

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

-Direktor: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch-

Die partielle 16S rDNA- Gensequenzierung und Analyse des Genus *Clostridium*

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von Ruben Siebeneck

aus Hamm

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. med. D. Harmsen

2. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene

- Direktor: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. H. Karch -

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. D. Harmsen

Koreferent: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Zusammenfassung

Die partielle 16S rDNA- Gensequenzierung und Analyse des Genus *Clostridium*

Siebeneck, Ruben

Clostridien sind anaerob wachsende, gram positive Stäbchen, deren phänotypische Differenzierung zeitaufwendig und in vielen Fällen nicht auf Speziesebene möglich ist. Die partielle 16S rDNA- Gensequenzierung dagegen bietet eine Identifizierungsmöglichkeit auf Speziesebene ohne die Notwendigkeit einer Anzucht. Voraussetzungen hierfür sind unter anderem die eindeutige Unterscheidbarkeit der Gensequenzen voneinander sowie das Vorhandensein adäquater Referenzdatenbanken.

In dieser Arbeit wurden 86 Typstämme des Genus *Clostridium* kultiviert und eine 419 bis 468 bp große 16S rDNA- Sequenz erstellt. Die Sequenzen von weiteren 63 Typstämmen des Genus *Clostridium* sind GenBank entnommen und auf Längen gekürzt worden, die durch die Start und Endsequenzen der selbst sequenzierten Keime definiert sind. Damit sind alle Spezies des Genus *Clostridium* gemäß der DSMZ- Liste „Bacterial Nomenclature up to date“ vom Oktober 2004 in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Insgesamt konnten alle Typstämme auf Speziesebene anhand der 16S rDNA- Sequenz eindeutig voneinander unterschieden werden.

Mit den eigens sequenzierten 86 *Clostridium*- Typstämmen wurde eine GenBank-Suche (BLAST- Search) durchgeführt. 33 % (n=28) der Typstämme wurde mit 100 % Übereinstimmung richtig erkannt. 48 % (n=41) der Spezies wurden nicht mit 100 % iger Übereinstimmung erkannt. Falsch erkannt wurden 9 % der Fälle (n=8), obwohl die eigentlich richtigen Spezies in der Datenbank enthalten waren. Nicht in der Datenbank vorhanden war 1 % der Typstämme (n=1). Nicht eindeutig wurden 9 % (n=8) der Spezies erkannt. Öffentliche Datenbanken wie GenBank können daher eine Referenzfunktion zur Identifizierung von Clostridien nur bedingt wahrnehmen, da ungefähr jede fünfte Sequenz falsch oder nicht eindeutig identifiziert wurde.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1. 1	Klinisch wichtige Vertreter des Genus <i>Clostridium</i>	1
1. 2	Konventionelle Verfahren	3
1. 3.	Genotypische Verfahren.....	4
1. 4	Genomdatenbanken.....	5
1. 5	Ziel der Arbeit	6
2	Material und Methoden	8
2. 1	Material	8
2. 1. 1	Spezielle Geräte.....	8
2. 1. 2	Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	8
2. 1. 3	Enzyme	8
2. 1. 4	Synthetische Oligonukleotide.....	8
2. 1. 5	Nährmedien	9
2. 1. 6	Bakterien.....	9
2. 1. 7	Software.....	9
2. 2	Methoden	10
2. 2. 1	Konventionelle Methoden	10
2. 2. 1. 1	Kultivierung der Clostridien.....	10
2. 2. 2	Molekularbiologische Methoden.....	14
2. 2. 2. 1	DNA- Extraktion	14
2. 2. 2. 2	5´- 16S rDNA- PCR	14
2. 2. 2. 3	Aufreinigung des PCR- Produktes	15
2. 2. 2. 4	Gelelektrophorese.....	16
2. 2. 2. 5	Sephadexaufreinigung	16
2. 2. 2. 6	Automatisierte Sequenzierung mit ABI Prism TM Avant Genetic Analyser	16
2. 2. 3	Auswertung der Sequenzdaten	17
2. 2. 4	GenBank- Sequenzevaluierung	18
2. 2. 5	Datensammlung für das RIDOM- Projekt.....	19
2. 2. 6	Literaturrecherche.....	20
3	Ergebnisse	21

3. 1	Vergleichende Sequenzanalyse	21
3. 2	Analyse der 5´- 16S rDNA	22
3. 3	GenBank Sequenzevaluierung.....	24
4	Diskussion.....	29
4. 1	Allgemeines über die 16S rDNA- Gensequenzanalyse.....	29
4. 2	Probleme der 16S rDNA- Sequenzierung und öffentlicher Datenbanken... 30	
4. 3	Kosten des Verfahrens.....	31
4. 4	Das RIDOM- Projekt.....	31
4. 5	MicroSeq 500	32
4. 6	Alternativen zur 16S rDNA- Gensequenzierung	32
4. 7	Alternative Marker bei Clostridien.....	33
4. 8	Fehlerquellen	33
4. 8. 1	Methodenspezifische Fehlerquellen	33
4. 8. 2	Fehler bei der DNA- Extraktion und der PCR- Amplifikation	34
4. 9	Probleme bei der Grenzwertbestimmung	34
4. 10	Grenzen der Methode	35
4. 11	Evaluierung gegen GenBank.....	35
4. 12	Eigene Ergebnisse im Vergleich mit bisherigen Studien zum Genus <i>Clostridium</i>	36
4. 13	Ausblick in die Zukunft.....	40
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	43
7	Lebenslauf	51
8	Danksagung.....	53

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Verzeichnis der kultivierten Typstämme des Genus <i>Clostridium</i>	13
Tabelle 2: Verzeichnis der schwierig zu kultivierenden Typstämme des Genus <i>Clostridium</i> ohne qualitativ hochwertige 16S rDNA- Sequenz	14
Tabelle 3: Verzeichnis der aus GenBank entnommenen Sequenzen der <i>Clostridium</i> – Typstämme	19

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Typstämme des Genus <i>Clostridium</i> anhand von partiellen 16S rDNA- Sequenzen.....	23
---	----

Einleitung

Das Genus *Clostridium* wurde im Jahr 1880 von Prazmowski (56) zum ersten Mal beschrieben. Momentan beinhaltet das Genus *Clostridium* obligat anaerobe und aerotolerante, sporenbildende Stäbchen, die nicht zur Sulfatreduktion fähig sind und für gewöhnlich Gram- positive Zellwandeigenschaften besitzen. Wahrscheinlich aufgrund dieser einfachen Definition ist aus dem Genus *Clostridium* eines der größten und am meisten heterogenen Genera von Bakterien geworden (16). Obwohl genetisch signifikante Unterschiede innerhalb des Genus schon seit langem bekannt sind (34), wurden diese erst mit Hilfe der 16S- rRNA- Sequenzierung offensichtlich (42, 59). 1994 zeigten dann Collins *et al.* anhand der 16S- rRNA Gensequenzierung und der Konstruktion eines phylogenetischen Baumes, wie extrem heterogen das Genus *Clostridium* ist und teilten es in mehrere Cluster ein (16). Der Typstrang *Clostridium butyrum* und viele klinisch wichtige Spezies wurden Cluster I zugeordnet, der in etwa der rRNA- Gruppe I von Johnson und Francis (34) entspricht. Diese Gruppe bildet die Basis des Genus *Clostridium* (16).

1. 1 Klinisch wichtige Vertreter des Genus *Clostridium*

Die klinisch wichtigsten Vertreter sind *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* und die Vertreter der RIC- Gruppe (*Clostridium ramosum*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium clostridioforme*).

Clostridium tetani kommt weltweit und ubiquitär im Erdreich vor. Wenn sie nicht dem Sonnenlicht ausgesetzt werden, können die Bakteriensporen jahrelang überleben. Optimale Wachstumsbedingungen bestehen bei etwa 37° C in anaerober Atmosphäre. Die vegetative Form von *Clostridium tetani* kann zwei Exotoxine- Tetanolysin und Tetanospasmin- bilden, wobei das letztere die typischen klinischen Symptome hervorruft. *Clostridium tetani* ist der Erreger des Wundstarrkrampfes. Vor allem in feuchtwarmen Ländern mit schlechter medizinischer Versorgung erkranken und sterben auch heute noch viele Menschen an dieser Krankheit. In Deutschland hingegen wurden in den letzten Jahren laut Robert- Koch- Institut weniger als 15 Erkrankungsfälle jährlich verzeichnet. Das klinische Bild des Tetanus ist durch eine toxinbedingte neurologische Störung charakterisiert, die sich durch erhöhten Muskeltonus und Krämpfe auszeichnet. Zu unterscheidende klinische Formen des Tetanus sind die

generalisierte, die lokale und die neonatale Erkrankung. Die häufigste, generalisierte Form ist durch tonische Spasmen der Skelettmuskulatur gekennzeichnet, die sich im Gesicht als Risus sardonicus, am Mund als Trismus und in einer opisthotonen Körperhaltung äußern. Die lokale Tetanuserkrankung ist eine seltene Form, deren Manifestation sich auf die Muskeln in der Umgebung der Eintrittspforte beschränkt. Die neonatale Form entwickelt sich bei Kindern, die von unzureichend immunisierten Müttern entbunden werden und bei denen eine hygienisch unzureichende Behandlung des Nabels erfolgte. Die Erkrankung tritt in der Regel in den ersten zwei Lebenswochen als generalisierte Form mit Rigidität, Trinkschwäche und Krämpfen auf.

Infektionen mit *Clostridium botulinum* können in vier Kategorien eingeteilt werden: (I) der klassische Nahrungsmittel- bedingte Botulismus: eine Vergiftung durch Ingestion des präformierten Botulinustoxins in kontaminierten Nahrungsmitteln, (II) der Wundbotulismus, der durch das Wachstum von *Clostridium botulinum* in vivo in infizierten Wunden und anschließender Toxinsproduktion charakterisiert ist, (III) der infantile Botulismus, bei dem Botulinustoxin in vivo im Intestinaltrakt von Säuglingen gebildet wird, und (IV) Botulismus, der zurückzuführen ist auf intestinale Kolonisierung von Kindern und Erwachsenen (52).

Clostridium perfringens wird bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern isoliert: traumatische und atraumatische Wundinfektion, Myonekrose, intraabdominelle Sepsis, gangränöse Cholezystitis, intravasculäre Hämolyse, Aspirationspneumonie, Thoraxempyem sowie Gehirnabszesse. *Clostridium perfringens* wird zur Gruppe der gewebezerstörenden Bakterien gezählt, deren häufigste Manifestationsform die Gasgangrän ist. Zu dieser Gruppe gehören ebenfalls *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum* und *Clostridium bifermentans*. Die durch Clostridien verursachte Myonekrose ist ein toxinbedingter Zusammenbruch des Muskelgewebes assoziiert mit Wachstum der Bakterien. Die Myonekrose verläuft schnell fortschreitend und bedingt lebensbedrohende Konditionen mit verflüssigender Nekrose des Muskels und Gasbildung (52). Bei lebensmittelbedingten Erkrankungen in England und Wales in den Jahren 1992- 2000 war *Clostridium perfringens* die dritthäufigste Ursache eines Krankenhausaufenthaltes und die zweithäufigste Todesursache (2).

Clostridium difficile wurde aus natürlichen Umgebungen und aus Faeces verschiedener Tiere isoliert (46). Am häufigsten gelang der Nachweis aus Flüssen und

Schwimmbecken (9). *Clostridium difficile* ist die häufigste Ursache einer Antibiotika-assoziierten Diarrhoe und einer pseudomembranösen Enterocolitis (7) und hat sich als bedeutendster Erreger nosokomialer Diarrhoen etabliert, wodurch erhöhte Kosten durch verlängerte Krankenhausaufenthalte sowie durch zusätzliche diagnostische und therapeutische Maßnahmen entstehen (41). Die asymptomatische Trägerrate außerhalb der Krankenhäuser liegt bei ungefähr 3 % (7). Die erhöhte Prävalenz von *Clostridium difficile* in Krankenhäusern ist eine Ursache der relativ schnellen Akquisition der Erreger nach stationärer Aufnahme, wobei die Trägerrate vermutlich höher ist als die Rate an Erkrankten (48).

Weitere nennenswerte Vertreter des Genus *Clostridium* sind *Clostridium innocuum*, *Clostridium ramosum* und *Clostridium clostridioforme*, die so genannten RIC- Gruppe. Diese Gruppe bildet einen wichtigen Teil der menschlichen anaeroben Mikroflora und kann Ausgangspunkt für endo- und exogene Infektionen sein. Die Bakterien verhalten sich unterschiedlich in der Gramfärbung, bilden keine Sporen und besitzen keine Clostridien- typische Morphologie (4). Die korrekte Identifizierung misslingt daher häufig in der Routinediagnostik. Dies ist problematisch, da zum einen einige Studien höhere Resistenzlevel für verschiedene Antibiotika für die RIC- Gruppe zeigen (1). Zum anderen besitzt z. B. *Clostridium innocuum*, das zur Normalflora des Darmes gehört eine niedrige intrinsische Vancomycinresistenz (20). Die Entwicklung höhergradiger Vancomycinresistenzen konnte an Patienten beobachtet werden, die rezidivierend an *Clostridium difficile*- assoziierter Diarrhoe erkrankten, was man als Selektionierung unter Vancomycintherapie betrachten kann (1). Dies ist ein Beispiel dafür, dass ein erhöhter Bedarf für die genaue Identifizierung der Clostridien besteht (4).

Zur Identifizierung der Erreger gibt es verschiedene Ansätze: Klassisch- konventionelle und die seit den achtziger Jahren zunehmenden molekularbiologischen Verfahren.

1. 2 Konventionelle Verfahren

Ein grundlegendes Problem konventioneller Verfahren ist die Notwendigkeit der Anzucht des Erregers. Unter anderem Amann *et al.* zeigten 1995 in Untersuchungen vieler Ökosysteme (5), dass 99 % aller Mikroorganismen unter Laborbedingungen nicht kultivierbar sind. Auch unter den Mikroorganismen, die den menschlichen Körper besiedeln, gibt es eine Vielzahl bis jetzt nicht kultivierbarer Mikroorganismen (60, 61).

Die Anzucht von Keimen und Isolation einzelner Kolonien dauert gewöhnlich mehr als 48 Stunden bis zur Identifizierung. Bis zu zwei Wochen werden für die Identifizierung vieler langsam oder anspruchsvoll wachsender Keime benötigt, z. B. *Mycobacterium*. Obwohl kommerziell erhältliche Systeme insgesamt die benötigte Zeit zur Identifikation verringern, benötigen diese bei anspruchsvollen Keimen oft ein noch verlängertes Wachstum, bevor sie untersucht werden können (74).

Das zweite grundsätzliche Problem ist die Identifizierung von Keimen anhand phänotypischer Merkmale. Diese sind in gewissem Maße untersucherabhängig (72) und erschweren damit die Objektivierung und Reproduzierbarkeit von Verfahren und Ergebnissen innerhalb von Laboren als auch den Austausch von Ergebnissen zwischen den Laboren (13).

Ein Schritt zur Lösung dieser Probleme gelang mit der Entwicklung enzymbasierter Identifikationssysteme, die nicht wachstumsabhängig sind und innerhalb einiger Stunden ein Ergebnis produzieren. Nach Inkubation im Identifikationssystem kann ein Ergebnis z. B. anhand eines Farbumschlages abgelesen werden. Auch diese Systeme sind problembehaftet: Farbumschläge sind nicht immer eindeutig (44), Enzymprofile instabil in Abhängigkeit von Umweltbedingungen und Nährmedien (1) und es können innerhalb einer Spezies verschiedene Reaktionsprofile vorkommen. Für solche Probleme haben die Hersteller häufig Codebücher mitgeliefert, in denen konventionelle Tests zur weiteren Identifikation aufgelistet sind. Diese Codebücher können zum einen aber nicht alle Profilmöglichkeiten auflisten, zum anderen erfordert dieses Vorgehen Zeit und Personal (4). Die Konfiguration der Test werden selten verändert, so dass die Daten häufig veraltet (33) oder nicht vollständig sind (41, 44, 47). Insgesamt sind die beschriebenen schnellen Identifikationssysteme eher eine Ergänzung zu konventionellen Methoden (4).

1. 3 Genotypische Verfahren

Genotypische Methoden haben solche Probleme nicht, da es sich um ein grundsätzlich anderes Verfahren handelt. Eine Anzucht und Erkennung anhand unterschiedlicher struktureller und metabolischer Merkmale entfällt. Im allgemeinen werden drei Schritte (DNA- Extraktion, *in vitro* Amplifikation und Charakterisierung) zur Analyse benötigt. Der Sequenzbereich der 16S rDNA des unbekanntes Mikroorganismus wird sequenziert

und mit einer ausreichend großen Anzahl von Referenzsequenzen verglichen. Die Referenzsequenz, die die größte Übereinstimmung mit der untersuchten Sequenz zeigt, weist auf das zutreffende Taxon hin. Die 16S rDNA ist in allen lebenden Organismen vorhanden und damit ein geeignetes Ziel molekularer Analyse (81), sowohl für phylogenetische (84) als auch für diagnostische Zwecke. Ribosomale Diagnoseverfahren besitzen außerdem eine hohe Sensitivität, da die rDNA in mehreren Kopien über verschiedene Gene verteilt vorliegt (17). Das gleichzeitige Vorhandensein konservierter, variabler und hypervariabler Regionen ermöglicht eine Differenzierung von Mikroorganismen auf den verschiedenen taxonomischen Ebenen (66). Ferner kann die ribosomale DNA als molekularer Zeitmesser betrachtet werden. Die rDNA liefert damit die Voraussetzung für stammesgeschichtliche Untersuchungen von Mikroorganismen (83). Die Klassifizierung von Bakterien wird in Zukunft vor allem auf der Grundlage der 16S rDNA- Daten beruhen.

1. 4 Genomdatenbanken

Aufgrund der Vorteile molekularbiologischer Verfahren entstanden öffentliche Datenbanken wie GenBank oder RDP. Hier können von beliebigen Personen und Institutionen eingespeiste Sequenzen mit den eigenen verglichen werden: Je höher die Übereinstimmung und je häufiger durch Einträge verschiedener Autoren bestätigt, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass die gesuchte Spezies die richtige ist. Die meisten Einträge solcher Datenbanken wurden unter phylogenetischen Aspekten getätigt, so dass wichtige humanpathogene Keime fehlen. Auch durch den technischen Fortschritt lassen sich in diesen Datenbanken neue qualitativ hochwertigere neben älteren Sequenzen finden. Dieses Nebeneinander verschiedener Sequenzen erschwert eine objektive Beurteilung.

Daher ist das Projekt zur „Ribosomal Differentiation of Microorganisms“ (RIDOM) initiiert worden. Kernstück des Projektes ist eine Datenbank für ribosomale Sequenzen medizinisch relevanter Mikroorganismen. Die diagnostische Prozedur beginnt mit der Eingabe einer partiellen Sequenz der 16S rDNA der Probe über eine html- basierte Eingabemaske für bereits existierende Analysesoftware wie FASTA und CLUSTAL W (31). Durch Abgleich mit der Datenbank erhält man als Ergebnis einen Genus- oder Speziesnamen. Sind die ersten Ergebnisse nicht eindeutig oder definieren sie kein

Ergebnis auf Spezies- Level, werden Hinweise für eine weitere molekulare oder konventionelle phänotypische Differenzierung angeboten (30). Durch die Verknüpfungen mit einer Datenbank für Arzneimittel (RxList) können auch unmittelbar Therapievorschläge unterbreitet werden. RIDOM ist darüber hinaus „LinkOut“- Partner für die „National Center for Biotechnology Information“- (NCBI, USA) Datenbanken GenBank, PubMed und TAXONOMY.

Die 16S rDNA Gensequenzierung hat also mehrere Vorteile gegenüber konventionellen Methoden (29), da sie ein objektiveres und durchgängigeres Spezieskonzept liefert und sie Rückschlüsse auf verwandtschaftliche Beziehungen der untersuchten Taxa (phylogenetische Analyse) gibt. Schließlich sind molekularbiologische Wege der Diagnostik effektiver, weil sie einen spezifischeren und einfacher zu automatisierenden Prozess darstellen (26).

1. 5 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Differenzierung des Genus *Clostridium* untersucht. 86 *Clostridien*- Typstämme aus der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ) wurden kultiviert und ihre DNA extrahiert. Nach in vitro- Amplifikation eines genau definierten rDNA- Sequenzabschnittes mittels PCR wurde ein Teil des 16S rDNA- Gens automatisch sequenziert (*Taq*- Cycle- Sequenzierung). Die Sequenzen wurden manuell editiert und qualitätskontrolliert und stehen der RIDOM- Datenbank zur Verfügung.

Zur Klärung der Frage, ob eine eindeutige Identifizierung der Spezies innerhalb des Genus möglich ist, wurden die zur Vervollständigung des Genus *Clostridium* fehlenden Sequenzen aus GenBank entnommen und zusammen mit den eigens sequenzierten Spezies zu einem phylogenetischen Baum zusammengestellt. Dieser beinhaltet damit alle laut DSMZ- Liste „Bacterial Nomenclature up to date“ im Oktober 2004 validierten *Clostridium* Typstränge. Die partiellen 16S rDNA- Sequenzen wurden mit denen von Collins *et al.* 1994 unter phylogenetischen Aspekten und mit kompletten 16S rDNA- Sequenzen anhand eines phylogenetischen Baumes verglichen.

Um die Qualität öffentlich zugänglicher Datenbanken zu evaluieren, wurde schließlich mit den selbst sequenzierten Sequenzen GenBank via BLAST durchsucht und die Ergebnisse auf ihre Richtigkeit geprüft.

Material und Methoden

2. 1 Material

Es wurden Standardgeräte, -chemikalien und -materialien (Glas- und Plastikwaren) der Firmen Abgene (Genf, Schweiz), Applied Biosystems (Darmstadt und Foster City, Ca, USA), Biometra (Göttingen), BioRad- Laboratories (München), Biozym (Wien, Österreich), Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Flacht), Heidolph (Schwabach), Heraeus (Hanau), Herolab (Wiesloch), Kreutz (Reiskirchen), Kirsch (Offenburg), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Osterode am Harz) verwendet.

Spezielle Materialien und Geräte, insbesondere für die molekularbiologischen Versuche, werden im Folgenden mit der jeweiligen Bezugsfirma aufgeführt.

2. 1. 1 Spezielle Geräte

ABI Prism 3100Avant Genetic Analyzer: Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler T1, Software Vers. 4.16: Biometra, Göttingen

2. 1. 2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

ABI Prism BigDye Terminator V3.0 Cycle Sequencer: Applied Biosystems, Darmstadt
Centrisep Spin Columns: Applied Biosystems
HPLC: LiChrosolv® (Wasser für die Chromatographie): Merck, Darmstadt
Sephadex G-50 Superfine: Amersham, Uppsala, Schweden

2. 1. 3 Enzyme

AmpliTaq DNA Polymerase: Applied Biosystems, Darmstadt
Exonuclease I (*E. coli*): New England Biolabs, Frankfurt am Main
Lysozym- Lösung (=Muraminidase): Merck, Darmstadt
Taq- Polymerase: AmpliTaq DNA- Polymerase, Applied Bio System, Darmstadt
Proteinase K: Roth, Karlsruhe

2. 1. 4 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma- Aldrich Chemie, Taufenstein, bezogen.

16S- PCR und Sequenzierung:

16S- 27f 5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTG AG – 3'
(8-27 16S rDNA)

16S- 519r 5' – GWA TTA CCG CGG CKG CTG – 3'
(536-519 16S rDNA)

16S- 907r 5' – CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT – 3'
(926-907 16S rDNA)

In den Klammern die “Annealing Position” des Primers bezogen auf die *E. coli*-Position der 16S rDNA

2. 1. 5 Nährmedien

Schaedler- Agar- Platten: Schaedler Blut Agar mod., Heipha, Heidelberg, Ref: 315-e

Columbia- Blut- Agar- Platten: Columbia- Blutagar, Heipha, Heidelberg, Ref: 109-e

BHI- Bouillon: Nährbodenküche Universitätsklinikum Münster

2. 1. 6 Bakterien

Alle Bakterienstämme wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen.

Insgesamt wurden 86 Typstämme des Genus *Clostridium* sequenziert.

2. 1. 7 Software

Bibliographix V4, M. Schäfer und Olaf Winkelhake, Hildesheim

BLAST- Algorithmus: National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland

Lasergene Software Package: DNASTar Inc., Wisconsin, USA (Umfangreiches Software Paket zum Bearbeiten von Sequenzen: Teile des Lasergene Pakets: EditSeqV3.89, MapDraw V 3.08, MegAlign V3.11)

Sequence Navigator Version 1.0.1, PE Applied Biosystems, Weiterstadt

2. 2 Methoden

2. 2. 1 Konventionelle Methoden

2. 2. 1. 1 Kultivierung der Clostridien

Die Anzucht der Stämme erfolgte auf je zwei Schaedler- Agarplatten und einer Columbia- Blutagarplatte. Diese wurden dann in Gaspacktöpfen bei 37 °C drei bis vier Tage bebrütet. Die Anzuchttemperatur und das jeweilige Medium richteten sich nach den Empfehlungen der DSMZ. Nach Wachstum wurde von jeder Kultur eine Probe bei –80 °C tiefgefroren. Sie dienen als Referenz für das RIDOM- Projekt und sind Teil der institutseigenen Stammsammlung. Insgesamt wurden 124 Typstämme versucht zu kultivieren.

<i>Clostridium absonum</i>	DSM 599
<i>Clostridium aceticum</i>	DSM 1496
<i>Clostridium acidisoli</i>	DSM 12555
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	DSM 793
<i>Clostridium acidurici</i>	DSM 604
<i>Clostridium acidireducens</i>	DSM 10703
<i>Clostridium aerotolerans</i>	DSM 5434
<i>Clostridium aldrichii</i>	DSM 6159
<i>Clostridium algidicarnis</i>	DSM 15099
<i>Clostridium alginolyticum</i>	DSM 12273
<i>Clostridium aminophilum</i>	DSM 10710
<i>Clostridium aminovalericum</i>	DSM 1283
<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	DSM 793
<i>Clostridium baratii</i>	DSM 601
<i>Clostridium bifermentans</i>	DSM 14991
<i>Clostridium cadaveris</i>	DSM 1284
<i>Clostridium carnis</i>	DSM 1293
<i>Clostridium celatum</i>	DSM 1785
<i>Clostridium celerecrescens</i>	DSM 5628
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	DSM 5812
<i>Clostridium cellobioparum</i>	DSM 1351
<i>Clostridium cellulovorans</i>	DSM 3052
<i>Clostridium chartatabidum</i>	DSM 5482
<i>Clostridium chauvoei</i>	DSM 7528
<i>Clostridium clostridioforme</i>	DSM 933
<i>Clostridium coccoides</i>	DSM 935
<i>Clostridium cocleatum</i>	DSM 1551
<i>Clostridium cochlearium</i>	DSM 1285

<i>Clostridium colinum</i>	DSM 6011
<i>Clostridium collagenovorans</i>	DSM 3089
<i>Clostridium cylindrosporum</i>	DSM 605
<i>Clostridium difficile</i>	DSM 1296
<i>Clostridium diporicum</i>	DSM 5521
<i>Clostridium estertheticum ssp estertheticum</i>	DSM 14864
<i>Clostridium fallax</i>	DSM 2631
<i>Clostridium felsineum</i>	DSM 794
<i>Clostridium fimetarium</i>	DSM 9179
<i>Clostridium formicaceticum</i>	DSM 92
<i>Clostridium frigidicarnis</i>	DSM 12271
<i>Clostridium gasigenes</i>	DSM 12272
<i>Clostridium glycolicum</i>	DSM 1288
<i>Clostridium ghonii</i>	DSM 15049
<i>Clostridium grantii</i>	DSM 8605
<i>Clostridium haemolyticum</i>	DSM 5565
<i>Clostridium halophilum</i>	DSM 5387
<i>Clostridium hastiforme</i>	DSM 5675
<i>Clostridium hathewayi</i>	DSM 13479
<i>Clostridium herbivorans</i>	DSM 14428
<i>Clostridium histolyticum</i>	DSM 2158
<i>Clostridium homopropionicum</i>	DSM 5847
<i>Clostridium hylemonae</i>	DSM 15053
<i>Clostridium indolis</i>	DSM 755
<i>Clostridium innocuum</i>	DSM 1286
<i>Clostridium intestinale</i>	DSM 6191
<i>Clostridium irregulare</i>	DSM 2635
<i>Clostridium isatidis</i>	DSM 15098
<i>Clostridium kluyveri</i>	DSM 555
<i>Clostridium lactatifermentans</i>	DSM 14214
<i>Clostridium laramiense</i>	DSM 14864
<i>Clostridium lentocellum</i>	DSM 5427
<i>Clostridium leptum</i>	DSM 753
<i>Clostridium limosum</i>	DSM 1400
<i>Clostridium litorale</i>	DSM 5388
<i>Clostridium lituseburense</i>	DSM 797
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	DSM 13528
<i>Clostridium magnum</i>	DSM 2767
<i>Clostridium malenominatum</i>	DSM 1127
<i>Clostridium manganotii</i>	DSM 1289
<i>Clostridium mayombei</i>	DSM 6539
<i>Clostridium methoxybenzovorans</i>	DSM 12182
<i>Clostridium methylpentosum</i>	DSM 5476
<i>Clostridium neopropionicum</i>	DSM 3847
<i>Clostridium nexile</i>	DSM 1787

<i>Clostridium novyi</i>	DSM 14992
<i>Clostridium oceanicum</i>	DSM 1290
<i>Clostridium orbiscindens</i>	DSM 6740
<i>Clostridium oroticum</i>	DSM 1287
<i>Clostridium papyrisolvens</i>	DSM 2872
<i>Clostridium paradoxum</i>	DSM 7308
<i>Clostridium paraputrificum</i>	DSM 2630
<i>Clostridium pascui</i>	DSM 10365
<i>Clostridium pasteurianum</i>	DSM 525
<i>Clostridium peptidovorans</i>	DSM 12505
<i>Clostridium perfringens</i>	DSM 756
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	DSM 1801
<i>Clostridium populeti</i>	DSM 5832
<i>Clostridium propionicum</i>	DSM 1682
<i>Clostridium proteoclasticum</i>	DSM 14932
<i>Clostridium proteolyticum</i>	DSM 3090
<i>Clostridium puniceum</i>	DSM 2619
<i>Clostridium purinolyticum</i>	DSM 1384
<i>Clostridium putrefaciens</i>	DSM 1291
<i>Clostridium quinii</i>	DSM 6736
<i>Clostridium ramosum</i>	DSM 1402
<i>Clostridium rectum</i>	DSM 1295
<i>Clostridium roseum</i>	DSM 7320
<i>Clostridium sartagoforme</i>	DSM 1292
<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	DSM 13864
<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i>	DSM 14923
<i>Clostridium sardiniense</i>	DSM 2632
<i>Clostridium scatologenes</i>	DSM 757
<i>Clostridium scindens</i>	DSM 5676
<i>Clostridium septicum</i>	DSM 7534
<i>Clostridium sordellii</i>	DSM 2141
<i>Clostridium sphenoides</i>	DSM 632
<i>Clostridium spiroforme</i>	DSM 1552
<i>Clostridium sticklandii</i>	DSM 519
<i>Clostridium subterminale</i>	DSM 6970
<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM 795
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	DSM 1294
<i>Clostridium subterminale</i>	DSM 6970
<i>Clostridium symbiosum</i>	DSM 934
<i>Clostridium termitidis</i>	DSM 5398
<i>Clostridium tertium</i>	DSM 2485
<i>Clostridium tetanomorphum</i>	DSM 4474
<i>Clostridium thermobutyricum</i>	DSM 4928
<i>Clostridium thermopalmarium</i>	DSM 5974
<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	DSM 13105
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	DSM 2637

<i>Clostridium ultunense</i>	DSM 10521
<i>Clostridium vimcentii</i>	DSM 10228
<i>Clostridium viride</i>	DSM 6836
<i>Clostridium xylanolyticum</i>	DSM 6555
<i>Clostridium xylanovorans</i>	DSM 12503

Tabelle 1: Verzeichnis der kultivierten Typstämme des Genus *Clostridium*

Bei folgenden *Clostridium*- Typstämmen konnte keine 16S rDNA- Sequenz erstellt werden aufgrund von Problemen bei der Anzucht und damit verbundenen qualitativ schlechten DNA- Sequenzen.

Keine qualitativ hochwertige 16S r-DNA- Sequenz	
<i>Clostridium aceticum</i>	DSM 1496
<i>Clostridium acidireducens</i>	DSM 10703
<i>Clostridium acidurici</i>	DSM 604
<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	DSM 793
<i>Clostridium chartatabidum</i>	DSM 5482
<i>Clostridium celerecrescens</i>	DSM 5628
<i>Clostridium cellobioparum</i>	DSM 1351
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	DSM 5812
<i>Clostridium celluloverans</i>	DSM 3052
<i>Clostridium disporicum</i>	DSM 5521
<i>Clostridium formicaceticum</i>	DSM 92
<i>Clostridium gasigenes</i>	DSM 12272
<i>Clostridium glycolicum</i>	DSM 1288
<i>Clostridium hastiforme</i>	DSM 5675
<i>Clostridium herbivorans</i>	DSM 14428
<i>Clostridium honopropionicum</i>	DSM 5847
<i>Clostridium irregulare</i>	DSM 2635
<i>Clostridium kluyveri</i>	DSM 555
<i>Clostridium laramiense</i>	DSM 14864
<i>Clostridium leptum</i>	DSM 753
<i>Clostridium litorale</i>	DSM 5388
<i>Clostridium magnum</i>	DSM 2767
<i>Clostridium malenominatum</i>	DSM 1127
<i>Clostridium novyi</i>	DSM 14992
<i>Clostridium oceanicum</i>	DSM 1290
<i>Clostridium oroticum</i>	DSM 1287
<i>Clostridium papyrosolvans</i>	DSM 2782
<i>Clostridium puniceum</i>	DSM 2619
<i>Clostridium ramosum</i>	DSM 1402
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	DSM 2544
<i>Clostridium sardiniense</i>	DSM 2632

<i>Clostridium sartagoforme</i>	DSM 1292
<i>Clostridium septicum</i>	DSM 7534
<i>Clostridium sphenoides</i>	DSM 632
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	DSM 1294
<i>Clostridium sticklandii</i>	DSM 519
<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	DSM 13105
<i>Clostridium ultunense</i>	DSM 10521

Tabelle 2: Verzeichnis der schwierig zu kultivierenden Typstämme des Genus *Clostridium* ohne qualitativ hochwertige 16S rDNA- Sequenz

Die 16S rDNA- Sequenzen dieser schwierig zu kultivierenden Typstämme wurden daher aus GenBank entnommen und mit den Sequenzen der selbst sequenzierten Typstämme zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes zusammengefügt.

2. 2. 2 Molekularbiologische Methoden

2. 2. 2. 1 DNA- Extraktion

Zwei Impfösen Bakteriematerial wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 400 µl Tris- EDTA Puffer (Tris- HCl, 10 mmol; EDTA, 1 mmol; pH 7,0) homogenisiert und anschließend 30 Minuten bei 80 °C inaktiviert. Nach diesem Zeitraum konnte von der Inaktivierung sämtlicher Mikroorganismen ausgegangen werden. Inkubationen mit Lysozym bei 37 °C für 1- 12 h und 10 % SDS/Proteinase K- Lösung bei 65 °C für 10 Minuten schlossen die Zellwand auf. Eine zehnmütige Behandlung mit N-acetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl- Lösung nach dem Protokoll von van Embden *et al.* band Zellwandtrümmer, überschüssige Polysaccharide und Proteine. Die DNA wurde durch Zentrifugation mit Chloroform/ Isoamylalkohol von den Zellfragmenten abgetrennt und in ein neues Gefäß überführt. Dort präzipitierte die DNA in Isopropanol nach halbstündiger Inkubation bei -20 °C und ebenso langer Zentrifugation bei 14000 g. Nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 20 µl TE- Puffer gelöst.

2. 2. 2. 2 5'-16S rDNA- PCR

Die universellen Primer 16S- 27f und 16S- 907r starten die Amplifikation eines Teilabschnitt der ribosomalen 16S- Untereinheit (E. coli- Position 8- 926) der extrahierten und gereinigten Clostridien- DNA. Der Primernamenname gibt die Position des

3'- Endes des Oligonukleotids auf der 16S- Untereinheit wieder. Die Angaben „f“ und „r“ stehen für „forward“ und „reverse“.

Für die PCR wurde die DNA in TE- Puffer 1:10 verdünnt. Der PCR- Ansatz setzte sich aus 2 µl (1 ng) DNA, 2 µl (10 pmol) (Start-) Primer (16S- 27f 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTG AG- 3'), 2 µl (10 pmol) (End-)Primer (16S- 907r 5'- CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT- 3'), 1 µl dNTP (200 µmol Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µmol 10- fach konzentrierter PCR- Puffer (Tris- HCl, 100 µmol; KCl, 500 mmol; MgCl₂, 15 mmol; pH 8,3), 3 µl MgCl₂ (250 mM) und 5 µl (1,25 U) *Taq*- Polymerase zusammen. Insgesamt waren dies 15,25 µl Ansatz, der mit HPLC auf 50 µl aufgefüllt wurde.

Nach einem „Hot- Start“ bei 80 °C mit einer Dauer von zehn Minuten folgten 28 Amplifizierungszyklen, die durch eine Denaturierungsphase von 45 Sekunden bei 94 °C, eine „Annealing“- Zeit von einer Minute bei 53 °C und eine Extensionsphase von eineinhalb Minuten bei 72 °C gekennzeichnet waren. Die finale Extensionsphase von zehn Minuten bei 72 °C beendete die Reaktion.

Ein bereits erfolgreich amplifizierter *Staphylococcus aureus*- Stamm diente bei der PCR als Positivkontrolle; eine Leerprobe mit HPLC- Wasser diente als Negativkontrolle.

Die Reaktionen fanden in einem automatischen DNA- Thermocycler (T1 Thermocycler, Biometra) statt.

2. 2. 2. 3 Aufreinigung des PCR- Produktes

Nach der 16S- PCR wurden die PCR- Produkte mit dem Milliporeaufreinigungssystem aufgereinigt. Das PCR- Produkt wurde hierzu in Mikrotiterplatten überführt und mit 60 µl HPLC- Wasser aufgefüllt. In einem ersten Reinigungsschritt wurde die Mikrotiterplatte auf dem Manifold unter Aufbau eines Vakuums von 20- 25 mmHg für drei Minuten durchgesaugt. Ebenso lief auch der zweite Waschschrift, für den noch einmal 100 µl HPLC- Wasser auf die Membran gegeben wurde, ab. Im dritten Schritt wurden 50 µl HPLC- Wasser auf die Membran gegeben und die Mikrotiterplatten dann bei höchster Geschwindigkeit auf einem Schütteltisch eluiert.

2. 2. 2. 4 Gelelektrophorese

Nach der Aufreinigung wurde das PCR- Produkt der Gelelektrophorese unterzogen. Dazu wurden je 8 µl des aufgereinigten PCR- Produktes und 2 µl Probenpuffer in den Wells einer Mikrotiterplatte gemischt. Ebenso wurde ein Molekulargewichtsmarker mit einem Mischungsverhältnis von 0,5 µl Molekulargewichtsmarker und 9,5 µl Aqua ad mitgeführt von dem 6 µl für die Gelelektrophorese eingesetzt. Die aufgereinigte DNA lief 40 min bei 110 V in 1,5 %igen Agarosegelen. Die DNA- Banden wurden durch Ethidiumbromid- Färbung mit UV- Licht visualisiert und anschließend fotografiert. Das aufgereinigte PCR- Produkt ist zum Schluss noch einmal photometrisch gemessen worden, um aus beiden Informationen den DNA- Ansatz für die Sequenzierungs- PCR abzuschätzen.

2. 2. 2. 5 Sephadexaufreinigung

Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mittels eines Kunstharzes (*Sephadex G50*) aufgereinigt (*Big Dye Terminator Removal and Sequencing Reaction Clean Up*). Der zunächst pulverförmige Kunstharz quoll dabei über drei Stunden in einer 96 Well-Platte nach Zugabe von HPLC. Nach Zentrifugation des Reaktionsproduktes über die 96 Well Platte, lag das aufgereinigte Sequenzierungsprodukt vor. Im Anschluss wurde dieses Produkt nach Herstellerempfehlungen (Millipore) getrocknet, von nicht-inkorporierten dNTPs getrennt, in 20 µl Formamid aufgelöst und nach den Anweisungen des Herstellers für die Acrylamid- Gel- Elektrophorese im *ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer* so präpariert, dass die Nukleotidfolge für beide DNA-Stränge bestimmt werden konnte.

2. 2. 2. 6 Automatisierte Sequenzierung mit ABI Prism™ 3100 Avant Genetic Analyzer

Die 5'- 16S rDNA wurde nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des *Taq-cycle (Big)- DyeDeoxy™ Terminator Kit* amplifiziert und im *ABI Prism 377 Sequencer* elektrophoretisch getrennt und detektiert.

Bei dieser „linearen Amplifizierung“ werden im Unterschied zu den oben beschriebenen PCRs nur ein Primer und Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt. Die ddNTPs sind

entsprechend den unterschiedlichen Nukleotiden mit verschiedenen Farbstoffen markiert und verursachen vorzeitige Strangterminierungen.

Die Sequenzierung wurde für jede Probe mit jeweils einem forward und einem reverse Primer durchgeführt. Zur Anwendung kamen die Primer 16S- 27f und 16S- 519r.

Die 25 Zyklen dieser Reaktion setzten sich aus einer Denaturierungsphase von zehn Sekunden bei 96 °C, einer „Annealing“- Phase von fünf Sekunden bei 53 °C und einer Extensionsphase von vier Minuten bei 60 °C zusammen. Die Primer wurden mit einer Menge von 10 pmol eingesetzt.

Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mittels eines Kunstharzes (*Sephadex G50*) aufgereinigt (*Big Dye Terminator Removal and Sequencing Reaction Clean Up*). Der zunächst pulverförmige Kunstharz quoll dabei über drei Stunden in einer 96 Well-Platte nach Zugabe von HPLC. Nach Zentrifugation des Reaktionsproduktes über die in der 96 Well Platte entstandenen Kunstharzsäule und Zugabe von 20µl Formid wurde das nun aufgereinigte Reaktionsprodukt in den Sequencer übergeben.

Im Anschluss wurde das Produkt der Reaktion nach Herstellerempfehlung (Millipore) von nicht- inkorporierten ddNTPs getrennt. Danach wurde das Produkt nach den Anweisungen des Herstellers für die Acrylamid- Gel- Elektrophorese im ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer so präpariert, dass die Nukleotidfolge des Produktes bestimmt werden konnte.

2. 2. 3 Auswertung der Sequenzdaten

Die Sequenzierungsergebnisse des ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer wurden mit dem Sequence Navigator V 1.09 editiert und in der RIDOM- Datenbanken gesammelt. Die Region von Basenposition 54 bis 510 (entsprechend der 16S rDNA Sequenz von *E. coli*) wurden analysiert.

Zur Erstellung von „Alignements“ und zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Stämmen diente das Programm *MegAlign* von Lasergene (Version 3.11), ein Bestandteil des Lasergene Programms (DNASStar Inc., Madison, WI, USA).

Das Alignment der Sequenzen erfolgte mittels des CLUSTAL W Programms, mit dem überdies eine paarweise Distanzmatrix kalkuliert wird. Dieser Software liegt der Clustal Algorithmus nach der „Neighbour joining“- Methode von Saitou und Nei zugrunde.

2. 2. 4 GenBank- Sequenzevaluierung

Zur Qualitätskontrolle der öffentlich erhältlichen Sequenzen wurden die 16S rDNA-Sequenzeinträge von GenBank 5'-16S rDNA mit den Sequenzdaten der untersuchten Stämme verglichen. Dabei wurden jegliche Diskrepanzen im „Alignment“ der Sequenzen als Basenunterschiede gewertet.

Nachfolgend sind alle aus GenBank entnommenen Sequenzen aufgelistet, die zum einen mit den selbst sequenzierten Stämmen verglichen und zum anderen zur Vervollständigung des phylogenetischen Baumes verwendet wurden.

Name der Spezie (alles Typstränge)	Stammsammlungsnummer	GenBank accession number
<i>Clostridium acetireducens</i>	DSM 10703	X79862
<i>Clostridium aceticum</i>	DSM 1496	Y18183
<i>Clostridium acidurici</i>	DSM 604	M59084
<i>Clostridium akagii</i>	DSM 12554	AJ237755
<i>Clostridium amygdalinum</i>	DSM 12857	X34278
<i>Clostridium argentinense</i>	ATCC 27322	X68316
<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	DSM 793	X68183
<i>Clostridium boltae</i>	DSM 15670	AJ508452
<i>Clostridium bowmanii</i>	DSM 14206	AJ506119
<i>Clostridium botulinum</i>	DSM 1734	X71883
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 523	AF396963
<i>Clostridium celecrescens</i>	DSM 5628	X71856
<i>Clostridium cellobioparum</i>	DSM 1351	X71848
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	DSM 5812	X71847
<i>Clostridium cellulofermentans</i>	AS1.1777	L09177
<i>Clostridium chartatabidum</i>	DSM 5482	X71850
<i>Clostridium colicanis</i>	DSM 13634	AJ420008
<i>Clostridium diolis</i>	DSM 15410	AJ458418
<i>Clostridium disporicum</i>	DSM 5521	Y18176
<i>Clostridium formicaceticum</i>	DSM 92	X77836
<i>Clostridium frigoris</i>	DSM 14204	AJ506116
<i>Clostridium gasigenes</i>	DSM 12272	AF092548
<i>Clostridium glycolicum</i>	DSM 1288	X76750
<i>Clostridium herbivorans</i>	DSM 14428	L34418
<i>Clostridium hiranonis</i>	DSM 13275	AB023971
<i>Clostridium homoproprionicum</i>	DSM 5847	X76744
<i>Clostridium hungatei</i>	DSM 14427	AF020429
<i>Clostridium irregulare</i>	DSM 2635	X73447
<i>Clostridium josui</i>	FERMP-9684	AB011057
<i>Clostridium kluyveri</i>	DSM 555	M59092

<i>Clostridium lactusfryxellense</i>	DSM 14205	AJ506118
<i>Clostridium laramiense</i>	DSM 14864	AJ506115
<i>Clostridium leptum</i>	DSM 753	AJ305238
<i>Clostridium litorale</i>	DSM 5388	X77845
<i>Clostridium malenomilatum</i>	DSM 1127	M59099
<i>Clostridium magnum</i>	DSM 2767	X77835
<i>Clostridium novyi</i>	N 538	AB045606
<i>Clostridium oceanicum</i>	DSM 1290	M59101
<i>Clostridium oroticum</i>	DSM 1287	M59109
<i>Clostridium papyrisolvens</i>	DSM 7208	X71852
<i>Clostridium piliforme</i>	DSM 7515	L07416
<i>Clostridium proteoclasticum</i>	DSM 14932	U37378
<i>Clostridium psychrophilum</i>	DSM 14207	L59378
<i>Clostridium puniceum</i>	DSM 2619	X73444
<i>Clostridium ramosum</i>	DSM 1402	X73440
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	DSM 2544	Y18185
<i>Clostridium sardiniense</i>	DSM 2632	X73446
<i>Clostridium sartagoforme</i>	DSM 1292	Y18175
<i>Clostridium septicum</i>	DSM 7534	U59278
<i>Clostridium sphenoides</i>	DSM 632	X73449
<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM 1290	X66002
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	DSM 1294	M59103
<i>Clostridium stercorarium</i> ssp <i>leptospartum</i>	DSM 9219	AF266461
<i>Clostridium stercorarium</i> ssp. <i>stercorarium</i>	DMS 8532	AJ310082
<i>Clostridium stercorarium</i> subsp. <i>thermolacticum</i>	DSM 2911	AF256439
<i>Clostridium sticklandii</i>	DSM 519	L04167
<i>Clostridium tetani</i>	ATCC 9406	X74770
<i>Clostridium thermoalcaliphilum</i>	DSM 7309	L11304
<i>Clostridium thermocellum</i>	DSM 1237	L09173
<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	DSM 13105	AY024332
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	DSM 5807	Y18180
<i>Clostridium uliginosum</i>	DSM 12992	AJ276992
<i>Clostridium ultunense</i>	DSM 10521	Z69293

Tabelle 3: Verzeichnis aus GenBank entnommener Sequenzen der *Clostridium* -Typstämme

2. 2. 5 Datensammlung für das RIDOM- Projekt

Die Auswahl der Mikroorganismen für die RIDOM- Datenbank orientierte sich an der Liste der „Bacterial Nomenclature up-to-date“ der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Alle dort aufgeführten Taxa sind durch ihre Veröffentlichung im „International Journal of Systematic and Evolutionary

Microbiology“ validiert. Gültige Taxa wurden zusammen mit ihren Synonymen eingetragen. Neben den Sequenzen enthält die Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen.

Die Beschreibung jedes einzelnen Taxons behandelt makro- und mikroskopische Morphologie, Physiologie, differentialdiagnostische Kriterien, Pathogenität und Verbreitung des Mikroorganismus.

2. 2. 6 Literaturrecherche

Für das RIDOM- Projekt relevante Literaturangaben wurden mit dem Programm *Bibliographix Pro* Version 4 editiert und verwaltet.

Ergebnisse

3. 1 Vergleichende Sequenzanalyse

Zur Erstellung einer Referenz- Sequenzdatenbank wurde von 86 Spezies des Genus *Clostridium* eine 5'- 16S rDNA- Analyse durchgeführt.

Nach DNA- Extraktion dieser 86 Typstämme, 5'- 16S rDNA- PCR und erfolgreicher Sequenzierung konnte von jedem Stamm ein 419 (*Clostridium bifermentans*) bis 468 bp (*Clostridium innocuum*) langer Sequenzabschnitt untersucht werden (*E. coli* Position 54- 510). Die Sequenzen von weiteren 63 *Clostridium*- Spezies sind GenBank entnommen und auf Längen gekürzt worden, die durch die Start- und Endsequenzen der selbst sequenzierten Keime definiert sind. Damit sind alle Spezies des Genus *Clostridium* gemäß der DSMZ- Liste vom Monat Oktober 2004 in die vorliegende Arbeit aufgenommen.

Mittels Clustal- Alignment wurde von den Sequenzen aller Stämme eine 5'- 16S rDNA- Phylogenie erstellt. Ein phylogenetischer Baum wurde mit der Neighbor- joining- Methode von Saitou und Nei (63) erstellt.

Von den insgesamt 149 Typstämmen konnten zunächst nur 142 eindeutig auf Speziesniveau unterschieden werden. Gleiche Sequenzen hatten *Clostridium sporogenes* (DSM 1734, ehemals *Clostridium putrificum*), *Clostridium sporogenes* (DSM 795) und *Clostridium botulinum* (ATCC 25763). Basierend auf DNA- DNA- Hybridisierung schlossen Olsen *et al.* (53), dass *Clostridium putrificum* (Trevisan 1889) Reddish und Rettger 1922, *Clostridium botulinum* (van Ermengem 1896) Bergey, Harrison, Breed, Hammer und Huntoon 1923 und *Clostridium sporogenes* (Mechnikoff 1908) Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon 1923 genetisch verwandt auf Speziesebene sind. Daher beschloss die „Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology“ in der „Opinion 69“ (35) den Name *Clostridium putrificum* zurückzuweisen, während *Clostridium botulinum* für toxische Stränge und *Clostridium sporogenes* für nicht- toxische Stränge verwendet werden soll. Weitere Ausnahmen sind *Clostridium estertheticum* (DSM 14864) und *Clostridium laramiense* (DSM 8809), die jeweils eine identische 5'- 16S rDNA- Sequenz besitzen. Spring *et al.* (69) gruppieren die beiden Spezies jedoch neu ein, so dass aus *Clostridium estertheticum* *Clostridium estertheticum* ssp. *estertheticum* und aus

Clostridium laramiense *Clostridium etsertheticum* ssp. *laramiense* wurde. Somit ist eine Differenzierung in diesem Fall auf Subspezies- Ebene mit der partiellen 16S rDNA- Sequenzierung nicht möglich.

Weitere Ausnahmen sind *Clostridium sardiniense* (DSM 2632) und *Clostridium absonum* (DSM 599), die eine identische 5'- 16S rDNA- Sequenz besitzen. Eine von Wang 2005 (80) veröffentlichte Analyse der 16S rRNA und der Phospholipase C sowie eine DNA- DNA- Hybridisierung zeigte eine so große Ähnlichkeit der beiden Spezies miteinander, dass er vorschlug beide Spezies als heterotype Synonyme zu klassifizieren, wobei der Name *Clostridium sardiniense* Priorität habe.

Letztlich konnten also alle Typstämme auf Speziesebene eindeutig unterschieden werden.

3. 2 Analyse der 5'- 16S rDNA

Aus den eigenen Sequenzen und den aus GenBank entnommenen ließ sich folgender phylogenetischer Baum erstellen:

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Typstämme des Genus *Clostridium* anhand von partiellen 16S rDNA-Sequenzen



3. 3 GenBank Sequenzevaluierung

Die 86 selbst sequenzierten Stämme wurden am 11. Oktober 2004 zur Qualitätskontrolle über eine BLAST- Suche mit den Einträgen von GenBank verglichen.

Von den selbst sequenzierten Clostridien- Stämmen wurden 33 % (n=28) von GenBank (BLAST- Suche) mit der Höchstpunktzahl und einer 100 %igen Übereinstimmung richtig erkannt (Kategorie 1). 48 % (n=41) der Spezies wurden mit Höchstpunktzahl richtig erkannt, jedoch nicht mit 100 %iger Übereinstimmung. *Clostridium propionicum* (DSM 1682) mit 97 % Übereinstimmung und *Clostridium lentocellum* mit 96 % Übereinstimmung (Kategorie 2). Falsch erkannt, so dass eine andere Spezies die Höchstpunktzahl erlangte, gab es in 9 % (n=8) der Fälle, obwohl die eigentlich richtigen Spezies in der Datenbank enthalten waren (Kategorie 3). Die besten Resultate waren eine Mischung aus alternativen Spezies oder uncharakterisierten Strängen, während die wirkliche Spezies meist weiter unten in der Liste zu finden war. Nicht in der Datenbank vorhanden war *Clostridium isatidis* DSM 15098 (Kategorie 4), d. h. 1 %. Nicht eindeutig wurden 9 % (n=8) Spezies erkannt, so dass bei der Anfrage mehrere Spezies mit der Höchstpunktzahl und gleich hoher Ähnlichkeit angezeigt wurden (Kategorie 5). Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse im Einzelnen an.

Genus	Spezie	DSM
Kategorie 1 (100%ige Übereinstimmung)		
<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	792
<i>Clostridium</i>	<i>algidicarnis</i>	15099
<i>Clostridium</i>	<i>chauvoei</i>	7528
<i>Clostridium</i>	<i>clostridioforme</i>	933
<i>Clostridium</i>	<i>cocleatum</i>	1551
<i>Clostridium</i>	<i>collagenovorans</i>	3089
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	1296
<i>Clostridium</i>	<i>estertheticum</i> ssp <i>estertheticum</i>	8809
<i>Clostridium</i>	<i>fallax</i>	2631
<i>Clostridium</i>	<i>fimetarium</i>	9179
<i>Clostridium</i>	<i>halophilum</i>	5387
<i>Clostridium</i>	<i>indolis</i>	755
<i>Clostridium</i>	<i>intestinale</i>	6191
<i>Clostridium</i>	<i>magenotii</i>	1289

<i>Clostridium</i>	<i>methylpentosum</i>	5476
<i>Clostridium</i>	<i>nexile</i>	1787
<i>Clostridium</i>	<i>paraputrificum</i>	2630
<i>Clostridium</i>	<i>pasteurianum</i>	525
<i>Clostridium</i>	<i>putrefaciens</i>	1291
<i>Clostridium</i>	<i>roseum</i>	7320
<i>Clostridium</i>	<i>sporogenes</i>	1734
<i>Clostridium</i>	<i>subterminale</i>	6970
<i>Clostridium</i>	<i>tyrobutyricum</i>	2637
<i>Clostridium</i>	<i>vincentii</i>	10228
<i>Clostridium</i>	<i>viride</i>	6836
<i>Clostridium</i>	<i>xylanolyticum</i>	6555
<i>Clostridium</i>	<i>xylanovorans</i>	12503
Kategorie 2 (Übereinstimmung <100%)		
<i>Clostridium</i>	<i>acidisoli</i>	12555
<i>Clostridium</i>	<i>aerotolerans</i>	5434
<i>Clostridium</i>	<i>algidixylanolyticum</i>	12273
<i>Clostridium</i>	<i>aldrichii</i>	6159
<i>Clostridium</i>	<i>aminovalericum</i>	1283
<i>Clostridium</i>	<i>aminophilum</i>	10710
<i>Clostridium</i>	<i>baratii</i>	601
<i>Clostridium</i>	<i>bifermentans</i>	14991
<i>Clostridium</i>	<i>cadaveris</i>	1284
<i>Clostridium</i>	<i>carnis</i>	1293
<i>Clostridium</i>	<i>cellulovorans</i>	3052
<i>Clostridium</i>	<i>cochlearium</i>	1285
<i>Clostridium</i>	<i>colinum</i>	6011
<i>Clostridium</i>	<i>cylindrosporum</i>	605
<i>Clostridium</i>	<i>frigidicarnis</i>	12271
<i>Clostridium</i>	<i>ghonii</i>	15049
<i>Clostridium</i>	<i>grantii</i>	8605
<i>Clostridium</i>	<i>hatheway</i>	13479
<i>Clostridium</i>	<i>hastiforme</i>	5675
<i>Clostridium</i>	<i>histolyticum</i>	2158
<i>Clostridium</i>	<i>hylemonae</i>	15053
<i>Clostridium</i>	<i>innocuum</i>	1286
<i>Clostridium</i>	<i>lactatifermentans</i>	14214
<i>Clostridium</i>	<i>lentocellum</i>	5427
<i>Clostridium</i>	<i>lituseburense</i>	797
<i>Clostridium</i>	<i>limosum</i>	1400
<i>Clostridium</i>	<i>neopropionicum</i>	3847

<i>Clostridium</i>	<i>pascui</i>	10365
<i>Clostridium</i>	<i>polysaccharolyticum</i>	1801
<i>Clostridium</i>	<i>populeti</i>	5832
<i>Clostridium</i>	<i>propionicum</i>	1682
<i>Clostridium</i>	<i>proteolyticum</i>	3090
<i>Clostridium</i>	<i>purinilyticum</i>	1384
<i>Clostridium</i>	<i>quinii</i>	6736
<i>Clostridium</i>	<i>rectum</i>	1295
<i>Clostridium</i>	<i>scindens</i>	5676
<i>Clostridium</i>	<i>sordellii</i>	2141
<i>Clostridium</i>	<i>symbiosum</i>	934
<i>Clostridium</i>	<i>tetanomorphum</i>	4474
<i>Clostridium</i>	<i>termitidis</i>	5398
<i>Clostridium</i>	<i>tertium</i>	2485
Kategorie 3 (Falsch identifiziert)		
<i>Clostridium</i>	<i>celatum</i>	1785
<i>Clostridium</i>	<i>coccoides</i>	935
<i>Clostridium</i>	<i>felsineum</i>	794
<i>Clostridium</i>	<i>ljungdahlii</i>	13528
<i>Clostridium</i>	<i>mayombei</i>	6539
<i>Clostridium</i>	<i>peptidivorans</i>	12505
<i>Clostridium</i>	<i>spiroforme</i>	1552
<i>Clostridium</i>	<i>thermopalmarium</i>	5974
Kategorie 4 (Nicht in Datenbank enthalten)		
<i>Clostridium</i>	<i>isatidis</i>	15098
Kategorie 5 (Nicht eindeutig identifiziert)		
<i>Clostridium</i>	<i>absonum</i>	599
<i>Clostridium</i>	<i>haemolyticum</i>	5565
<i>Clostridium</i>	<i>methoxybenzovorans</i>	12182
<i>Clostridium</i>	<i>orbiscindens</i>	6740
<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	756
<i>Clostridium</i>	<i>saccharobutylicum</i>	13864
<i>Clostridium</i>	<i>saccharoperbutylaceticum</i>	14923
<i>Clostridium</i>	<i>scatalogenes</i>	757

Tabelle 3: Ergebnisse der Evaluierung der selbst sequenzierten 16S rDNA gegen GenBank

In Gruppe eins sind die Typstämme, die mit 100 %iger Übereinstimmung in GenBank gefunden werden konnten, enthalten.

In Gruppe zwei wurde zwar *Clostridium lentocellum* richtig erkannt. Jedoch nur mit einer Übereinstimmung von 96 %, so dass der Benutzer von GenBank wahrscheinlich nicht von einer richtigen Identifikation der Spezies ausgegangen wäre.

In der dritten Gruppe wurde *Clostridium celatum* (DSM 1785) als nicht kultiviertes *Eubacterium* identifiziert. *Clostridium coccooides* (DSM 935) wurde als *Clostridium*-Spezie mit 100 %iger Übereinstimmung identifiziert. *Clostridium ljunghalii* (DSM 13528) wurde als *Clostridium autoethanogenum* erkannt mit zwei Basenpaaren Unterschied. Erst an zweiter Stelle mit drei Basenpaaren Unterschied wurde *Clostridium ljunghalii* angegeben. *Clostridium mayombei* (DSM 6539) wurde als *Clostridium glycolicum* erkannt mit vier Basenpaaren Unterschied zur eigenen Sequenz. Bei *Clostridium peptidovorans* (DSM 12505) war das Suchergebnis *Clostridium* Spezies 45. Bei *Clostridium propionicum* war das Suchergebnis mit den sieben Basen Unterschied *Clostridium neopropionicum*. Die Sucheingabe bei *Clostridium thermopalmarium* (DSM 5974) ergab mit 100% iger Übereinstimmung eine nicht näher bestimmte *Clostridium* Spezies. Erst mit einem Basenpaar Unterschied folgten dann *Clostridium thermobutyricum* und *Clostridium thermopalmarium*.

In der Gruppe vier gab es für *Clostridium isatidis* keinen GenBank- Eintrag.

In der Gruppe fünf gab es bei *Clostridium absonum* drei Suchergebnisse mit 100 %iger Übereinstimmung: *Clostridium absonum* (DSM 599), *Clostridium sardiniense* (DSM 2632) und *Clostridium baratii* (DSM 601). In der eigenen Sequenzanalyse waren die Sequenzen von *Clostridium absonum* (DSM 599) und *Clostridium sardiniense* (GenBank entnommen) identisch. *Clostridium absonum*, bzw. *Clostridium sardiniense* und *Clostridium baratii* besaßen zwar sehr ähnliche Sequenzen, waren jedoch eindeutig in der eigenen Sequenzanalyse voneinander unterscheidbar. Wang *et al.* zeigten 2005 (80), dass *Clostridium sardiniense* (DSM 2632) und *Clostridium absonum* (DSM 599) heterotype Synonyme sind mit Priorität des Namens *Clostridium sardiniense*. *Clostridium haemolyticum* wurde nicht eindeutig identifiziert: ebenfalls mit 100 %iger Übereinstimmung ergab die Anfrage *Clostridium novyi*. Sasaki *et al.* vermuteten 2002 (64), dass *Clostridium novyi* Typ B und C und *Clostridium haemolyticum* eine Spezies seien. Bei *Clostridium methoxybenzovorans* ergab sich ein nicht eindeutiges Ergebnis: sowohl *Clostridium methoxybenzovorans* als auch *Clostridium indolis* mit jeweils zwei Basenpaaren Unterschied waren als Suchergebnis angegeben. *Clostridium orbiscindens*

(DSM 6740) wurde als nicht kultiviertes Schweinebakterium erkannt. *Clostridium perfringens* (DSM 756) wurde als nicht kultivierte *Clostridium* Spezies identifiziert. Bei *Clostridium saccharobutylicum* (DSM 13864) war das Suchergebnis nicht eindeutig. Zusätzlich zu *Clostridium saccharobutylicum* gab es mehrere nicht weiter charakterisierte *Clostridium* Spezies mit ebenfalls 100 % Übereinstimmung. Das selbe Problem ergab sich mit *Clostridium saccharoperbutylicum* (DSM 14932) und *Clostridium scatologenes* (DSM 757).

Diskussion

4. 1 Allgemeines über die 16S rDNA- Gensequenzanalyse

Mit Entwicklung von *in vitro* Amplifikationstechniken mussten die Koch'schen Postulate, die u. a. eine Isolierung und Anzucht des Erregers in Reinkultur vorsahen um eine Infektion nachzuweisen, neu bewertet und erweitert werden. Die 1996 veröffentlichten Richtlinien von Fredricks und Relman für den molekularbiologischen Nachweis einer Infektionserkrankung (26) sehen daher auch eine Anzucht von Erregern nicht mehr zwingend vor, sondern verknüpfen den Nachweis von Nukleinsäuren mit dem Beweis von Infektion. Schon zu dieser Zeit wusste man aus Untersuchungen vieler Ökosysteme aus Erde und Wasser, dass mehr als 99 % der Mikroorganismen sich nicht unter Laborbedingungen kultivieren lassen (5). Auch unter den Mikroorganismen, die den menschlichen Körper besiedeln, gibt es eine Vielzahl bis jetzt nicht kultivierbarer Mikroorganismen (60, 61). In den letzten 15 Jahren konnte durch molekulare Identifizierung eine Assoziation zwischen mikrobiellem Pathogen und spezifischer Krankheit aufgedeckt werden, so z. B. bei der Whipple Krankheit (*Tropheryma whippelii*) (82) oder bazilläre Angiomatose (*Bartonella henselae*). Immer mehr Autoren zeigen, dass durch konventionelle Methoden nicht kultivierbare oder nicht identifizierbare Keime durch die 16S rDNA- Sequenzierung erkannt werden können (22, 67). Insgesamt ist die 16S rDNA- Sequenzierung eine der genauesten analytischen Methoden mit der höchsten Reproduzierbarkeit und als neuer „Gold- Standard“ (21, 45, 85) für die Identifikation von Mikroorganismen eingestuft worden.

Einen weiteren Schritt zur klinischen Anwendung der Gensequenzierung brachte die Erkenntnis, dass die partielle Analyse von 527 Basenpaaren der 16S rDNA aus diagnostischer Sicht annähernd gleich aussagekräftig ist, wie die Analyse des gesamten Gens (74). Die Qualität der partiellen 16S rDNA- Sequenzierung wurde u.a. an *Mycobakterien* (29) und *Nokardien* (50) untersucht und als ein akurates, schnelles und nützliches diagnostisches Werkzeug bewertet. Gemessen an den Kosten und am Zeitaufwand für das durchführende Personal wäre die komplette Gensequenzierung ein zu aufwendiger Standard für die klinische Routine.

4. 2 Probleme der 16S- rDNA- Sequenzierung und öffentlicher Datenbanken

Im Konzept der 16S rDNA- Sequenzierung nehmen Referenzdatenbanken eine wichtige Position ein. Öffentliche Datenbanken, wie beispielsweise die GenBank der NCBI (8), oder spezialisierte Datenbanken, wie das „Ribosomal Database Project“ (15) oder die „Database on the structure of small ribosomal subunit RNA“ (76) können die notwendige Referenzfunktion nur bedingt wahrnehmen. Die Genauigkeit, mit der 16S rDNA- Sequenzen in GenBank oder anderen Datenbanken platziert werden, hängt davon ab, wie intensiv die Bakterienstämme charakterisiert worden sind (33). Sequenzen öffentlicher Datenbanken entstammen den unterschiedlichsten Regionen der rDNA und entsprechen keinen einheitlichen Qualitätsstandards. Eine Vergleichbarkeit der Isolate dieser Sequenzen ist damit nicht oder nur begrenzt möglich. So berichten Song *et al.* (67), dass ein Großteil der Suchergebnisse gegen GenBank bei Gram-positiven anaeroben Kokken inakkurat war aufgrund von inkonsistenten Sequenzenden, nicht charakterisierten oder nicht eindeutigen Einträgen, Pseudolücken und Insertionen. Den Grund sehen Song *et al.* darin, dass die Mehrheit der Sequenzen bei GenBank aus den frühen neunziger Jahren stammten, als die Technologie der ribosomalen Sequenzierung noch nicht so ausgereift war. Daher können Ergebnisse von 98 oder 99 % Ähnlichkeit entweder an einer identischen Sequenz mit schlechter Qualität oder an der Divergenz zweier Spezies liegen (75). Ebenfalls sind Spezies, deren Herkunft mangelhaft dokumentiert worden sind oder die nicht in einem Journal erschienen sind, als Referenz ungeeignet, da sie sich nicht im Einklang mit der aktuell gültigen Nomenklatur befinden (75). Sequenzheterogenitäten in der Literatur können deshalb auch aus Missidentifikationen resultieren (33).

Auch die Suchprogramme wie BLAST und RDP II sind problembehaftet. Es ergaben sich unterschiedliche Suchresultate bei GenBank, wenn die selbe Sequenz von unterschiedlichen Programmen verglichen wurde. Der Grund liegt zum einen in der Tatsache, dass BLAST alle verfügbaren Sequenzen durchsucht, RDP-II jedoch nur ausgesuchte GenBank- Sequenzen inkorporiert und dann die eigene Datenbank durchsucht. Auch das Punktwertesystem o. g. Datenbanken führt zu Problemen. Denn die Gleichheitspunkte, die erreicht werden bei der Suche, sind abhängig von der Länge der untersuchten Sequenz und von der Anzahl an Lücken, die in der Suchanfrage eingefügt werden, um die Ähnlichkeit zu optimieren. (67) Dies kann zu

Fehlidentifizierung führen, denn selbst wenn die Sequenz richtig ist, kann ein besseres Punkteergebnis einer Sequenz mit 99 % Ähnlichkeit gegeben werden, wenn die Sequenz mit 100 % Ähnlichkeit eine höhere Anzahl an Basen besitzt. Manchmal sind die Speziesnamen nicht im Titel angezeigt, sondern stehen bei den entsprechenden Referenzen, was den Nutzer zur nächst besser passenden, gut etablierten Spezies führen könnte (75).

Die hohe Anzahl an irreführenden Ergebnissen in öffentlichen Datenbanken ist somit nicht überraschend. Turenne *et al.* (75) gehen so weit zu sagen, dass Suchergebnisse vergleichender Sequenzanalysen in öffentlichen Datenbanken den Benutzer signifikant von der wahren Identifikation eines Organismus abhalten können, selbst wenn der Organismus in der Datenbank enthalten ist. Song *et al.* (67) kommen zu dem Schluss, dass weitere Anstrengungen unternommen werden sollten eine qualitativ hochwertige Datenbank zu erzeugen.

4. 3 Kosten des Verfahrens

Die oft erwähnten hohen Kosten für genotypische Verfahren sinken (21). Nach hohen Einstiegskosten für die Gerätschaften können die eigentlichen Sequenzierungskosten minimiert werden durch die Möglichkeit eines hohen Umsatzes und kostengünstiger Gebrauchsartikel. Durch Technische Fortschritte z. B. im Rahmen von Genomsequenzierungsprojekten werden auch zukünftig weitere Kostenreduktionen erzielt werden können. Für Nicht- Tuberkulose *Mycobakterien* ist die genotypische Analyse bereits günstiger als konventionelle Methoden (18).

4. 4 Das RIDOM- Projekt

Die Beschaffenheit der öffentlichen Datenbanken machte es daher notwendig, eine eigene Sequenzdatenbank zur „Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms“ (RIDOM) aufzubauen (30, 31). Die ribosomalen Sequenzen dieser Datenbank sind in ihrer Länge, Anfangs- und Endposition einheitlich genormt und entsprechen einem einheitlichen Qualitätsstandard. Ziel der RIDOM- Datenbank ist eine möglichst vollständige Sequenzsammlung aller medizinisch relevanten Mikroorganismen. Bei der Auswahl der Organismen wird- soweit dort verfügbar- nur auf Isolate öffentlicher Stammsammlungen, die entsprechend der aktuell gültigen Nomenklatur ausgewählt

werden, zurückgegriffen. Obwohl molekularbiologische Identifizierungen alleine meist ausreichend sind, können im Zweifelsfall biochemische Schlüsseltests nötig sein, um genotypisch identische Spezies zu differenzieren. (75). Daher enthält die RIDOM-Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen. Durch die Einbindung der Datenbank in das Internet stehen dem Besucher auch Ressourcen anderer Datenbanken zur Verfügung. Durch die ausschließliche Benutzung von Typsträngen in RIDOM werden mögliche Fehler in Bezug auf initiale Strangmissidentifizierung eliminiert (75).

4. 5 Microseq 500

Aus ähnlichen Erwägungen entstand etwa zur gleichen Zeit das Microseq 500 16S rDNA Bacterial Identification System (54). Die kommerziell erhältliche Sequenzdatenbank (Applied Biosystems) beinhaltet exakt genormte, qualitativ hochwertige, ribosomale 16S- Sequenzen von ATCC Stammsammlungsisolaten und ist hierin dem RIDOM- Projekt gleichzustellen. Während sich der Datenbestand des RIDOM- Projekts noch im Aufbau befindet, enthält MicroSeq 500 bereits die Sequenzen von über 1000 Mikroorganismen. Für die Differenzierung einer Reihe von Bakterien wird das MicroSeq- System bereits für geeignet (28, 54, 78) und bei den Mykobakterien GenBank überlegen angesehen (75). Die Datenbank Microseq 500 ist ein alleinstehendes, proprietäres System ohne Anbindung an das Internet und ohne weiterführende Informationen im mikrobiellen oder medizinischen Kontext.

4. 6 Alternativen zur 16S- rDNA Gensequenzierung

Nach Ludwig et al (45) sollten alternative Markermoleküle einige Bedingungen erfüllen: weite Verbreitung, funktionelle Konstanz, genetische Stabilität und eine angemessene Anzahl sich unabhängig entwickelnder Positionen oder Regionen. Vergleichsanalysen von Genomsequenzen zeigen, dass die Mehrheit der Gene nicht ubiquitär vorhanden sind. Daher ist die Anzahl potentieller phylogentischer Marker begrenzt. Datensätze, die Repräsentanten von zumindest der Mehrheit bakterieller Phyla einschließen, liegen für die 23S rRNA, die RNA- Polymerase, den Elongationsfaktor Tu, die F₁F₀ ATPase beta- Untereinheit, das RecA Protein und das HSP60 Hitze-Schockprotein vor. Im allgemeinen stützen die phylogenetischen Bäume dieser Marker

die Ergebnisse der 16S rRNA (45). Allerdings scheinen einige Phyla nicht monophylitisch innerhalb dieser Markerbäume zu sein, was am ehesten den reduzierten Informationsgehalt und das verminderte Auflösungsvermögen dieser Marker zeigt (45). Außerdem gibt es Anzeichen sowohl für frühere als auch vermehrte neuere Genduplikationen. Ändern sich die Funktionen der verschiedenen Genkopien oder gehen die Funktionen in verschiedenen Organismen verloren, erschwert das die Ergebnisinterpretation. Ein zusätzliches Problem stellt der laterale Gentransfer dar, der auch bei solch stabilen Markern wie der rRNA nicht mit Sicherheit auszuschließen ist, der aber bei den Alternativmarkern sicherlich wesentlich häufiger auftritt (45). Ein ubiquitärer Marker mit ähnlichem Informationsgehalt wie die 16S rDNA ist zur Zeit also nicht in Sicht.

4. 7 Alternative Marker bei *Clostridien*

Alternative Marker bei Clostridien sind z. B. die intergenic spacer region, die zur Subtypisierung von *Clostridium difficile* benutzt werden kann (10). Ebenfalls konnten eine Anzahl von Clostridien mit Hilfe des Flagellin Gens (*fliC*) unterschieden werden (64). Dieses Gen besitzt am C- terminalen als auch am N- terminalen Ende gut konservierte Regionen und eine variable Region in der Mitte. Als alternatives Ziel zur Unterscheidung von Clostridien beschrieben ebenfalls Sasaki *et al.* die 16S- 23S rDNA spacer region (65).

4. 8 Fehlerquellen

4. 8. 1 Methodenspezifische Fehlerquellen

Durch die hohe Sensitivität der PCR Methode muss auf die Vermeidung von Kontaminationen besonderer Wert gelegt werden. Im klinischen Alltag sollten broad-range PCR- Amplifikate nur von Proben gemacht werden, die als primär steril betrachtet werden können, z.B. Blut, Liquor (51). Desweiteren können Kontaminationsprobleme bei der Abnahme von Proben mit sterilen, aber nicht DNA freien Materialien und der Verarbeitung der Proben entstehen (51). So konnte unter anderem von verschiedenen Autoren die Anwesenheit von kontaminierender DNA in Blutkultursystemen nachgewiesen werden (51).

4. 8. 2 Fehler bei der DNA- Extraktion und der PCR- Amplifikation

Kontaminationen können grundsätzlich mit jeder Zugabe eines Reagenz bei der DNA-Extraktion und der PCR- Amplifikation auftreten (38). So können PCR- Reagenzien bereits bei ihrer Herstellung mit bakterieller DNA kontaminiert sein (49). Millar *et al.* haben Hauptbereiche bei der DNA- Extraktion ausgemacht, an denen durch Verbrauchsprodukte Kontaminationen auftreten können: (I) lytische Enzyme (II) Oligonucleotidprimer, (III) *Taq*- Polymerase (55) und (IV) Wasser. Um Kontaminationen zu vermeiden wird empfohlen die DNA- Extraktion, den Master- Mix und die post-PCR- Vorgänge sowohl räumlich als auch instrumentell voneinander zu trennen (51). Es sollten zusätzlich Kontrollen in den Untersuchungsprozess mit einbezogen werden (27). Zahlreiche Moleküle sind identifiziert worden, die eine PCR-Reaktion stören, wie Häm (39), Heparin (32), EDTA, Polyamidverbindungen (27) und damit falsch negative Ergebnisse vortäuschen (3, 79). Qian *et al.* (57) konnten jedoch auch zeigen, dass durch den Zusatz von 0,5% BSA (Bovine Serum Albumine) zum PCR- Ansatz PCR- Inhibitoren im BacTec 2940 Blutkultur System deutlich vermindert werden konnten (39). Zusätzlich können sich aus den Zuätzen bei der PCR molekulare Artefakte bilden, z. B. Chimärenmoleküle, Mutationen oder Heteroduplexe, welche dann falsche Ergebnisse widerspiegeln können (58, 79). Ein hoher Prozentsatz (bis zu 30 %) an chimären Molekülen kann auch bei Verwendung gemischter Kulturen auftreten (78). Die genaue Untersuchung von Elektropherogrammen bei modernen automatisierten Sequenzierungen jedoch sollte solche mehrdeutige Peaks entdecken, die durch Amplifikationen multipler Targets entstanden sind (37). Es sind verschiedene Verfahren beschrieben worden, um eventuelle Kontaminationen (49, 62) oder PCR-Inhibitoren (27) aus dem Ansatz zu eliminieren.

4. 9 Probleme bei der Grenzwertbestimmung

Bei der Speziesidentifizierung ergibt sich die Frage, ab welchem Prozentwert bei nicht 100 %iger Gleichheit man von ein und der selben Spezies und ab wann man von zwei unterschiedlichen Spezies ausgehen kann. Stackebrandt *et al.* (70) schlugen den Wert von 97 % vor. Nach Harmsen *et al.* wird ein solcher Grenzwert immer künstlich bleiben (29). Dieser müsste für jedes Genus separat bestimmt werden. Paarweise Distanzwerte

sind für jedes Genus unterschiedlich normalverteilt und selbst bei nahe verwandten Genera wie *Mycobakterien* und *Nocardien* (50) doch deutlich unterschiedlich. In den Fällen, die also diese 97 % Grenze unterschreiten, kann man keine zuverlässige Prognose über Zugehörigkeit oder Neuartigkeit machen. Über diesem Schwellenwert jedoch sinkt die Wahrscheinlichkeit einer neuen Spezies, besonders dann wenn der Wert sich der Marke 100 % nähert (29). Dieser Wert wird daher meist zu diagnostischen Zwecken benutzt. Wenn nicht dieses Ähnlichkeitslevel eins zu eins auch auf partielle Analysen übertragen wurde, bediente man sich empirischer Erfahrungen (54) zur Schwellenwertdefinition. Zur Etablierung neuer Spezies wird daher ein polyphasischer Zugang empfohlen (71, 77), der phänotypische und genotypische Verfahren miteinander kombiniert.

4. 10 Grenzen der Methode

Zum einen ist die diskriminatorische Schärfe der rDNA- Sequenzierung auf Subspeziesebene meist nicht groß genug. Zum anderen limitieren intragenomische Sequenzheterogenitäten auch das phylogenetische Auflösungsvermögen des 16S rRNA Gens (14, 19). In den Strukturgenen der rRNA wurden Mikroheterogenitäten bereits von verschiedenen Autoren (11, 12, 68) bei anderen Genera berichtet. Das Molekül kann auch keine kürzlichen evolutionären Ereignisse widerspiegeln (25), da eine einzelne Basenveränderung auf dem 16S rRNA Molekül nur eine Periode von ein bis zwei Millionen Jahren abbilden kann (45).

4. 11 Evaluierung gegen GenBank

Zur Evaluierung der Qualität der GenBank- Sequenzen wurden die 5'-16S rDNA- Abschnitte der Clostridien, die im Rahmen dieser Arbeit sequenziert worden waren, mit den Sequenzeinträgen identischer Stämme der GenBank verglichen. Von den selbst sequenzierten Clostridien- Stämmen wurden ein Drittel der Stämme (n=28) von GenBank (BLAST- Suche) mit der Höchstpunktzahl und einer 100 %igen Übereinstimmung richtig erkannt (Kategorie 1). Knapp die Hälfte (n=41) der Spezies wurden mit Höchstpunktzahl richtig erkannt, jedoch nicht mit 100 %iger Übereinstimmung. Auffällig war *Clostridium lentocellum* mit nur 96 % Übereinstimmung (Kategorie 2), so dass man als Anwender der GenBank- Datenbank

von einer anderen Spezies als Untersuchungsergebnis ausgehen und damit weitere Tests anschließen würde. Insgesamt aber wäre der Anwender in dieser Kategorie trotz nicht 100 %iger Übereinstimmung zum richtigen Ergebnis gekommen. Falsch erkannt, so dass eine andere Spezies die Höchstpunktzahl erlangte, gab es in 9 % (n=8) der Fälle, obwohl die eigentlich richtige Spezies in der Datenbank enthalten war (Kategorie 3). Die besten Resultate waren eine Mischung aus alternativen Spezies oder uncharakterisierten Strängen, während die wirkliche Spezies meist weiter unten in der Liste zu finden war. Nicht in der Datenbank vorhanden war *Clostridium isatidis* DSM 15098 (Kategorie 4), d. h. 1 %. Nicht eindeutig wurden 9 % (n=8) Spezies erkannt, so dass bei der Anfrage mehrere Spezies mit der Höchstpunktzahl und gleich hoher Ähnlichkeit angezeigt wurden (Kategorie 5). Zu erwähnen ist, dass die Nomenklatur in der BLAST- Ergebnisanzeige nicht dem aktuellen Stand entspricht. So wird z. B. bei *Clostridium hastiforme* als Suchergebnis *Tissierella praeacuta* angegeben. Dieses zunächst als nicht richtig anmutende Ergebnis erweist sich erst bei Recherche in der Literatur als richtig: Bae *et al.* (6) zeigten 2004, dass es sich bei *Clostridium hastiforme* und *Tissierella praeacuta* um die selbe Spezies handelt mit Priorität des Namens *Tissierella praeacuta*. Insgesamt wurde daher von GenBank ca. ein Fünftel (18 %) der selbst sequenzierten Clostridien nicht oder nicht eindeutig erkannt.

4.12 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit bisherigen Studien zum Genus *Clostridium*

Alle selbst sequenzierten *Clostridium* Spezies und die aus GenBank entnommenen können mit der 16S rDNA- Sequenzierung auf Speziesebene unterschieden werden. Ausnahmen sind *Clostridium sardiniense* (DSM 2632) und *Clostridium absonum* (DSM 599), die eine identische 5'- 16S rDNA- Sequenz besitzen. Eine von Wang 2005 (80) veröffentlichte Analyse der 16S rRNA und der Phospholipase C sowie eine DNA-DNA- Hybridisierung zeigte eine so große Ähnlichkeit der beiden Spezies miteinander, dass er vorschlug beide Spezies unter dem Namen *Clostridium sardiniense* zusammenzufassen.

Ebenfalls besitzen *Clostridium estertheticum* DSM 14864 und *Clostridium laramiense* DSM 8809 jeweils eine identische 5'- 16S rDNA- Sequenz. Durch eine Arbeit von Spring *et al* 2003 (69) wurden beide Spezies jedoch neu eingruppiert: *Clostridium estertheticum* zu *Clostridium estertheticum* subsp. *esertheticum* und *Clostridium*

laramiense zu *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense*. Somit ist eine Unterscheidung dieser beiden Subspezies mit der partiellen 16S rDNA- Analyse in dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Die Mehrzahl der Arbeiten über Clostridien beinhalten meistens Ausschnitte des Genus. Häufig werden Repräsentanten einer bestimmten Gruppe innerhalb des Genus als Vergleichspunkt genutzt. 1995 erstellten Collins *et al.* (16) die bisher umfangreichste Arbeit von kompletten 16S rDNA- Sequenzen über das Genus *Clostridium*. Das Genus wurde anhand phänotypischer und genotypischer Charakteristika in verschiedene Cluster eingeteilt. Die in Cluster I beschriebenen *Clostridium* Spezies finden sich auch in dieser Arbeit in einer Gruppe (siehe phylogenetischer Baum). Hier finden sich die meisten der klinisch wichtigen Vertreter des Genus: *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tertium*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*. Kuhnert *et al.* (40) zeigten 1996 die enge Verwandtschaft von *Clostridium chauvoei* (DSM 7534) und *Clostridium septicum* (DSM 7528) untereinander, da sie 99,3 % identische Nukleotide besitzen und ordneten beide Spezies Cluster I nach Collins *et al.* zu. Laut Kuhnert liegen beide Spezies phylogenetisch nah an *Clostridium perfringens* und *Clostridium carnis*. Auch in dieser Arbeit konnte diese phylogenetische Nähe der Spezies bestätigt werden. *Clostridium chauvoei* verursacht Rauschbrand in Wiederkäuern: eine schnell fortschreitende, lebensbedrohende verflüssigende Nekrose des Muskelgewebes. Da Rauschbrand häufig aufgrund eines ähnlichen Krankheitsverlaufs mit anderen Clostridieninfektionen verwechselt werden kann, die ein malignes Ödem verursachen (*Clostridium novyi*, *Clostridium septicum* und *Clostridium sordelli*) besteht ein Bedarf an einfachen Methoden zur Identifizierung der pathogenen *Clostridien* (65). Mit Hilfe der partiellen 16S rDNA- Sequenzierung war es möglich alle genannten *Clostridium* Spezies eindeutig zu unterscheiden. Als alternatives Ziel zur Unterscheidung dieser Gruppe beschrieben Sasaki *et al.* die 16S- 23S rDNA spacer region (65). *Clostridium felsineum* wurde von Collins *et al.* 1994 (16) in den Cluster XI eingeordnet und damit als eine Spezies getrennt vom Genus *Clostridium sensu strictu* (Cluster I). Tamburini *et al.* (73) zeigten aufgrund einer kompletten 16S rDNA- Analyse und einer DNA- DNA- Hybridisierung jedoch die nahe Verwandtschaft zu *Clostridium acetobutylicum* und damit die Zugehörigkeit zur Kerngruppe der Clostridien in Cluster I. Auch in dieser Arbeit konnte die Ähnlichkeit dieser beiden

Spezies gezeigt werden und die Zugehörigkeit zu Cluster I. Des weiteren konnte die von Spring *et al.* (69) gezeigt enge Verwandtschaft zwischen *Clostridium estertheticum* ssp. *estertheticum*, *Clostridium lacofryxellense*, *Clostridium bowmanii* und *Clostridium psychrophilum* bestätigt werden. Ebenfalls eng verwandt laut Keis *et al.* (36) sind folgende Lösungsmittel- produzierenden Clostridien: *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium saccharobutylicum* und *Clostridium saccharoperbutylicum*. In dieser Arbeit liegen auch sie eng beieinander.

Der Cluster II nach Collins *et al.* mit *Clostridium histolyticum*, *proteolyticum* und *limosum* finden sich in dieser Arbeit als eine Gruppe inmitten der Gruppe, die Clusters I entspricht. Collins *et al.* beschrieben eine große Ähnlichkeit dieser Spezies untereinander (>96 %) jedoch eine signifikant geringere Ähnlichkeit mit anderen Spezies aus Cluster I (<92 %). Eine klare phänotypische Trennung zum Cluster I schien Collins *et al.* problematisch. Alles in allem bewerteten sie die Unterschiede jedoch größer als die Gemeinsamkeiten, so dass eine separate Gruppe angemessen erscheint. Nur die Ähnlichkeit der drei Spezies miteinander durch die Nähe im phylogenetischen Baum konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

Auch die Spezies aus Cluster III nach Collins *et al.* finden sich in dem phylogenetischen Baum recht nah beieinander. In diesem Cluster sind nach Collins *et al.* *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium termitidis*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium papyrosolvans*, *Clostridium aldrichii*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium* und *Clostridium thermolacticum* enthalten. Die beiden letztgenannten Spezies wurden neu gruppiert zu *Clostridium stercorarium* ssp. *stercorarium* und *Clostridium stercorarium* ssp. *thermolacticum*) 2001 von Fardeau (23), der ebenfalls *Thermoanaerobacter leptospartum* als *Clostridium stercorarium* ssp. *leptospartum* neu eingruppierte.

Obwohl phänotypisch sehr verschieden (z. B. mesophil und thermophil) fassten Collins *et al.* *Clostridium leptum* und *Clostridium sporosphaeroides*, sowie *Clostridium cellulosi* mit einer eher periphereren Assoziation, zum Cluster IV zusammen. Dies geschah vor allen Dingen auf der Basis von Bootstrap- Analysen. In Bezug auf die Unterschiede in der Sequenzanalyse vermuteten Collins *et al.* eine supragenerische Gruppe oder Familie. Die großen Unterschiede in der Sequenzanalyse können auch in dieser Arbeit nachvollzogen werden.

Cluster V besteht aus einer Gruppe *Thermobacteroides*. Cluster VI besteht aus *Moorella thermoaceticum* und *Moorella thermoautotrophicum*. Cluster VII aus der Gruppe der *Thermoanaerobacter*. Cluster VIII aus zwei beta-oxidierenden *Synthrophomonas* Spezies. Cluster IX entspricht dem *Sporomusa*-Zweig des *Clostridium* Phylum. Cluster X besteht aus einigen nicht valide beschriebenen Spezies.

Auch Cluster XI konnte in dieser Arbeit wiedererkannt werden; ebenso die genetisch enge Verwandtschaft zwischen *Clostridium mayombei* (DSM 6539) und *Clostridium glycolicum* (DSM 1288), zwischen den thermo- und alkaliphilen *Clostridium paradoxum* und *Clostridium thermoalcaligenes* und die Gruppe um *Clostridium lituseburense* bestehend aus *Clostridium bifermentans*, *Clostridium difficile*, *Clostridium glycolicum*, *Clostridium ghonii*, *Clostridium irregularis*, *Clostridium mayobei*, *Clostridium manganotii* und *Clostridium sordelii*. Nur die enge Verwandtschaft zwischen *Clostridium felsineum* und *Clostridium formicoaceticum* konnte nicht nachgewiesen werden, da sich *Clostridium felsineum* in Cluster I wiederfinden lässt. Dies entspricht jedoch den Ergebnissen von Tamburini *et al.* (73).

Cluster XII mit *Clostridium acidurici* und *Clostridium prinolyticum* findet man ebenfalls gruppiert wieder.

Cluster XIVa lässt sich ebenfalls als Gruppe wiedererkennen mit *Clostridium aerotolerans*, *Clostridium xylanolyticum*, *Clostridium nexile*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium oroticum*, *Clostridium aminovalericum* und *Clostridium xylanolyticum*, *Clostridium polysaccharolyticum* und *Clostridium populeti*. Finegold *et al.* konnten zeigen, dass klinische Isolate, die mit konventionellen Methoden als *Clostridium clostridioforme* identifiziert worden waren, sich unter 16S rRNA-Sequenzanalyse als *Clostridium boltae*, *Clostridium hathewayi* oder *Clostridium clostridioforme* herausstellten (24). In dieser Arbeit konnten die drei Spezies ebenfalls mit Hilfe der partiellen 16S rDNA Analyse voneinander differenziert werden (sowohl die selbst sequenzierten Stämme als auch in Kombination mit den GenBank-Einträgen).

Clostridium propionicum, *Clostridium neopropionicum* und *Clostridium lentocellum* lässt sich als Gruppe (Cluster XIVb nach Collins *et al.*) erkennen. *Clostridium colinum* kann man jedoch nicht zuordnen, da es zu weit entfernt im phylogenetischen Baum liegt.

Die einzige *Clostridium* Spezies (*Clostridium innocuum*) aus Cluster XVI lässt sich in der Nähe des Clusters XVIII wiederfinden mit den Spezies *Clostridium ramosum* und *Clostridium spiroforme*.

Mit der partiellen 16S rDNA- Analyse kommt diese Arbeit zusammenfassend also zu einem ähnlichen Ergebnis wie Collins *et al.* in der phylogenetischen Analyse der Clostridien anhand der vollständigen Sequenzierung der 16S rDNA. Dies bestätigt die Aussage von Tang *et al.* 1998 (74), bei denen die Analyse von 527 Basenpaaren identische Ergebnisse im Vergleich zur kompletten 16S rDNA- Analyse erbrachte. Dies kann als Voraussetzung für die Anwendung in der klinische Routine gesehen werden, da eine komplette Analyse des 16S rDNA- Gens mit 12 Sequenzierungsreaktionen zu zeitaufwendig und kostenintensiv wäre.

4. 13 Ausblick in die Zukunft

Die 16S rRNA- Technologie ist im Rahmen der Taxonomie auch zukünftig als integrierter Bestandteil einer polyphasischen Identifizierungsstrategie anzusehen basierend auf phänotypischen und genotypischen Testverfahren zur Identifikation.

Klinisch gesehen kann die partielle 16S rRNA- Sequenzierung eine Art Screening-Plattform darstellen, an die sich bei Bedarf andere Verfahren, z. B. durch die Verwendung alternativer Marker anschließen (25). Die Kosten dieses Verfahrens sinken (21) durch zunehmende Automatisierung und technische Fortschritte wie z. B. durch das Genomsequenzierungsprojekt angeregt. Für Nicht- Tuberkulosebakterien ist die genotypische Analyse bereits kostengünstiger als konventionelle Methoden (18). In immer mehr Bereichen der medizinisch- mikrobiologischer Labordiagnostik wird daher die DNA- sequenzbasierte Diagnostik als ein automatisierbares Verfahren mit den Möglichkeiten des Datentransfers Anwendung finden. Aus diesem Grund entsteht ein Bedarf an verlässlichen Sequenzdaten, um durch vergleichende Sequenzanalyse zu richtigen diagnostischen Schlüssen zu gelangen. Zukünftige Strategien zur Identifizierung von Keimen werden darüber hinaus zusätzliche Komponenten einbeziehen, wenn dies erforderlich ist. Unerlässlich dafür ist die Ausweitung und Optimierung von Datenbankbeständen.

Zusammenfassung

Clostridien sind anaerob wachsende, gram- positive Stäbchen, deren phänotypische Differenzierung zeitaufwendig und in vielen Fällen nicht auf Speziesebene möglich ist. Die partielle 16S rDNA- Gensequenzierung dagegen bietet eine Identifizierungsmöglichkeit auf Speziesebene ohne die Notwendigkeit einer Anzucht. Voraussetzungen hierfür sind unter anderem die eindeutige Unterscheidbarkeit der Gensequenzen voneinander sowie das Vorhandensein adäquater Referenzdatenbanken.

In dieser Arbeit wurden 86 Typstämme des Genus *Clostridium* angezüchtet und eine 419 bis 468 bp große 16S rDNA- Sequenz erstellt. Die Sequenzen von weiteren 63 Typstämmen des Genus *Clostridium* sind GenBank entnommen und auf Längen gekürzt worden, die durch die Start und Endsequenzen der selbst sequenzierten Keime definiert sind. Damit sind alle Spezies des Genus *Clostridium* gemäß der DSMZ- Liste „Bacterial Nomenclature up to date“ vom Oktober 2004 in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Insgesamt konnten alle Typstämme auf Speziesebene anhand der 16S rDNA Sequenz eindeutig von einander unterschieden werden.

Mit den eigens sequenzierten 86 *Clostridium*- Typstämmen wurde eine GenBank-Suche (BLAST- Search) durchgeführt. 33 % (n=28) der Typstämme wurde mit 100 % Übereinstimmung richtig erkannt. 48 % (n=41) der Spezies wurden nicht mit 100 %iger Übereinstimmung erkannt. Falsch erkannt wurden 9% der Fälle (n=8), obwohl die eigentlich richtigen Spezies in der Datenbank enthalten waren. Nicht in der Datenbank vorhanden war 1 % der Typstämme (n=1). Nicht eindeutig wurden 9 % (n=8) der Spezies erkannt. Öffentliche Datenbanken wie GenBank können daher eine Referenzfunktion zur Identifizierung von *Clostridien* nur bedingt wahrnehmen, da ungefähr jede fünfte Sequenz falsch oder nicht eindeutig identifiziert wurde.

Literaturverzeichnis

- (1) Ackermann G, Tang YJ, Spencer SJ, Silva Jr. J, Rodloff AC, Cohen SH (2001) Isolation of *Clostridium innocuum* from cases of recurrent diarrhea in patients with prior *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 40: 103-106
- (2) Adak GK, Long SM, O'Brien SJ (2002) Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51: 832-841
- (3) Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood strains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 39: 362-372
- (4) Alexander CJ, Citron DM, Brazier JS, Goldstein EJC (1995) Identification and Antimicrobial Resistance Patterns of Clinical Isolates of *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, and *Clostridium ramosum* Compared with Those of Clinical Isolates of *Clostridium perfringens*. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 3209-3215
- (5) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169
- (6) Bae J, Park JR, Chang Y, Rhee S, Kim B, Park Y (2004) *Clostridium hastiforme* is a later synonym of *Tisserierella praeacuta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 947-949
- (7) Barbut F, Petit JC (2001) Epidemiology of *Clostridium difficile*- associated infections. *Clinical Microbiology and Infection* 7: 405-410
- (8) Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2005) GenBank. *Nucleic Acids Research* 33: D34-38
- (9) Brazier JS (1998) The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41: 47-57
- (10) Cartwright CP, Stock F, Bekkmann SE, Williams EC, Gill VJ (1995) PCR Amplification of rRNA Intergenic Spacer Regions as a Method for

- Epidemiologic Typing of *Clostridium difficile*. Journal of Clinical Microbiology 33: 184-187
- (11) Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Muyzer G, Amann R (2002) Microheterogeneity in 16S Ribosomal DNA- Defined Bacterial Populations from a Stratified Planktonic Environment is related to Temporal Changes and to Ecological Adaptions. Journal of Clinical Microbiology 68: 1706-1714
 - (12) Cilia V, Lafay B, Christen R (1996) Sequence Heterogeneities Among 16S Ribosomal RNA Sequences, and Their Effect on Phylogenetic Analyses at the Species Level. Mol. Biol. Evol. 13: 451-461
 - (13) Clarke SC, Diggle MA, Edwards GFS (2001) Semiautomation of multilocus sequence typing for the characterization of clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. Journal of Clinical Microbiology 39: 3066-3071
 - (14) Clayton RA, Sutton G, Hinkle PSJ, Bult C, Fields C (1995) Intraspecific Variation in Small- Subunit rRNA Sequences in GenBank: Why Single Sequences May Not Adequately Represent Prokaryotic Taxa. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 595-599
 - (15) Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedle JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP II): sequences and tools for high- throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research 33: D294-D296
 - (16) Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Fearrow JAE (1994) The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 812-826
 - (17) Condon C, Liveris D, Squires C, Schwartz I, Squires C (1995) rRNA Operon Multiplicity in *Escherichia coli* and the Physiological Implication of *rrn* Inactivation. Journal of Bacteriology 177: 4152-4156
 - (18) Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A (2003) Conventional methods versus 16S Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Nontuberculous Mycobacteria: Cost Analysis. Nucleic Acids Research 41: 1010-1015

- (19) Dahllöf I, Bailie HKS (2000) *rpoB* - Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Journal of Clinical Microbiology* 66: 3376-3380
- (20) David V, Bozdogan B, Mainardi J, Legrand R, Gutmann L, Leclercq R (2004) Mechanism of Intrinsic Resistance to Vancomycin in *Clostridium innocuum* NCIB 10674. *Journal of Bacteriology* 186: 3415-3422
- (21) Diggle MA, Stuart CC (2002) What a Load of Old Sequence!!!. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2707
- (22) Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gyrat J, Raoult D (2000) 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3623-3630
- (23) Fardeau M, Ollivier B, Garcia JL, Patel, BKC (2001) Transfer of *Thermobacteroides leptospartum* and *Clostridium thermolacticum* as *Clostridium stercorarium* subsp. *leptospartum* subsp. nov., comb. nov. and *Clostridium stercorarium* subsp. *thermolacticum* subsp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1127-1131
- (24) Finegold SM, Song Y, Liu C, Hecht DW, Summanen P, Könönen E, Allen SD (2005) *Clostridium clostridioforme*: a mixture of three clinically important species. *European Journal of Clinical Infectious Diseases* 24: 319-324
- (25) Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk Jr. P (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 166-170[^]
- (26) Fredricks DN, Relman DA (1996) Sequence- Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch's Postulates. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 18-33
- (27) Fredricks DN, Relman DA (1998) Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetholesulfonate. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2810-2816
- (28) Hall L, Doerr KA, Wohlfield SL, Roberts GD (2003) Evaluation of the MicroSeq System for Identification of Mycobacteria by 16S Ribosomal DNA

- Sequencing and Its Integration into a Routine Clinical Mycobacteriology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1447-1453
- (29) Harmsen D, Karch H (2004) 16S rDNA for Diagnosing Pathogens: a Living Tree. *ASM News* 70: 19-24
- (30) Harmsen D, Rothgänger J, Frosch M, Albert J (2002) RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro- organisms Database. *Nucleic Acids Research* 30: 416-417
- (31) Harmsen D, Rothgänger J, Singer C, Albert J, Frosch M (1999) Intuitive hypertext- based molecular identification of micro- organisms. *Lancet* 353: 291
- (32) Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC (1991) Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Gene Amplification by Heparin. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 676-679
- (33) Janda MJ, Abbott SL (2002) Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1887-1891
- (34) Johnson JL, Francis BS (1975) Taxonomy of the clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J. Gen. Microbiology* 88: 229-244
- (35) Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology (1999) Rejection of *Clostridium putrificum* and conservation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* - Opinion 69. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 339
- (36) Keis S, Shaheen R, Jones DT (2001) Emended description of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbitylicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2095-2103
- (37) Kolbert CP, Persing DH (1999) Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 2: 299-305
- (38) Kotilainen P, Jalava; Jari; Meurman; Olli; Lehtonen, Jari; Meurman; Olli; Lehtonen, Meurman; Olli; Lehtonen, Olli; Lehtonen, Lehtonen OP, Rintala E, Seppälä O, Eerola E, Nikkari S (1998) Diagnosis of Meningococcal Meningitis

- by Broad- Range Bacterial PCR with Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2205-2209
- (39) Kreader CA (1996) Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1102-1106
- (40) Kuhnert P, Capaul SE, Nicolet J, Frey J (1996) Phylogenetic Positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* Based on 16S rRNA Gene Sequences Phylogenetic Positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* Based on 16S rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 1174-1176
- (41) Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP (2002) Health Care Costs and Mortality Associated with Nosocomial Diarrhea Due to *Clostridium difficile*. *Clinical Infectious Diseases* 34: 346-353
- (42) Lawson PA, Perez PL, Hutson RA, Hippe H, Collins MD (1993) Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 87-92
- (43) Lindström MK, Jankola HM, Hielm S, Hyytiä EK, Korkeala HJ (1999) Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24: 267-274
- (44) Looney WJ, Gallusser AJC, Modde HK (1990) Evaluation of the ATB 32 A System for Identification of Anaerobic Bacteria Isolated from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1519-1524
- (45) Ludwig W, Schleifer KH (1999) Phylogeny of Bacteria beyond the 16S rRNA Standard. *ASM News* 65:
- (46) Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD (1988) *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clinical Microbiology Reviews* 1: 1-18
- (47) Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD (1991) Evaluation of the new RapID-ANA II system for the identification of clinical anaerobic isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 874-878
- (48) McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RYY, Stamm WE (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine* 320: 204-210

- (49) Meier A, Persing DH, Finken M, Böttger EC (1993) Elimination of Contaminating DNA within Polymerase Chain Reaction Reagents: Implications for a General Approach to Detection of Uncultured Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 646-652
- (50) Mellmann A, Cloud JL, Andrees S, Blackwood K, Carroll KC, Kabani A, Roth A, Harmsen D (2003) Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and GenBank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *International Journal of Medical Microbiology* 293: 359-370
- (51) Millar BC, Xu J, Moore JE (2002) Risk Assessment Models and Contamination Management: Implications for Broad- Range Ribosomal DNA PCR as a Diagnostic Tool in Medical Bacteriology. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1575-1580
- (52) Murray PR *Manual of Clinical Microbiology* (1999) American Society for Microbiology, 7. Auflage, S 645-671
- (53) Olsen I, Johnson JL, Moore LVH, Moore WEC (1995) Rejection of *Clostridium putrificum* and conservation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 414
- (54) Patel JB, Leonard DGB, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I (2000) Sequenced-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 246-251
- (55) Petershofen EK, Fislage R, Faber R, Schmidt H, Roth WK, Seifried E (2000) Detection of nucleic acid sequences from bacterial species with molecular genetic methods. *Transfusion Science* 23: 21-27
- (56) Prazmowski A (1880) *Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten*. Leipzig:
- (57) Qian Q, Tang YW, Kolbert CP, Torgerson CA, Hughes JG, Vetter EA, Harmsen WS, Montgomery SO, Cockerill FR, Persing DH (2001) Direct Identification of Bacteria from Positive Blood Cultures by Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene: Evaluation of BACTEC 9240 Instrument True- Positive and False- Positive Results. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3578-3582

- (58) Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J (2001) Evaluation of PCR- Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene- Based Cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 880-887
- (59) Rainey FA, Stackebrandt E (1993) 16S rRNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 125-128
- (60) Relman DA (1993) The identification of uncultured microbial pathogens. *Journal of Infectious Diseases* 168: 1-8
- (61) Relman DA (1999) The search for unrecognized pathogens. *Science* 284: 1308-1310
- (62) Rys PN, Persing DH (1993) Preventing False Positives: Quantitative Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 2356-2360
- (63) Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol* 4: 406-425
- (64) Sasaki Y, Kojima A, Aoki H, Ogikubo Y, Takikawa N, Tamura Y (2002) Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology* 86: 257-267
- (65) Sasaki Y, Yamamoto K, Kojima A, Norimatsu M, Tamura Y (2000) Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Research in Veterinary Science* 69: 289-294
- (66) Siqueira Jr. JF, Rôcas IN (2003) PCR methodology as valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of Dentistry* 31: 333-339
- (67) Song Y, Liu C, McTeague MFSM (2003) 16S Ribosomal DNA Sequence-Based Analysis of Clinically Significant Gram-Positive Anaerobic Cocci. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1363-1369
- (68) Speksnijder AGCL, Kowalchuk GA, De Jong S, Kline E, Stephen JR, Laanbroek HJ (2001) Microvariation Artifacts Introduced by PCR and Cloning of Closely

- Related 16S rRNA Gene Sequences. *Molecular Biology of Evolution* 67: 469-472
- (69) Spring S, Merkhoffer B, Weiss N, Kroppenstedt RM, Hippe H, Stackebrandt E (2003) Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov.; and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1019-1029
- (70) Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA- DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849
- (71) Stackebrandt E, Kramer I, Swiderski J, Hippe H (1999) Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24: 253-258
- (72) Stager CE, Davis JR (1992) Automated Systems for identification of microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 302-327
- (73) Tamburini E, Daly S, Steiner U, Vandini C, Mastrome G (2001) *Clostridium felsineum* and *Clostridium acetobutylicum* are two distinct species that are phylogenetically closely related. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 963-966
- (74) Tang Y, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH (1998) Comparison of Phenotypic and Genotypic Techniques for Identification of Unusual Aerobic Pathogenic Gram- Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3674-3679
- (75) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A (2001) Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous *Mycobacterium* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3637-3648
- (76) Van de Peer Y, Robbrecht E, de Hoog S, Caers A, De Rijk P, De Wachter R (1999) Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 27: 179-183

- (77) Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews* 60: 407-438
- (78) Wang GC, Wang Y (1996) The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* 142: 1107-1114
- (79) Wang GCY, Wang Y (1997) Frequency of Formation of Chimeric Molecules as a Consequence of PCR Coamplification of 16S rRNA Genes from Mixed Bacterial Genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4645-4650
- (80) Wang X, Maegawa T, Karasawa T, Ozaki E, Nakamura S (2005) *Clostridium sardiniense* Prévot 1938 and *Clostridium absonum* Nakamura *et al* 1973 are heterotypic synonyms: evidence from phylogenetic analyses of phospholipase C and 16S rRNA sequences, and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1193-1197
- (81) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703
- (82) Wilson KH, Blitchington R, Frothingham R, Wilson JA (1991) Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium. *Lancet* 338: 474-475
- (83) Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271
- (84) Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 87: 4576-4579
- (85) Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, Yip K, Fung AMY, Leung K, Tam DMW, Que TYK (2003) Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA- Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1996-2001

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harmsen für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die sehr gute Betreuung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. Karch gilt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Hygiene in Münster.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mellmann und Frau Keckevoet für die hervorragende Anleitung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Institutes für Hygiene in Münster danke ich für die gute Kooperation und das ausgesprochen freundliche Arbeitsklima.

Bei meiner Ehefrau und meinen Eltern schließlich bedanke ich mich für die stete Anteilnahme und Unterstützung.