41.9	-1.1	30	60
dsrA77		GACGGCCGGTGCATATCGAACTGGAATTCC	-40.9	-2.0	30	57
dsrA78	dsrSbl-9, AM179490,	TGGAGCCGTGCTCGTCCAGATGGCGC	-41.3	-2.0	27	70
dsrA78	AM179465					
dsrA79	AM179490, AM179465	CCGGTGCATATCGAACTGGAATTCCTGGGT	-39.7	-2.7	30	53
dsrB80	dsrSbl-15, dsrSbl-9	CGAGCTTTTTGCATTCGGCCCTCACGCCG	-41.6	-4.6	29	59
dsrB81		TCCACTTGCCGTAGTTCTCTTTGATCACC	-40.8	-0.4	31	52
dsrA82	AM179502, AM179509,	GCGGTGTAATACCAGCCGGAGGGCTGGTT	-41.2	-8.4	29	62
dsrA83	AM179500					
dsrA83	AM179503, AM179499,	CATGGTGTGAAATGTTCCAGACCGGGGAA	-39.7	-6.3	30	53
dsrA83	AM179463					
dsrA84	AM179502, AM179509,	GTGAAATGTTCCAGACCGGGAACTCATCC	-40.8	-3.3	31	55
dsrA84	AM179500,					
dsrA84	AM179503, AM179499					
dsrA85	AM179463	GTGAAATGTTCCAGACCGGGAAATCATCC	-39.9	-3.3	31	52
dsrA86	dsrSbl-39, AM179474,	GGTGCCGATGATGGACATGTCGGCCGG	-42.0	-5.3	28	68
dsrA86	AM179460					
dsrA87	AM179474, AM179460	CCTTTGCCGTTGTTCCGCAAAGATGGCTT	-40.4	-4.6	30	50
dsrA88		GTTGGCGCATCTGAAACCTTGATCTTGAAC	-39.9	-0.4	31	45
dsrA89	dsrSbl-39	CCTTTGCAGTTGTTCCGCGAAGATGGCCT	-41.0	-2.6	30	53
dsrA90		GTTGGCGCAACCGGCAACCTTGATCTTGAA	-41.3	-6.3	30	53
dsrA91	AM179506, AM179492,	TGCTCGGTGAGTGCATCGAAGCAGCGC	-41.5	-3.1	28	64
dsrA92	AM179504	TGACGCGCACGGTGTGGAAGGCGGTGA	-41.6	-2.1	27	67
dsrA93		CTTGACGGCCAGCGGGTTCGATCATCT	-41.6	-4.0	29	62
dsrA94	AM179475, AM179451	ATGACATCGCCGGTCCGCGCTGAAAGTT	-42.4	-2.5	29	59
dsrA95		TCATCTGATACGTATCGTAAGGTCGTATC	-40.8	-2.6	33	45

Anhang

dsrA96		GATGCGCATGGTGTGAAATGCGGTCACGTT	-41.8	-4.2	30	53
dsrA97		GATACGTCATCGTAAGGTCGTGTATCAGCGC	-40.5	-2.2	31	52
dsrA98	AM179506, AM179492, AM179504	GATAGGTCATGGTAAGGTCGTGTATCAGCGC	-39.8	-0.1	31	52
dsrA99	AM179481	TTAGCTCGTCGAAGCGGGTTGCAGGCTTT	-42.4	-2.0	30	57
dsrA100		TGGTATGGAACATCTCAACGGCGGGGAATTA	-41.6	-1.7	32	47
dsrA101		GTGCCGGGCCAACACAGCAACTGATGGTT	-41.2	-1.5	29	59
dsrA102	AM179489	TTCCAGACATCACAGAGCTTTCTCAAGTTTT	-40.6	-1.2	33	42
dsrA103		AAGATTGGCGGTGTTTCGTGCCAAAAGAATG	-41.0	-1.7	31	48
dsrA104		ACCTCCGAGATCGAACCTATCTCTGTCTAGTG	-41.2	-1.8	32	53
dsrA105	AM179487	CCAGATATCGCAGAGTCGTAAGGATTTTTGT	-41.2	-0.4	33	45
dsrA106		TCATCGAAGCATGGTTGCAGCTGTTGGTT	-40.8	-2.3	30	50
dsrA107		CACCTGAACCGCCTAAGTCGTAGCCTGCTT	-41.0	0.2	30	57
dsrA108	AM179488, AM179452	CCGCATCCTTATTGATACGGATGTCATCTTTCC	-40.6	-3.4	33	45
dsrA109		CAATATCACAGAAACCTCTCAGCCAATCAGTTGT	-40.9	-0.4	34	41
dsrA110		CAGGTCCATGGTATCGTAACATGCGAACTCG	-40.3	-2.8	31	48
dsrA111	AM179485	CACATGCCATGGTATCGTAACATGCGAACTC	-41.6	-3.1	32	50
dsrA112	AM179469	AACACATGTCATGGTATCGTAACATGCGAACTC	-41.0	-4.0	34	41
dsrA113	AM179485, AM179469	TACCAATAAATCAGAAGGTGTACGCAGGTTTC	-40.7	-0.8	33	42
dsrA114		TGAACGTGCGATACTTGACAGTACAGCCATTC	-40.5	-1.4	31	48
dsrA115	dsrSbl-50, dsrSbl-82	CCCTTCTCTCCCAAGTCAAAATCTTTTCCA	-40.9	0.5	33	45
dsrA116		TATCGTGGGTGAGTTCCTCAAAACCTCTTCC	-40.7	-2.8	32	47
dsrB117		GGCTGCTTGGCGCTCAGGAGATCCTGTTTT	-41.5	-4.9	30	57
dsrB118		AATGACCTGGCGTCGATCATGGCGGTTTT	-42.4	-2.4	30	57
dsrA119	dsrSbl-88	CCCCAAACAGCACTCGGAGTTCTAAGGTTA	-40.6	-1.5	31	52
dsrB120		GTTTGATCCGCCCGGGAACCTTACGGCTTTT	-40.7	-1.5	30	53
dsrB121		GCAACCACCTACGCGCACGGAGAAAACCTT	-42.1	-2.5	30	57
dsrA122	AM179486	CAGGTTGACCCCTGAACCGCCAAAGTCTCG	-42.4	-3.5	30	63
dsrA123		TGGTCCGTATTAGTCCCCAGGAAGACGATGTC	-41.5	-1.8	32	53
dsrA124		TTGAGGCTGGTCGCAATACCTGCCGATGGT	-41.9	-4.7	30	57
dsrA125	AM179484	CATCAAAGCAGGGCTGAAGATTCTCCGCTTTG	-41.1	-2.0	32	50
dsrA126		CCCCTAAATCAAACCCGCATCCGAAAGGTC	-40.4	-1.5	31	52
dsrA127		AGCAGATATCCAGGCTGTGGACGCAGGCC	-41.1	-2.1	29	62
dsrA128	2-1-10, 3-1-10,3-1-1	GCCAGAAGACATAGGATTGGAACGAGGTTCT	-40.8	-1.3	32	50
dsrA129		CCAGAGATTATCAGGTCGCGAAGATCTTTG	-40.0	-0.2	32	47
dsrB130		TTTCCATCAATTTCCACCTTGGCGGGCTTTAC	-41.2	-0.6	32	47
dsrB131	1-1-5RV	TCGTTGTCCCCATGAATCAACGTTGTTTCT	-40.9	-3.3	32	44
dsrA132		GCTTCTGAAAGAGAGGCGCTTATGGTTTC	-40.6	-1.6	31	52
dsrA133		CCAGTCCCAGATCTTGCCGACAACGCTTTT	-40.0	-0.8	30	53
dsrA134	dsrSbl-75, AM179476, AM179494	AGAGGTCGGTGAAGATGTCCTCAAGGTGTTCCG	-42.1	-2.1	32	53
dsrA135		GTGCGAGAGATAACGGAGAGAAGACGTTGT	-41.5	-1.3	32	50
dsrA136		GGCATATCGCCATTGTATCCATGCAGGCGT	-40.7	-3.6	30	53
dsrA137	AM179477, AM179455	ACCTGAATGTCGCTTTCCAGGTGCCGAT	-38.5	-3.3	29	52
dsrA138	AM179455	TCAGGTCGTAGCAGAGCTTCATGGTGCCTA	-41.7	-1.5	31	52
dsrA139		CATTCGCGATTCTCGATGGCCAGCTTCTTG	-40.3	-1.6	30	50
dsrA140		CCAGATCGAAACCGGCGTGTGCGAGTTCC	-41.6	-1.3	29	62
dsrA141		GCATATTGGTCAGGCCAGACCCGTGCTTCT	-41.0	-2.8	30	57
dsrA142	AM179477	TCGCGGTTCTCAATGGCGAGCTTCTTGCC	-41.5	-2.7	29	59
dsrA143		ACTTGATAGGCAAACCGGGACGATGCAGTT	-41.6	-3.6	30	53
dsrA144		CACAGAAGGTGCGCAGGGCATCGCTGGT	-41.3	-4.1	28	64

Tabelle G3: Kontrollsonden

Probe	Perfekter Ziel Organismus	Sonden Sequenz 5'-3'	dG 1	dG 2	Länge	%GC
dsrCONT1	<i>Desulfohalobium retbaense</i> DSM 5692	CGCAGAGTTATCCCATACCTCGAGGTAGATTATC	-41.2	-1.9	34	47
dsrCONT2	<i>Desulfohalobium retbaense</i> DSM 5692	GACCCGTATTGGGAATCACCCATTTCTTCCCT	-40.8	-3.3	32	50
dsrCONT3	<i>Desulfonema limicola</i> DSM 2076	GCTCCCCGAAGGGCACTATCTCCTTTCAAAG	-40.7	-2.9	31	52
dsrCONT4	<i>Desulfonema limicola</i> DSM 2076	TAGAGGCCATCTTTCATCATTAAATACCGGGTA	-40.7	-0.9	33	42
dsrCONT5	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	TGACGACCGACGACTGAACCGCTCGACTT	-41.2	-1.8	29	59
dsrCONT6	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	TCCGCCGCTATTGAGTCGTCAGTCGTCAG	-40.6	-0.7	29	59
dsrCONT7	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	GGATAGCTGCAGGGACAACACCAAAGACTTC	-41.0	-2.4	32	47
dsrCONT8	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	GCCATGCATCAACATTTGCAGGTAATGCTTG	-40.6	-2.7	32	44
dsrCONT9	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	GCGTGATTATAGGTCCCATTACAGCGCTAAA	-40.5	-1.4	32	47
dsrCONT10	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	ATCCATATTGGCTGCAAAACGCGTTTGTGCAA	-42.2	-2.9	32	44
dsrCONT11	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	GCCATATTTCCAACGAACATACAGGGGGTA	-40.5	0.7	32	47
dsrCONT12	<i>Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	TGTCAGTCCAAACCCCACTACCAATACAGCTA	-40.7	-0.1	32	47

H. Abkürzungsverzeichnis

° Grad
´ Minuten
°C Grad Celsius
μ mikro (10^{-6})
abs. absolut
ADP Adenosin-Diphosphat
AMP Adenosin-Monophosphat
APS Adenosin-5'-Phosphosulfat
ARB Softwarepaket für phylogenetische Datenanalyse (von *arbor*, lat. „der Baum“)
ATP Adenosin-Triphosphat
bp Basenpaare
BSA Bovine Serum Albumin
bzw. beziehungsweise
C Cytosin, Kohlenstoff
CaCl₂ Kalziumchlorid
CaSO₄ Kalziumsulfat, Gips
CTP Cytosin-Triphosphat
dNTP Desoxynukleotid-Triphosphat
DNS Desoxyribonukleinsäure
ds doppelsträngig
DSR dissimilatorische (Bi-)Sulfit-Reduktase
dsrAB Gene der α- und β- Untereinheit der DSR
DsrAB Proteinsequenz der α- und β- Untereinheit der DSR
EDTA Ethylen-Diamin-Tetraacetat
RG Reaktionsgefäß
et al. et alii (lat. „und andere“)
EtBr Ethidium Bromid
EtOH Ethanol
FA Formamid
FISH Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
g Gramm, Gravitationskraft (Erdbeschleunigung)
G Guanin
GTC Guanin-Triphosphat
h Stunde(n)
H₂O Wasser
H₂O_{bidest.} bidestilliertes Wasser
H₂O_{UHQ} hochreines Wasser
H₂S Schwefelwasserstoff
HP Hybridisierungspuffer
IVT *in vitro* Transkription
Kan Kanamycin
kb Kilobasen
kcal Kilokalorien
LB Luria Bertani
m milli (10^{-3}), Meter
M molar
MgCl₂ Magnesiumchlorid
min Minute(n)
mRNS messenger Ribonukleinsäure
n nano (10^{-9})
NaCl₂ Natriumchlorid
NTP Nukleotid-Triphosphate
OT Objektträger
PBS Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCR „Polymerase Chain Reaktion“, Polymerase Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

RNS Ribonukleinsäure
rpm „rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNS ribosomale Ribonukleinsäure
RT Raumtemperatur
RFLP Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SBR “signal-to-background-ratio”, Verhältnis von Signal zu Hintergrund
SSR “signal-to-standard-deviation ratio”, Verhältnis von Signal zu Standardabweichung
SSDR “signal-to-both-standard-deviations ratio”, Verhältnis von Signal zu beiden Standardabweichungen
S⁰ elementarer Schwefel
S²⁻ Sulfid
Sb-OTU Schlöppnerbrunnen Moorboden operational taxonomic unit
SD Standardabweichung
SDS Natrium-Dodecylsulfat
sek Sekunden
SO₃²⁻ Sulfit
SO₄²⁻ Sulfat
S₂O₃²⁻ Thiosulfat
S₄O₆²⁻ Tetrathionat
sp. Art
spp. Arten
SRB sulfatreduzierende Bakterien;
SRM sulfatreduzierender Mikroorganismen
ss „single stranded“, einzelsträngig
T Thymin
T_m Schmelztemperatur
Taq thermostabile DNS-abhängige DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
TBE Tris-Borsäure-EDTA
TE Tris-EDTA
TMAC Tetramethyl-Ammoniumchlorid
Tris Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
U Units (Enzymeinheit), Uracil
UTP Uracil-Triphosphat
V Volt
v/v Volumen/Volumen
Vol. Volumenanteile
w/v Gewicht/Volumen

I. Danksagung

- Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Alexander Loy für die engagierte praktische und theoretische Betreuung während meiner Diplomarbeit bedanken.
- Danke sagen möchte ich auch Prof. Dr. Michael Wagner für die Möglichkeit, meine Arbeit am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie (Universität Wien) zu erstellen.
- Ein herzliches Dankeschön auch an mag. Doris Steger die mich immer kompetent und hilfsbereit unterstützt hat.
- Auch dem ganzen DOME-Team möchte ich danken, für all die Unterstützung und vor allem für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ein letztes und ganz besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern Theresia und Richard Hofer, die immer für mich da sind und deren optimale, finanzielle und mentale Unterstützung mir ein gutes und erfolgreiches Studium ermöglicht haben.

DANKE...

J. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Manuel Hofer
Geboren am: 29. August 1979
Geburtsort: Kirchdorf an der Krems
Staatsbürgerschaft: Österreich

Schulbildung und Hochschulausbildung:

1985-1989 Volksschule, Scharnstein
1989-1993 Hauptschule, Scharnstein
1993-1996 Höhere Technische Bundeslehranstalt, Wels
1996-1999 Ausbildung im Lehrberuf Chemilaborant, Abschluss: Lehrbrief
2000-2001 Berufsreifeprüfung, Abschluss: Matura
2001-2008 Studium der Molekularen Biologie an der Universität Wien
2006-2008 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiellen Ökologie unter der Leitung von
o.Univ.Prof.Dr.Michael Wagner