

Genetische Unterschiede zwischen  
*Coxiella burnetii*-Isolaten und ihre Korrelation  
zur Epidemiologie und Klinik des Q-Fiebers

Pablo Hernando Jiménez



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Genetische Unterschiede zwischen  
*Coxiella burnetii*-Isolaten und ihre Korrelation zur  
Epidemiologie und Klinik des Q-Fiebers**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Pablo Hernando Jiménez**  
Tierarzt aus Madrid (Spanien)

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer  
Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 25.06.2012

Für die Menschen die ich liebe  
A las personas que mas quiero

Caminante, son tus huellas  
el camino, y nada mas.  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace camino  
y al volver la vista atras  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante, no hay camino  
sino estelas en el mar.

Antonio Machado

Wanderer, deine Fußspuren  
sind der Weg, und weiter nichts.  
Wanderer, es gibt keinen Weg,  
der Weg entsteht beim Gehen,  
beim Gehen entsteht der Weg,  
und im Blick zurück  
sieht man den Pfad,  
den man nie wieder betreten muss.  
Wanderer, es gibt keinen Weg,  
außer dem Kielwasser im Meer.

Antonio Machado

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Hernando Jiménez, P., Heydel, C., Willems, H., Tyczka, J., Baljer, G.** 2009 Genetic differentiation of *Coxiella burnetii* Isolates - correlation with virulence attributes and epidemiological trades. Poster im Rahmen der Medizinischen B-Schutz-Tagung des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr in München

Pablo Hernando Jiménez wurde durch das spanisches Stipendium der MAEC-AECID (Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación - Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo) gefördert.

Front cover image copyright Dennis Kunkel Microscopy, Inc. ([www.denniskunkel.com](http://www.denniskunkel.com))

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
2.1	<i>Coxiella burnetii</i> .....	3
2.1.1	Allgemeine Eigenschaften .....	3
2.1.2	Taxonomie .....	3
2.1.3	Genom von <i>Coxiella burnetii</i> .....	3
2.1.3.1	<i>Acute disease antigen A-Gen</i> .....	3
2.1.3.2	RFLP .....	5
2.1.3.3	Plasmide .....	6
2.1.3.4	MLVA .....	8
2.1.4	Virulenzfaktoren .....	10
2.1.5	Infektionen bei Mensch und Tier .....	13
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>15</b>
3.1	Herstellung von Keim-Suspensionen .....	15
3.1.1	Anzüchtung und Vermehrung .....	15
3.1.2	Isolate .....	15
3.1.3	Zelllinien .....	18
3.1.4	Aufreinigung .....	18
3.1.5	Mikroskopische Bestimmung der Partikelzahl .....	19
3.1.6	Inaktivierung .....	19
3.1.7	Gimenez-Färbung .....	20
3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	20
3.2.1	Präparation bakterieller Gesamt-DNA .....	20
3.2.2	Multiplex-PCR für die Plasmiddifferenzierung und <i>adaA</i> -PCR .....	20
3.2.3	XL-PCR .....	21
3.2.4	<i>Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i> .....	22
3.2.5	Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese .....	23
3.2.6	Analytische Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	23
3.3	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) .....	25
3.3.1	Herstellung der Agaroseblöckchen für die <i>contour-clamped homogeneous electric field – pulse field gel electrophoresis</i> (CHEF-PFGE) .....	25

---

3.3.2	Freisetzung und Verdau der in den Agaroseblöckchen enthaltenen DNA.....	25
3.3.3	<i>Contour-clamped homogeneous electric field – pulse field gel electrophoresis</i> (CHEF-PFGE).....	26
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
4.1	Genetische Charakterisierung von <i>C. burnetii</i> -Isolaten.....	27
4.1.1	Darstellung der Plasmide mittels Multiplex-PCR.....	27
4.1.2	Vergleichende PCRs für die Plasmide QpRS und QpDV.....	28
4.1.3	Nachweis des <i>acute disease antigen A (adaA)</i> -Gens.....	30
4.1.4	<i>Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i> (MLVA).....	31
4.1.5	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP).....	38
4.1.6	Genotypisierung von humanen Isolaten .....	40
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>41</b>
5.1	Bedeutung des <i>adaA</i> -Gens für die Pathogenität.....	41
5.2	Typisierung mittels RFLP-PFGE.....	42
5.3	Typisierung mittels MLVA.....	46
5.4	Vergleich der Plasmidsequenzen .....	50
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>TABELLEN .....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>ABBILDUNGEN .....</b>	<b>77</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
A. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Acc. no.	<i>Accession number</i>
ACP	<i>acid phosphatase</i>
ak.	akutes
AP	Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaare
bp	<i>base pair</i>
BGM	<i>Buffalo-Green-Monkey</i>
bzw.	beziehungsweise
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CCD	<i>coiled-coil domains</i>
CHEF	<i>contour-clamped homogeneous electric field</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Dot/Icm	<i>defect in organelle trafficking/intracellular multiplication</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i>
Fa.	Firma
f. c.	<i>final concentration</i>
Fs.	Fertilitätsstörung
FUR	<i>ferric uptake regulator</i>
h	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
icd	<i>isocitrate dehydrogenase</i>
kBp	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
kHz	kilo-Hertz
LCV	<i>large cell variant</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MBC	<i>Molecular Biology Certified</i>
MBp	Mega-Basenpaare
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>

---

µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MLST	<i>Multiple Loci Sequence Typing</i>
MLVA	<i>Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i>
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
nm	Nanometer
n. n.	nicht nachgewissen
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OMP	<i>outer membrane Protein</i>
ORFs	<i>open reading frames</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S.	Saudi
s	Sekunde(n)
SCID	<i>severe combined immunodeficient</i>
SCV	<i>small cell variant</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SSR	<i>short sequence repeat</i>
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPR	<i>tetratricopeptide repeats</i>
TRs	<i>tandem repeats</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

U	<i>Unit</i>
u.	und
u. a.	und andere
unbek.	unbekannt
VNRTs	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
Vol	Volumen
z. B.	zum Beispiel



# 1 EINLEITUNG

*Coxiella burnetii* gehört zu der Klasse der  $\gamma$ -Proteobacteria und vermehrt sich als obligat intrazellulärer Erreger in parasitophoren Vakuolen innerhalb eukaryotischer Zellen. Thompson et al. (1990) haben jedoch auch die Vermehrung des Bakteriums in einem sauren axenischen Medium beschrieben.

Wegen der hohen Infektiosität und Tenazität des Erregers wird die Erkrankung als eine wichtige Zoonose weltweit betrachtet. Tiere, die sich mit dem Erreger infiziert haben zeigen meistens keine Symptome, scheiden den Erreger allerdings kontinuierlich in geringen Mengen aus. Bei den gelegentlich auftretenden Trächtigkeitsstörungen kommt es dagegen zur massiven Erregerausscheidung. Die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen sind Aerosole oder die nach Austrocknung von Geburtssekreten, Zeckenkot oder Abortmaterial entstehenden Stäube. Die Erkrankung beim Menschen wird als Q-Fieber bezeichnet (Salmon et al., 1982). Beim Q-Fieber wird eine akute und chronische Verlaufsform unterschieden. Unspezifische grippeähnliche Symptome, zum Teil von starken Kopfschmerzen begleitet, erschweren die diagnostische Diskriminierung von anderen Krankheiten (Maurin et al., 1999). Die chronische Form manifestiert sich meist durch eine therapieresistente Endokarditis.

Bisherige Untersuchungen zur Identifizierung der Virulenzfaktoren von *C. burnetii* verliefen wenig erfolgreich. Die Hypothese, dass plasmidkodierte Virulenzeigenschaften eine wichtige Rolle bei der Entstehung von akutem oder chronischem Q-Fieber beim Menschen spielen, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen widerlegt (Stein et al., 1993a; Thiele et al., 1994a). Eine viel versprechende Möglichkeit Coxiellen-Isolate anhand ihrer Virulenz zu differenzieren, war die Identifizierung eines immundominanten 28 kDa Polypeptids, welches nur in *C. burnetii*-Isolaten von Menschen mit akutem Q-Fieber nachgewiesen werden konnte (To et al., 1998b). Dieses Polypeptid wird durch das *acute disease antigen A (adaA)*-Gen kodiert (Zhang et al., 2005), das unabhängig von der geografischen Herkunft, immer bei Isolaten von „akuten“, jedoch nie bei Isolaten von „chronischen“ Verlaufsformen nachgewiesen wurde. Auf Grund dieser Feststellung wurde *adaA* als spezifischen Virulenzfaktor für Isolate akuter Verlaufsformen angesehen.

Gesamtgenomische Untersuchungen zur Differenzierung von *C. burnetii*-Isolaten wurden hauptsächlich mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analysen nach Restriktion genomischer DNA mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen durchgeführt (Heinzen et al., 1990; Jäger et al., 1998; Thiele et

al., 1993). Die Ergebnisse zeigten eine hohe Heterogenität in den RFLP-Mustern und eine beträchtliche Variation in der Genomgröße der untersuchten *C. burnetii*-Isolate.

Neuere Typisierungsmethoden, wie die *Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis* (MLVA) und die *Multiple Loci Sequence Typing* (MLST), nutzen zur Differenzierung von *C. burnetii*-Isolaten zum einen *variable number of tandem repeats* (VNTRs), die über das gesamte Genom verteilt vorkommen und hochvariabel sind und zum anderen Sequenzunterschiede in verschiedenen Genen (Arricau-Bouvery et al., 2006; Glazunova et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere 103 *C. burnetii*-Isolate angezüchtet, welche sich in ihrer Epidemiologie und geographischen Herkunft unterschieden. Ziel der Arbeit war es, eine ausführliche genomische Klassifizierung der Isolate durchzuführen, um so epidemiologisch und diagnostisch relevante Genomabschnitte zu identifizieren und deren Assoziation mit der durch sie hervorgerufenen Klinik bzw. ihrer geographischen Herkunft zu überprüfen. Um dieses Ziel zu erreichen wurden erstmals die Ergebnisse von vier unterschiedlichen genomischen Methoden (*pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)-RFLP, MLVA, *adaA*-Gen PCR und Plasmid-PCR) kombiniert.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 *Coxiella burnetii*

#### 2.1.1 Allgemeine Eigenschaften

Coxiellen sind sehr kleine, kommaförmige Stäbchen mit einem Aufbau der Zellwand wie man sie bei gram-negativen Bakterien findet (Burton et al., 1975; Gimenez, 1965). Sie vermehren sich in Phagolysosomen innerhalb eukaryotischer Wirtszellen. Nach Aufnahme der Bakterien und ihrem Übergang ins Blut besiedeln sie Makrophagen und Monozyten (Cutler et al., 2007). *Coxiella (C.) burnetii* zeichnet sich durch eine sehr hohe Infektiosität aus. So wurde beschrieben, dass bei aerogenen Infektionen bereits 1 bis 10 Partikel ausreichen um Krankheitssymptome auszulösen (Tigertt et al., 1961). Außerdem haben Coxiellen eine sehr hohe Tenazität; sie können wegen ihrer hohen Resistenz gegen UV-Strahlung, Hitze, Austrocknung, Druck und osmotischen sowie oxidativen Stress lange in der Umwelt überleben (Heinzen et al., 2001).

#### 2.1.2 Taxonomie

*C. burnetii* wurde anhand der 16S-rRNA-Sequenz in die Klasse der  $\gamma$ -Proteobacteria eingeteilt (Stein et al., 1993b; Weisburg et al., 1989). Diese Einteilung wurde später mittels Sequenzierung des gesamten Genoms bestätigt (Seshadri et al., 2003; Seshadri et al., 2005). Lange Zeit galt *C. burnetii* als einziger Vertreter der Familie Coxiellaceae, erst im Jahre 2000 wurde von Tan und Owens mit *C. cheraxi* eine neue Spezies beschrieben (Tan et al., 2000).

#### 2.1.3 Genom von *Coxiella burnetii*

##### 2.1.3.1 *Acute disease antigen A-Gen*

To et al. (1998b) untersuchten 18 *C. burnetii*-Isolate mit verschiedenen epidemiologischen Eigenschaften mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Sie fanden acht

Polypeptide, die bei fast allen Isolaten vorkamen. Ein 28 kDa großes Polypeptid war für die Mehrheit der Isolate, die von Menschen mit akutem Q-Fieber stammten, immundominant. Bei Isolaten, die chronisches Q-Fieber verursachten, wurde es nicht nachgewiesen. In Studien anderer Autoren konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden (Kovacova et al., 1994; Lukacova et al., 1994; Novak et al., 1992). Da Williams et al. (1981; 1984) jedoch schon in den 80er Jahren von der Immogenität des 28 kDa Polypeptids berichteten, gehen To et al. (1998b) davon aus, dass die unterschiedlichen Ergebnisse durch die verschiedenen Methoden zur Herstellung der Antisera bzw. der *Coxiella*-Antigene zu erklären sind.

Zhang et al. (2005) klonierten und sequenzierten das 28 kDa Protein-kodierende Gen. Sie bestätigten, dass dieses Polypeptid nur bei *C. burnetii*-Isolaten, welche akutes Q-Fieber hervorriefen, exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde das Gen als *acute disease antigen A (adaA)* bezeichnet. Die Klonierung und Charakterisierung von *adaA* zeigte, dass es unabhängig von der geografischen Herkunft, nie bei *C. burnetii*-Isolaten, die chronisches Q-Fieber verursachten, vorkam. Aus diesem Grund wird die Präsenz des *adaA* als Pathogenitätsmerkmal bei *C. burnetii* betrachtet.

Mit Hilfe eines adaptierten DNA *microarray*-Chip untersuchten Frangoulidis et al. (2009) Coxiellen auf das Vorhandensein von *adaA*- und IS1111-Sequenzen. Bei zwei von insgesamt 22 untersuchten Isolaten (15 von Tieren und 7 von Menschen) konnte das *adaA*-Gen nicht nachgewiesen werden. Eines dieser Isolate stammte von einem Menschen mit chronischem Krankheitsverlauf, während das zweite *adaA*-negative Isolat von einer Ziege isoliert wurde. Die restlichen humanen Isolate stammten aus Blutkulturen oder von Patienten mit Pneumonie. Frangoulidis et al. (2009) schlossen daraus, dass das *adaA*-Gen bei Isolaten, die akutes Q-Fieber bei Menschen verursachen, vorhanden sein muss.

Des Weiteren konnte das 28 kDa Polypeptid mittels Immunoblot in Abortmaterial von Ziegen nachgewiesen werden (Fernandes et al., 2009). Versuche, dieses Polypeptid als Antigen für die serologische Diagnostik von *C. burnetii* bei Ziegenaborten zu verwenden, scheiterten. Jedoch gelang es den Autoren Polymorphismen innerhalb der *adaA*-Sequenz der verschiedenen untersuchten *C. burnetii*-Isolate nachzuweisen, welche sich für die Abwesenheit des AdaA-Proteins und die Duplizierung eines 227 Bp großen *adaA*-Segmentes verantwortlich zeigten (Fernandes et al., 2009).

### 2.1.3.2 RFLP

In den letzten 20 Jahren wurden mehrere geno- und phänotypische Methoden angewandt um verschiedene *C. burnetii*-Isolate zu diskriminieren. Hierdurch sollten Informationen über eine Verbindung zwischen der Virulenz und der Antigenität bzw. den epidemiologischen Eigenschaften gewonnen werden.

Die Untersuchungen der Isolate mittels SDS-PAGE, CBB-Färbung und Immunoblot erbrachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg (Hackstadt, 1986; Novak et al., 1989; To et al., 1998b).

Die Charakterisierung des LPS zeigte zwar Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolaten, die Diskriminierung zwischen den Isolaten war jedoch unzureichend (Hotta et al., 2004; Kovacova et al., 1994).

Die Studien auf genetischer Ebene waren am besten für die Differenzierung von *C. burnetii*-Isolaten geeignet. Die ersten Versuche mit Restriktionsenzymen bestätigten die Phasenvariation des Erregers und stellten eine gute Möglichkeit für die Einordnung der Isolate in Gruppen dar (O'Rourke et al., 1985). Nach Auftrennung der Fragmente mittels konventioneller Elektrophoreseverfahren von *HaeIII*-verdauter *Coxiella*-DNA, konnten vier verschiedene Gruppen etabliert werden (Vodkin et al., 1986b). Spätere Untersuchungen mit der Restriktionsenzyme *NotI* und *SfiI* ergaben bessere Ergebnisse, da das *Coxiella*-Genom nur wenige Erkennungssequenzen für diese Enzyme enthält und daher der Verdau mit Hilfe dieser Enzyme ein gut zu interpretierendes Fragmentmuster in der PFGE lieferte. Das Restriktionsenzym *SfiI* schneidet jedoch nicht die gesamte Plasmid-DNA von *C. burnetii*, wodurch diese folglich in der PFGE nicht dargestellt werden kann (Heinzen et al., 1990). Eine Einteilung von *C. burnetii*-Isolaten in vier Gruppen wurde mittels *NotI*- und *SfiI*-Verdau in der PFGE vorgenommen (Heinzen et al., 1990). Durch die Verwendung weiterer Restriktionsenzyme konnte diese Einteilung auf insgesamt sechs Gruppen erweitert werden (Hendrix et al., 1991).

Bei der Untersuchung von 24 *C. burnetii*-Isolaten aus Europa und Afrika gelang es Thiele et al. (1993) zehn neue Restriktionsgruppen nachzuweisen. Durch die Analyse von weiteren 56 Isolaten ließen sich insgesamt 20 Restriktionsgruppen (Jäger et al., 1998) unterscheiden.

Obwohl sich die RFLP-Methode in Verbindung mit der PFGE als ein wertvolles Verfahren zur Typisierung von *C. burnetii*-Isolaten erwies, ist bis dato keine Korrelation

zwischen den Restriktionsgruppen und der Virulenz der *C. burnetii*-Isolate oder den jeweiligen epidemiologischen Gegebenheiten nachgewiesen worden.

Da die PFGE eine relativ zeitintensive Methode darstellt, haben andere Autoren genetische Differenzierungen von *C. burnetii*-Isolaten mittels PCR in Verbindung mit der RFLP-Methode durchgeführt. So konnten Unterschiede beim *icd* (*isocitrate dehydrogenase*)-Gen genutzt werden, um die untersuchten Isolate in drei verschiedene Gruppen einzuteilen. Die erste Gruppe erfasste nur *C. burnetii*-Isolate die einen akuten Krankheitsverlauf verursacht hatten, die restlichen zwei Gruppen enthielten nur Isolate aus Patienten mit chronischem Q-Fieber (Nguyen et al., 1999). Eine spätere Studie stellte jedoch diese Einteilung anhand des *icd*-Genes in Frage (Andoh et al., 2004).

Ein weiteres Beispiel für den Einsatz der RFLP-Methode beschreiben Zhang et al. (1997), die eine Differenzierung von *C. burnetii*-Isolaten anhand des *com 1*-Genes vornahmen. Das *Coxiella outer membrane Protein 1* (*com1*)-Gen kodiert ein immunreaktives 27 kDa OMP (Hendrix et al., 1993). Nach der Analyse dieses Gens bei 21 Isolaten konnten vier Restriktionsgruppen nachgewiesen werden. Zwei Gruppen enthielten nur Isolate von Menschen, bei denen ein chronischer Krankheitsverlauf diagnostiziert wurde, wohingegen die anderen zwei nur Isolate enthielten, die akutes Q-Fieber verursacht hatten. Eine Erweiterung dieser Studie wurde von Sekeyova et al. (1999) vorgenommen, die zusätzlich zu dem *com 1*-Gen das *mucZ*-Gen bei insgesamt 37 Isolaten auf Polymorphismen untersuchten. Es ergab sich eine Einteilung in fünf verschiedene Gruppen ohne dass ein Zusammenhang zu der geographischen Herkunft bzw. der Krankheitsform festgestellt werden konnte.

### 2.1.3.3 Plasmide

Bei *C. burnetii* sind vier Plasmidtypen, nämlich QpH1, QpRS, QpDG und QpDV (Mallavia, 1991; Valkova et al., 1995) und zusätzlich eine QpRS-ähnliche chromosomal integrierte Sequenz (Savinelli et al., 1990; Willems et al., 1997) beschrieben.

Die erste Isolierung eines Plasmids gelang aus dem Referenzisolat „Nine Mile“, welches von einem Patienten mit akutem Q-Fieber stammte (Samuel et al., 1983). Die Größe des Plasmids wurde mit 36 kBp angegeben (Samuel et al., 1983). Nach Sequenzierung der Gesamt-DNA konnte die Plasmidgröße auf 37329 Bp festgelegt werden (Thiele et al., 1994b), mit einem G+C-Gehalt von 39,3% und 40 ORFs (Seshadri et al., 2003). Spätere Untersuchungen des Nine Mile RSA 331-Isolates ergaben für QpH1 eine Plasmidgröße vom 37317 Bp (NCBI Acc. no. NC\_010115). Im Verhältnis zur Genomgröße von 1,9 MBp (Seshadri et al., 2003) enthält das QpH1-

Plasmid 1,8% der genetischen Information des „Nine Mile“-Stammes. Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen wird vermutet, dass das QpH1-Plasmid die Ursprungsform der *C. burnetii*-Plasmide ist (Glazunova et al., 2005).

Das QpRS-Plasmid konnte aus *C. burnetii*-Isolaten von Patienten mit Endokarditis und von zwei Ziegen, die abortiert hatten, isoliert werden und besitzt eine Größe von 39280 Bp (Acc. no. NCBI Y1598). Hybridisierungsexperimente mit Plasmid-Sonden und genomischer DNA weiterer Isolate aus Endokarditis-Patienten ergaben ein positives Signal, ohne dass jedoch Plasmide nachgewiesen werden konnten (Samuel et al., 1985). Savinelli et al. (1990) zeigten, dass bei diesen Stämmen Plasmid-homologe Sequenzen ins Genom integriert waren. Die Kompletsequenzierung der Plasmid-homologen Sequenzen des Isolates Scurry Q217 zeigte eine Homologie von 16624 Bp mit dem QpH1-Plasmid. Punktmutationen treten mit einer Häufigkeit von 4,6%, Insertionen mit 1,6% und Deletionen mit 0,6% auf (Ritter, 1996).

Das Plasmid QpDG wurde aus Isolaten von Nagern in Dugway (Utah, USA) isoliert und hat eine Größe von 54179 Bp (Beare et al., 2009). Ning et al. (1992) berichteten über ein weiteres 56 kBp großes Plasmid, das bei einem Isolat eines Menschen mit chronischem Q-Fieber nachgewiesen wurde. Über die Identität dieses Plasmids gibt es bisher jedoch keine weiteren Angaben.

Aufgrund von Kreuzhybridisierungsversuchen zwischen QpH1, QpRS und QpDG konnten Regionen mit einer signifikanten Homologie nachgewiesen werden (Mallavia et al., 1989; Mallavia et al., 1990). Diese Bereiche wurden als *core*-Region bezeichnet und umfassen ca. 25 kBp. Sie sind zu einem großen Teil auch bei der 17 kBp großen Plasmid-homologen chromosomal integrierten Sequenz zu finden (Mallavia et al., 1989; Valkova et al., 1995).

Ein Vergleich der ORFs ergab, dass 6 ORFs des QpH1-Plasmids in der Plasmid-homologen, chromosomal integrierten Sequenz konserviert sind (Willems et al., 1997). Neuere Daten belegen, dass von den 40 ORFs (Seshadri et al., 2003) des QpH1-Plasmids 10 ORFs bei den anderen Plasmiden und der Plasmid-homologen, chromosomal integrierten Sequenz vorkommen (Beare et al., 2006).

Das Vorhandensein dieser *core*-Region bei allen Isolaten weist darauf hin, dass die Plasmide und die Plasmid-homologen Sequenzen möglicherweise eine wichtige Rolle in dem biologischen Zyklus des Erregers spielen. So gibt es monoklonale Antikörper (mAk) gegen Coxiellen-LPS, die nicht mit Isolaten, die QpRS- oder Plasmid-homologe Sequenzen Isolate besitzen, reagieren, während Isolate mit dem QpH1- bzw. dem QpDV-Plasmid erkannt werden. Mit Hilfe dieser mAk können demnach zwei immunologische Gruppen unterschieden werden (Hotta et al., 2003).

Erste Untersuchungen an nur wenigen *C. burnetii*-Isolaten ließen einen Zusammenhang zwischen Plasmidtyp und dem von den Isolaten verursachten Krankheitsbild erkennen. Mit QpH1-Plasmid ausgestattete Isolate wurden für akutes Q-Fieber und Isolate, die das QpRS-Plasmid oder Plasmid-homologe Sequenzen besaßen, für chronisches Q-Fieber verantwortlich gemacht (Baca et al., 1994; Minnick et al., 1991a; Minnick et al., 1991b; Samuel et al., 1985). Stein et al. (1993a) konnten durch die Untersuchung weiterer 37 Isolate diese Hypothese widerlegen. Sie isolierten von an chronischem Q-Fieber erkrankten Patienten *C. burnetii*-Isolate, die das QpH1-Plasmid besaßen und umgekehrt, von an akutem Q-Fieber erkrankten Patienten *C. burnetii*-Isolate mit dem QpRS-Plasmid. Stein et al. (1993a) stellten auch die Hypothese auf, dass die Entwicklung der chronischen Krankheitsform nicht nur durch das jeweilige Isolat beeinflusst wird, sondern zusätzlich durch die Abwehrlage des Wirtes. So konnte Hackstadt (1990) im Tierversuch demonstrieren, dass katheterinduzierte Herzläsionen eine Voraussetzung für die Entstehung von Endokarditis durch Isolate, die das QpH1-Plasmid besitzen, waren. Bei gesunden Tieren waren hingegen keine Coxiellen im Herzmuskel nachweisbar.

Neueste Studien im Tiermodell (SCID Mäuse) sprechen sogar von verschiedenen Pathovaren (Andoh et al., 2003; Stein et al., 2005). Innerhalb dieser Studien gelang es zum ersten Mal chronische Läsionen bei immundefizienten Mäusen mit dem *C. burnetii*-Isolat „Nine Mile“, welches das Plasmid QpH1 besitzt, auszulösen. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten stärkere histologische Läsionen im Vergleich zum Isolat Q212, das Plasmid-homologe Sequenzen besitzt (Stein et al., 2005).

#### **2.1.3.4 MLVA**

Durch die routinemäßige Sequenzierung kompletter Bakteriengenome wurden Bereiche entdeckt, die Sequenzwiederholungen, so genannte SSR (*Short Sequence Repeats*) enthalten.

Eine Kategorie der SSR, nämlich die TR (*Tandem Repeats*), haben sich als nützliches Werkzeug für die Studie genetischer Polymorphismen innerhalb der Bakterien erwiesen (Lindstedt, 2005). Je nach Größe spricht man von Mikro- (Sequenzmotive bis ungefähr 9 Bp) bzw. Minisatelliten (Sequenzmotive ab 9 Bp) (Vergnaud et al., 2000).

Diese Sequenzwiederholungen können mittels PCR mit Primern, die außerhalb der Sequenzmotive binden, amplifiziert werden. Anschließend werden die Amplifikate auf einem Gel aufgetrennt und analysiert. Unterschiede in der Amplifikatlänge spiegeln

eine unterschiedliche Anzahl an TRs wieder. Die erhaltene Datenmatrix wird mittels *Clustering*-Programmen analysiert. Eine auf diesen Sequenzwiederholungen basierende Methode, die MLVA, hat sich als hoch effizient für die Feinkartierung verschiedener Krankheitserreger erwiesen (Lindstedt, 2005; Vergnaud et al., 2006). Mit dieser Methode wurden z. B. Isolate von *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Brucella sp.*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* und *Shigella sp.* typisiert (Chiou et al., 2009; Le Fleche et al., 2001; Le Fleche et al., 2006; Pourcel et al., 2004; Pourcel et al., 2007; Ross et al., 2009).

Um Wiederholungen der Arbeit unabhängiger Arbeitsgruppen, sowie die mehrfache Benennung derselben *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)-Loci zu vermeiden, wurde eine TRs Datenbank entwickelt die im Internet unter <http://minisatellites.upsud.fr> zu finden ist (Denoeud et al., 2004; Le Fleche et al., 2002; Le Fleche et al., 2001).

Svraka et al. (2006) untersuchten zum ersten Mal *C. burnetii*-Isolate mit der MLVA-Methode. Hierfür wurde in dem komplett sequenzierten Genom des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 (Seshadri et al., 2003) nach TRs gesucht. Von allen möglichen Kandidaten wurden acht Loci ausgewählt, die die folgenden Kriterien erfüllen sollten: die Anzahl der Wiederholungen war größer als vier, die Sequenzmotive waren nicht länger als 30 Bp und die Konservierung der Sequenzmotive betrug mehr als 90%. Insgesamt wurden 21 *C. burnetii*-Isolate untersucht. Fünf davon waren Nine Mile-Isolate mit unterschiedlicher Passageanzahl aus verschiedenen Laboratorien sowie zwei Priscilla- und zwei S-Isolate. Die Größe der Sequenzmotive betrug zwischen sechs und 21 Bp. Die Anzahl der Wiederholungen lag zwischen zwei und 18 pro *Locus* und die Anzahl der verschiedenen Allele pro *Locus* zwischen drei und sechs.

Anhand der Passageanzahl konnten die Autoren zeigen, dass die ausgewählten TRs konserviert sind. Die 21 untersuchten Coxiellen-Isolate wurden in fünf genomische Cluster und in neun verschiedene MLVA-Typen eingeteilt. Erstaunlicherweise gehörte ein in Österreich isolierter Stamm, nämlich RAK8, zum selben MLVA-Typ wie das Nine Mile-Isolat. Dies zeigte, dass derselbe Genotyp in verschiedenen Kontinenten auftreten kann (Svraka et al., 2006).

Arricau-Bouvery et al. (2006) benutzten weitere TRs von *C. burnetii*, die sie in zwei Markergruppen einteilten. Die erste Gruppe enthielt 10 Minisatellitenmarker mit Sequenzmotiven größer als neun Bp, die mittels Agarosegelelektrophorese analysiert wurden. Die zweite Gruppe umfasste sieben Mikrosatelliten (zum größten Teil aus Svraga et al., 2006) mit höheren Diskriminierungseigenschaften. Die insgesamt 42 untersuchten *C. burnetii*-Isolate konnten mit den Markern der ersten Gruppe in 22

Genotypen und mit den Markern aus beiden Gruppen in 36 Genotypen eingeteilt werden. Anhand der Ergebnisse wiesen die Autoren eine Korrelation der MLVA-Genotypen mit der Plasmidausstattung nach.

#### 2.1.4 Virulenzfaktoren

Über Virulenzfaktoren bei *C. burnetii* ist bisher wenig bekannt. Die Einstufung eines Kandidaten (Protein, Gen, Lipopolysaccharid, u. a.) als vermeintlichen Virulenzfaktor geschah bisher immer in Analogie zu anderen Bakterienspezies, bei denen dieses Gen als Virulenzgen bekannt war. Der Grund für dieses Defizit ist die Schwierigkeit Coxiellen genetisch zu manipulieren, um so anhand von Mutanten zu zeigen, dass bestimmte Gene essentiell für z. B. die Besiedlung der Zellen und das Überleben in den Phagolysosomen sind. (Samuel et al., 2003). Die Komplet-Sequenzierung des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 (Seshadri et al., 2003) erlaubte die Suche nach weiteren Gensequenzen, die Homologien zu Genen anderer Bakterien zeigen, die bekanntermaßen Virulenzfaktoren kodieren. Andere Autoren benutzten saure, axenische Medien um Proteine und Nukleisäuren, die vermutlich in den ersten Stadien der Infektion auftreten, zu isolieren (Thompson et al., 1990).

#### Lipopolysaccharid (LPS)

Wie bei allen gram-negativen Bakterien, enthält die Zellwand der Coxiellen LPS (Amano et al., 1984; McCaul et al., 1991), welche eine wichtige Rolle in der Pathogenität der Bakterien spielt. Coxiellen der virulenten Phase I, die aus immunkompetenten Wirten isoliert werden, besitzen ein komplexes langkettiges LPS (Amano et al., 1984; Schramek et al., 1982). Werden die Coxiellen in nicht immunkompetenten Systemen passagiert, kommt es zu spontanen Mutationen im Genom (Vodkin et al., 1986a), die eine progressive Verkürzung des LPS bewirken (Denison et al., 2006; Lukacova et al., 1993). Dies kann bis zu einer kompletten Eliminierung der O-spezifischen Seitenkette des LPS führen (Toman et al., 1996). Mittels monoklonaler Antikörper, die spezifisch an die unterschiedlich langen LPS-Ketten binden, konnten aus den Isolaten der einzelnen Passagen zwei weitere intermediäre Phasen zwischen Phase I und Phase II nachgewiesen werden (Hotta et al., 2002).

Die genaue Rolle des LPS bei der Virulenz ist noch nicht geklärt. Anders als erwartet ist es jedoch 100 bis 1000 Mal weniger toxisch als das von *Escherichia coli* oder

*Salmonella typhimurium* (Amano et al., 1987). Dennoch sind Coxiellen der Phase I im Gegensatz zu Coxiellen der Phase II in der Lage, immunkompetente Wirte zu infizieren (Andoh et al., 2005; Hackstadt, 1990; Lukacova et al., 2007; Moos et al., 1987). Shannon et al. (2005) stellten die Hypothese auf, dass das langkettige LPS der Phase I die Toll-like Rezeptor-Liganden vor den Zellen der angeborenen Immunantwort maskiert. Dies verhindert die Aktivierung der dendritischen Zellen und ermöglicht die Replikation der Erreger ohne dass die dendritischen Zellen heranreifen und Zytokine, die üblicherweise als Antwort auf Coxiellen der Phase II auftreten, ausgeschieden werden können. Andere Autoren sprechen von einem Zusammenspiel zwischen der LPS-, Polypeptidausstattung sowie der Virulenz des Isolates (To et al., 1998a).

#### **Typ IV-Sekretions-System**

Typ IV-Sekretions-Systeme sind bei der horizontalen Genübertragung zwischen Bakterien, wie z. B. der Übertragung von Genen für Antibiotikaresistenzen oder Virulenzeigenschaften (Juhas et al., 2008), beteiligt. Manche Bakterien haben diese Systeme adaptiert um Proteine und Nukleoproteine, welche eine wichtige Rolle für die Virulenz der Bakterien spielen, durch die Zellmembran zu transportieren (Sexton et al., 2002). Auch Coxiellen exprimieren ein Typ IV-Sekretions-System, welches dem Dot/Icm-System von *Legionella pneumophila* (Zamboni et al., 2003) sehr ähnlich ist. Die entsprechenden Gene sind bei Coxiellen jedoch -im Gegensatz zu den Legionellen- in einem zusammenhängenden Genombereich gruppiert (Segal et al., 2005) und stehen unter Kontrolle des *pmrA*-Genregulators (Zusman et al., 2007). Bisher ist die genaue Funktion dieses Typ IV-Sekretions-Systems bei *C. burnetii* noch unklar. Es konnten aber *C. burnetii*-Effektorproteine (Ankyrine, TPR, CCD) nachgewiesen werden, die mit Hilfe des Systems transportiert werden könnten (Pan et al., 2008; Voth et al., 2007). Die Autophagie der Coxiellen durch die Zelle und die Reifung der parasitophoren Vakuole könnten durch diese Effektoren begünstigt werden (Gutierrez et al., 2005; Voth et al., 2009). Außerdem ist es möglich, dass durch den Einfluss der Effektoren auf die Mitochondrien und die Cytochrom C-Freisetzung die Apoptose der Zelle verhindert wird (Luhmann et al., 2007).

#### **Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Alkalische Phosphatase (ACP)**

In der Literatur finden sich bisher noch keine sicheren Angaben darüber, wie die Coxiellen in der sauren Umgebung der Vakuolen überleben können. Basierend auf dem Wissen, dass Coxiellen verschiedene Enzyme, wie z. B. SOD, Katalase und ACP, ausscheiden, wird vermutet, dass diese Enzyme für das Überleben in diesem Milieu

eine Rolle spielen (Baca et al., 1994; Samuel et al., 2003). Die SOD wandelt Superoxidationen zu Wasserstoffperoxid um, welches wiederum von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff gespalten wird. Die ACP hemmt vermutlich den *respiratory burst* der Neutrophilen (Baca et al., 1993; Li et al., 1996). Dazu besitzt *C. burnetii* ein effektives und funktionelles DNA-Reparatursystem (*SOS system*), welches von *recA*, *ruvABC* und *addAB* gesteuert wird (Mertens et al., 2008). Dieses System dient dazu, das Genom bei oxidativem Stress zu reparieren bzw. zu stabilisieren (Mertens et al., 2005).

### ***Ferric uptake regulator (FUR)-System***

Gram-negative Bakterien wie *C. burnetii* verfügen über ein FUR-System regulierte Eisenaufnahme. Samuel et al. (2003) gaben an, dass das FUR-System ein wichtiges Virulenzmerkmal der Coxiellen für das Überleben innerhalb der Vakuole darstellt. In anderen Studien wurde jedoch über ein erhöhtes Risiko vermehrter Radikalbildung bei Eisenüberschuss berichtet (Briggs et al., 2005), woraus die Autoren schlossen, dass der Erreger auf Grund seines geringen Eisenbedarfs nur über wenige FUR-regulierte Gene verfügt (Briggs et al., 2008).

### ***Acute disease antigen A (adaA) Gen***

Über die Bedeutung des *adaA* Gens wurde schon in Kapitel 2.1.3.1 berichtet.

### ***Macrophage Infectivity Potentiator (Mip)***

Mip ist einer der Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila* (Cianciotto et al., 1989; Mo et al., 1995) und wurde ebenfalls bei *C. burnetii* nachgewiesen (Cb mip). Mo et al. (1995) gelang es Cbmip zu klonieren. Alles weist darauf hin, dass Mip und Mip-ähnliche Proteine eine Rolle beim Transport und bei der Faltung der Proteine spielen, so dass ihre enzymatische Aktivität mit der Fähigkeit des Erregers eine Infektion auszulösen im Zusammenhang stehen könnte (Mo et al., 1995). Die *cbmip*-Sequenzen sind in japanischen, europäischen und amerikanischen *C. burnetii*-Isolaten hochkonserviert, weshalb keine Unterschiede in der Virulenz anhand dieser Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Masuzawa et al., 1997).

### ***MucZ***

Zuber et al. (1995) konnten bei *C. burnetii* einen DNA-Abschnitt identifizieren, welcher eine hohe Homologie zum *mucZ Open reading frame* von *Escherichia coli* besitzt. Nach Klonierung und Überexpression dieses Fragments in *Escherichia coli* wird die

Synthese einer mukoiden Kapsel induziert. Da Coxiellen keine Kapsel besitzen, konnte bislang kein Hinweis auf den Beitrag von MucZ zur Pathogenität dieses Erregers nachgewiesen werden.

### **SCV- und LCV-spezifische Proteine**

Coxiellen können in drei verschiedenen morphologischen Formen vorkommen, nämlich als Kleinzellvariante (*small cell variant*, SCV), als Großzellvariante (*large cell variant*, LCV) und als sporenähnliche Partikel (*spore like forms*) (McCaul et al., 1981). Die morphologischen intrazellulären Änderungen von SCV zu LCV werden als Kern der unterschiedlichen Virulenz bei *C. burnetii*-Isolaten betrachtet (Coleman et al., 2007). McCaul et al. (1991) ermittelten ein 29,5 kDa Protein, das P1 Protein, welches vor allem bei der LCV-Form synthetisiert wird. Das kodierende Gen für P1 sowie seine Porinaktivität wurden von Varghees et al. (2002) beschrieben. Andere Proteine, die vor allem in der LCV-Form exprimiert werden, sind EF-Tu, EF-TS und RpoS (Melnicakova et al., 2003; Seshadri et al., 1999; Seshadri et al., 2001). Zwei DNA-bindende Proteine, nämlich ScvA und Hq1 werden vorwiegend bei der SCV-Form sezerniert und spielen vermutlich eine Rolle für die Bildung des kondensierten Nukleoids (Heinzen et al., 1996a; Heinzen et al., 1996b). Die Proteine befinden sich im Zytoplasma und werden beim Übergang der SCV- in die LCV-Form abgebaut (Norlander, 2000).

### **2.1.5 Infektionen bei Mensch und Tier**

Q-Fieber bezeichnet die durch *C. burnetii* beim Menschen verursachte Krankheit. Der Verlauf der Krankheit kann akut oder chronisch sein.

Die akute Form äußert sich zumeist in grippeähnlichen Symptomen mit hohem Fieber, gelegentlich auch als Pneumonie oder Hepatitis. Oft kommt es in der Praxis auf Grund dieser unspezifischen Symptome zu einer falschen klinischen Diagnose (Fournier et al., 1998a; Raoult, 1996).

Der chronische Krankheitsverlauf kann nach einem Monat (Fenollar et al., 2001) bis zu mehreren Jahren nach dem akuten Q-Fieber bzw. auch ohne vorherige akute Symptomatik auftreten (Wilson et al., 1976) und manifestiert sich meistens durch eine Endocarditis.

Von chronischem Q-Fieber sind besonders Patienten mit bereits bestehenden Herz-Kreislauf-Beschwerden, oder einer bestehenden Immunschwäche betroffen (Fournier et al., 1998b; Marrie, 2003).

Verschiedene Autoren versuchten eine Verbindung zwischen den beiden klinischen Verlaufsformen und den phänotypischen sowie genetischen Eigenschaften der jeweiligen *C. burnetii*-Isolate zu finden. Unterschiede wurden im Lipopolysaccharid- und DNA-Restriktionsfragmentmuster, sowie dem Plasmidtyp beschrieben (Hackstadt et al., 1985; Hendrix et al., 1993; Samuel et al., 1985), allerdings konnte keine absolute Korrelation zur Klinik hergestellt werden.

Bis vor kurzem gab es kein Tiermodell um akute bzw. chronische Krankheitsverläufe nach Infektion mit *C. burnetii* zu erzeugen. In den letzten Jahren wurden *Knockout*-Mäuse mit defektem Immunsystem (SCID Mäuse) für diese Zwecke erfolgreich eingesetzt. Der Vorteil dieser Mäuse besteht darin, dass, im Gegensatz zu Mäusen die künstlich immunsupprimiert wurden, über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Immunantwort erfolgt. Mit Hilfe dieses Tiermodells konnte gezeigt werden, dass große Unterschiede in der Virulenz der Phase I- und der Phase II-Stämme (Andoh et al., 2005), sowie zwischen den verschiedenen *C. burnetii*-Isolaten (Stein et al., 2005) bestehen. Die Meinung, dass bestimmte *C. burnetii*-Isolate *per se* entweder eine akute oder chronische Krankheit verursachen können, rückt, basierend auf diesen Ergebnissen, immer weiter in den Hintergrund (Andoh et al., 2003). Vielmehr wird die These bestätigt, dass die Interaktionen zwischen dem einzelnen Wirt und den Coxiellen Ursache für den akuten oder chronischen Krankheitsverlauf sind. Diese Schlussfolgerung wird auch dadurch untermauert, dass die Mehrheit der chronischen Fälle bei Patienten zu finden ist, die an Kreislauferkrankungen leiden (Micoud et al., 1991) oder eine geschwächte Immunabwehr besitzen (Raoult et al., 1990). Stein et al. (1993a) gehen aus diesem Grund davon aus, dass chronische Fälle von Q-Fieber nicht nur von der genetischen Ausstattung der Erreger beeinflusst werden, sondern auch von dem physischen Zustand des Wirtes. Diese These konnte von Meghari et al. (2006) bestätigt werden, die eine Abhängigkeit zwischen Ausprägung der Krankheit und Art der Immunantwort auf bestimmte Isolate fanden.

### 3 METHODODEN

#### 3.1 Herstellung von Keim-Suspensionen

##### 3.1.1 Anzüchtung und Vermehrung

Die verwendeten *C. burnetii*-Isolate (**Tab. 1**) wurden, nach dem von Arens (1983) beschriebenen Verfahren, kontinuierlich in Buffalo Green Monkey (BGM-) Zellkulturen vermehrt. Die Kultivierung von *C. burnetii* erfolgte auf Deckgläschen in Polystyrolröhrchen in T 25-, T 75- oder T 175-Flaschen mit MEM als Zellkulturmedium. Der konfluente BGM-Zellrasen in den Polystyrolröhrchen wurde mit 500 µl der jeweiligen *C. burnetii*-Suspension und mit 1,5 ml WMOA bedeckt. Anschließend erfolgte bei 30 °C eine Zentrifugation im Ausschwingrotor für 1 Stunde bei 3.000 x g. Nach 3 bis 10 Tagen Inkubation bei 37 °C und täglicher Kontrolle mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden die infizierten Zellen mittels Ultraschall (20 kHz, Leistungsstufe 3, 3-4 s) aufgeschlossen. Das entstandene Lysat diente als Inokulum für Zellkulturen in T 75-Flaschen. Nach ca. 6 Tagen Inkubation bei 37 °C konnten die infizierten Zellen abgeschabt und für die Infektion von Zellen in größeren Zellkulturflaschen (T 175) verwendet werden. Jeweils nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem die Überstände der infizierten Zellen geerntet wurden.

##### 3.1.2 Isolate

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. burnetii*-Isolate sind in **Tab. 1** zusammengefasst.

**Tab. 1:** Überblick über die Daten der verwendeten *C. burnetii*-Isolate.

Nr.	Isolat Name	Isolierung			Klinik	Herkunft
		Jahr	Wirtsspezies	Region		
IHIT.						
Cb.-1	CS-P 31	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	A
2	CS-F	unbek.	unbek.	Slowakei	unbek.	A
3	CS-L 35	unbek.	Mensch	unbek.	unbek.	A
4	CS-Florian	unbek.	Mensch	Slowakei	unbek.	A
5	CS-Z 57	unbek.	unbek.	Slowakei	unbek.	A
6	CS-R	unbek.	Mensch	Italien	unbek.	A

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Nr.	Isolat Name	Isolierung			Klinik	Herkunft
		Jahr	Wirtsspezies	Region		
7	Henzerling	1945	Mensch	Italien	Pneumonie ak. Q-Fieber	B
9	Andelfingen	1965	Rind	Schweiz	unbek.	C
10	CS-S1	1970er	Rind	Russland	unbek.	A
11	Soyta	1965	Rind	Schweiz	unbek.	C
12	Boren	unbek.	Rind	unbek.	unbek.	B
13	CS-27	1968	Zecke	Slowakei	-	A
14	CS-48	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
16	CS-1/IIA	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
17	CS-KL 1	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
18	CS-KL 3	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
19	CS-KL 4	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
20	CS-KL 5	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
21	CS-KL 6	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
22	CS-KL 7	unbek.	Zecke	Slowakei	-	A
23	CS-KL 8	1989	D. reticulatus	Slowakei	-	A
24	CS-KL 9	1989	I. ricinus	Slowakei	-	A
25	CS-KL 10	1989	I. ricinus	Slowakei	-	A
26	CS-KL 11	1989	D. marginatus	Slowakei	-	A
27	Nine Mile*	1935	Zecke	USA	-	D
28	Utvinis	unbek.	Mensch	Rumänien	Pneumonie	B
29	Stanița	unbek.	Mensch	Rumänien	Pneumonie	B
30	Geier	unbek.	Mensch	Rumänien	Pneumonie	B
31	Balaceanu	unbek.	Mensch	Rumänien	Pneumonie	B
32	Brasov	unbek.	Mensch	Rumänien	Pneumonie	B
33	CS-S	unbek.	Pfau	USA	unbek.	A
34	CS-Ixodes	1962	I. ricinus	Russland	-	A
35	RT 1140	1954	Mensch	Russland	Pneumonie	E
36	RT-Schperling	1955	Mensch	Kirgistan	Fieber	E
37	RT-1	1958	Maus	Russland	unbek.	E
38	RT-III	1962	I. ricinus	Russland	-	E
39	CS-KmenL	1978	unbek.	unbek.	unbek.	A
40	CS-BUD	1978	(Rind)	unbek.	unbek.	A
41	CS-DER	1985	Dermacentor	Mongolei	-	A
42	CS-Polsko	1989	I. ricinus	Polen	-	A
43	Z 2534/90	1990	Ziege	Österreich	unbek.	C
44	Hardthof/90	1990	Rind	Deutschland	unbek.	C
45	Z 2775/90	1990	Rind	Deutschland	unbek.	C
47	F-1	1978	Mensch	Frankreich	Endokarditis	G
48	F-2	1978	Mensch	Frankreich	ak. Q-Fieber	G
49	F-3	1978	Mensch	Frankreich	Endokarditis	G
50	F-4	1978	Mensch	Frankreich	Endokarditis	G
51	F-5	1978	Mensch	Frankreich	ak. Q-Fieber	G
53	F-7	1978	Mensch	Frankreich	Endokarditis	G
54	F-8	1978	Mensch	Frankreich	ak. Q-Fieber	G
55	F-9	1978	Mensch	Frankreich	ak. Q-Fieber	G
56	F-10	1978	Mensch	Frankreich	Endokarditis	G
57	S-1	1990	Schaf	Schweden	unbek.	F
58	S-4	1990	Schaf	Schweden	unbek.	F
59	Z 3027/91	1991	Rind	Deutschland	unbek.	C

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Nr.	Isolat Name	Isolierung			Klinik	Herkunft
		Jahr	Wirtsspezies	Region		
60	Z 3055/91	1991	Schaf	Deutschland	unbek.	C
61	Z 3205/91a	1991	Rind	Deutschland	Abort	C
62	Z 3205/91b	1991	Rind	Deutschland	Abort	C
63	Namibia	1991	Ziege	Namibien	unbek.	H
64	CS-Dayer	1991	Zecke	Slowakei	-	A
65	Z 3351/92	1992	Rind	Deutschland	Abort	C
66	Z 3567/92	1992	Rind	Deutschland	Abort	C
67	Z 3568/92	1992	Rind	Deutschland	Abort	C
68	Z 3749/92	1992	Rind	unbek.	unbek.	I
69	Z 3464/92	1992	Ziege	Deutschland	Abort	C
70	Z 3468-5/92	1992	Schaf	Deutschland	unbek.	C
71	Z 3478/92	1992	Schaf	Deutschland	Abort	C
72	Z 3574-1/92	1992	Schaf	Deutschland	unbek.	C
73	Z 3574-2/92	1992	Schaf	Deutschland	unbek.	C
74	Z 3574-3/92	1992	Schaf	Deutschland	unbek.	C
76	Z 4313/93	1993	Schaf	Deutschland	Abort	C
77	Z 4485/93	1993	Schaf	Deutschland	Abort	C
78	Z 4488/93	1993	Schaf	Deutschland	Abort	C
79	Z 104/94	1994	Schaf	Deutschland	unbek.	C
80	Z 257/94	1994	Rind	Deutschland	unbek.	C
81	Z 349-36/94	1994	Schaf	Deutschland	unbek.	C
82	Z 410/94	1994	Rind	unbek.	Abort	C
83	Z 488/94	1994	Rind	Deutschland	Abort	C
84	J-1	unbek.	Rind	Japan	unbek.	J
85	J-3	unbek.	Rind	Japan	unbek.	J
86	J-27	unbek.	Rind	Japan	unbek.	J
87	J-60	unbek.	Rind	Japan	unbek.	J
88	J-82	unbek.	Rind	Japan	unbek.	J
89	M-34	1994	Rind	unbek.	unbek.	C
90	C-1	unbek.	unbek.	China	unbek.	F
91	C-2	unbek.	unbek.	China	unbek.	F
92	C-3	unbek.	unbek.	China	unbek.	F
93	Z 163/95	1995	Rind	unbek.	unbek.	C
94	Z 688/95	1995	Rind	unbek.	unbek.	C
95	Z 66/96	1996	Ziege	Deutschland	Abort	C
96	Z 416/96	1996	Mensch	S.-Arabien	Endokarditis	C
97	W-1	1996/97	Schaf	unbek.	unbek.	L
98	W-2	1996	Ziege	unbek.	Abort	L
99	W-3	1997	Damwild	Deutschland	Abort	L
100	W-4	1996/97	Schaf	Deutschland	Abort	L
101	W-5	1996/97	Schaf	Deutschland	Abort	L
102	W-6	1998	Rind	unbek.	unbek.	L
103	Z 346/99	1999	Schaf	Deutschland	Abort	C
104	Z 502/99	1999	Rind	unbek.	unbek.	C
105	Z 232-3/02	2002	Rind	Deutschland	unbek.	C
106	Frankfurt	1982	Rind	Deutschland	unbek.	C
107	München	1969	Schaf	Deutschland	unbek.	M

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Nr.	Isolat Name	Isolierung			Klinik	Herkunft
		Jahr	Wirtsspezies	Region		
108	Herzberg	unbek.	Mensch	Griechenland	unbek.	F
110	Dugway <sup>#</sup>	1958	Nager	USA	unbek.	D
111	Priscilla Q177	1980	Ziege	USA	Abort	D
112	Scurry Q217	1981	Mensch	USA	Hepatitis	D

**Erläuterung:**

\* Nine Mile RSA493

# Dugway 5J108-111

A = Bratislava/Slovakei

B = Institut Cantacuzino, Bukarest/Rumänien

C = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig Universität, Gießen/Deutschland

D = Washington/USA

E = Gamaleya-Institut, Moskau/Russland

F = unbekannt

G = Unite des Rickettsies, Marseille/Frankreich

H = TA Kolb, Windohek/Namibien

I = Bayer AG, Leverkusen/Deutschland

J = Gifu Universität, Gifu city/Japan

L = BFAV, Wusterhausen; Deutschland

M = LMU, München; Deutschland

**3.1.3 Zelllinien**

Als Zelllinie zur Vermehrung der *C. burnetii*-Isolate wurden Buffalo Green Monkey-Zellen (BGM-Zellen, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems/Deutschland) verwendet.

**3.1.4 Aufreinigung**

Die geernteten Zellkulturüberstände wurden bei 14.300 x g im Festwinkelrotor JA-10 für 1 Stunde bei 5 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5-10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation im Festwinkelrotor (39.200 x g, 45 min, 5 °C). In der anschließenden Ultraschallbehandlung der in 10 ml einer 0,9 % igen NaCl resuspendierten Pellets wurden die sedimentierten Zellen aufgeschlossen. Darauf folgte eine niedertourige Zentrifugation (484 x g, 10 min, 5 °C) zur Abtrennung des Zelldetritus von den Erregern. Der *C. burnetii*-haltige Überstand wurde nun bei 39.200 x g für 45 min bei 5 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 -1000 µl steriler 0,9 % NaCl resuspendiert und bis zur Quantifizierung bei 4 °C aufbewahrt. Die Lagerung der aufgereinigten und quantifizierten *C. burnetii*-Prüfsuspension erfolgte bei -70 °C.

### 3.1.5 Mikroskopische Bestimmung der Partikelzahl

Für die mikroskopische Quantifizierung der *C. burnetii*-Suspensionen wurden diese 1:50, 1:100 bzw. 1:200 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und je 10 µl dieser Verdünnungen auf 1 cm<sup>2</sup> eines Objektträgers aufgetragen. Die Giménez-Färbung der Erreger erfolgte nach Antrocknung und anschließender Methanolfixierung. Mit dem Mikroskop Leica DMR wurde die Anzahl der Erreger je Flächeneinheit mit Hilfe eines Zählkulars bestimmt. Die Partikelzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Partikelkonzentration [C. burnetii-Partikel/ml]} = \Sigma c_i \times M_x \times v_i \times 100$$

$\Sigma c_i$  = Anzahl der gezählten Coxiellen in 100 Kleinstquadraten

(entspricht 1 cm<sup>2</sup> im Zählkular)

$M_x$  = Multiplikationsfaktor zur Flächenkorrektur des Blickfeldes bei x-facher Vergrößerung

$$\begin{aligned} M_{(10 \times 100\text{-fach})} &= \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{10.000 \mu\text{m}^2} = 10.000 \\ M_{(10 \times 40\text{-fach})} &= \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{62.500 \mu\text{m}^2} = 1.600 \\ M_{(10 \times 20\text{-fach})} &= \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{250.000 \mu\text{m}^2} = 400 \end{aligned}$$

$v_i$  = Verdünnungsfaktor der Coxiellensuspension

### 3.1.6 Inaktivierung

Um die aufgereinigten Isolate zu inaktivieren, wurden diese bei 96 °C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Die Überprüfung des Inaktivierungserfolges geschah indem vier PS-Röhrchen mit konfluentem BGM-Zellrasen auf den Deckgläschen mit den inaktivierten Coxiellen versetzt wurden. Die inokulierte Dosis betrug bei zwei der Polystyrolröhrchen jeweils 10<sup>5</sup> *C. burnetii*-Partikel und bei den anderen beiden 10<sup>8</sup> *C. burnetii*-Partikel. Nach dem Aufzentrifugieren der Bakterien (3.000 x g, 30 °C, 1 h) erfolgte die Inkubation der Kulturen bei 37 °C. Jeweils fünf bis sieben Tage *post inoculationem* wurden die eukaryotischen Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat auf frischen BGM-Zellkulturen passagiert. Die Inaktivierung wurde als „erfolgreich“

bewertet, wenn nach der vierten Passage mittels Phasenkontrastmikroskopie keine erregerehaltigen Vakuolen nachweisbar waren.

### 3.1.7 Gimenez-Färbung

Die auf den Objektträgern aufgetragenen, luftgetrockneten *C. burnetii*-Suspensionen wurden 1 Stunde im Methanolbad fixiert. Es folgte eine 10-minütige Färbung mit der Karbolfuchsin-Gebrauchslösung und danach mit Malachitgrün (0,8 %; 2 x 1 min). Vor und nach dem Färben wurden die Objektträger jeweils mit *A. dest.* gewaschen. Anschließend wurden die Präparate unter dem Mikroskop beurteilt.

## 3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### 3.2.1 Präparation bakterieller Gesamt-DNA

100 µl einer in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten inaktivierten Coxiellensuspension (f. c.  $1 \times 10^7$  Partikel/µl) wurden mit Proteinase K (f. c. 1,5 µg/µl) für 2 h bei 56 °C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 100 °C behandelt.

Zur Präparation bakterieller Gesamt-DNA für die XL-PCR wurde eine aktive Coxiellensuspension in TE-Puffer verdünnt (f. c.  $1 \times 10^7$  Partikel/µl) und mit Proteinase K (f. c. 0,2 µg/µl) bei 56 °C über Nacht inkubiert. Die Proteinase K wurde dann durch Zugabe von PMSF (f. c. 1 mM; 56 °C, 1 h) inaktiviert. Der Inaktivierungsschritt wurde einmal wiederholt.

Die extrahierte Gesamt-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2 Multiplex-PCR für die Plasmiddifferenzierung und *adaA*-PCR

Für beide PCR-Methoden war der 10 µl PCR-Reaktionsansatz wie folgt:

2 x Mastermix            5 µl

Auftragspuffer	1 $\mu$ l
A. bidest.	2 $\mu$ l
Primermix	1 $\mu$ l
Ziel-DNA	1 $\mu$ l

Der Primermix (16  $\mu$ M) für die Plasmiddifferenzierung mittels Multiplex-PCR bestand aus den Primern QpH1F, QpH1R, QpRSF, QpRSR, QpDVF, QpDVR, ScurryF und ScurryR (2  $\mu$ M je Primer, Tab. 7).

Der Primermix (8  $\mu$ M) für die *adaA*-PCR setzte sich aus den Primern *adaAF*, *adaAR*, Trans 1 und Trans 2 (2  $\mu$ M je Primer) zusammen. Die Primer Trans 1 und Trans 2 amplifizieren eine Transposon-Sequenz, die allen Coxiellen gemeinsam ist und dienen hier als interne Kontrollprimer.

Für beide PCR-Methoden wurden folgende Zyklusparameter verwendet:

Aktivierung der DNA-Polymerase 95 °C, 15 min

Denaturierung	95 °C, 30 s	} 35 Zyklen
Annealing	58 °C, 90 s	
Extension	72 °C, 30 s	

Extension 72 °C, 10 min

### 3.2.3 XL-PCR

Die XL-PCR ist zur Amplifikation großer DNA-Fragmente (bis 40 kb) geeignet. Der Reaktionsansatz für die XL-PCR war wie folgt:

A. bidest.	25,4 $\mu$ l
3,3x XL-Puffer	15,0 $\mu$ l
25 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>	2,2 $\mu$ l
dNTPs (je 4 mM)	4,0 $\mu$ l
Primer (je 20 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
rTth DNA XL-Polymerase	0,8 $\mu$ l
Ziel-DNA	1,0 $\mu$ l

Der Thermocycler (Gene AMP PCR System 9600) wurde wie folgt programmiert:

Aktivierung der DNA-Polymerase	94 °C, 15 min	} 16 Zyklen
Denaturierung	94 °C, 14 s	
Annealing	58 °C, 15 s	
Extension	72 °C, 14 min	
Denaturierung	94 °C, 15 s	} 20 Zyklenzahl
Annealing	58 °C, 15 s	
Extension	72 °C, 14 min ( $\Delta t + 15$ s/Zyklus)	
Amplifikation	72 °C, 7 min	

### 3.2.4 *Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis*

Eine Feinkartierung der *C. burnetii*-Isolate erfolgte mittels der *Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis* (MLVA). Für die Genotypisierung der *C. burnetii*-Isolate wurden 7 verschiedene Primerpaare eingesetzt: Cox1F/Cox1R, Cox2F/Cox2R, Cox3F/Cox3R, Cox4F/Cox4R, Cox5F/Cox5R, Cox6F/Cox6R und Cox7F/Cox7R

**Tab. 9).**

Der PCR-Reaktionsansatz war wie folgt:

2 x Mastermix	5 $\mu$ l
Primermix	4 $\mu$ l (f.c. 0,2 $\mu$ M je Primer)
Ziel-DNA	1 $\mu$ l

Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Zyklusbedingungen statt:

Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C, 15 min	
Denaturierung	95 °C, 30 s	} 24 Zyklen
Annealing	variabel, s.u., 90 s	
Extension	72 °C, 30 s	

Extension 72 °C, 10 min

Die Annealingtemperaturen für die Primerpaare Cox1F/Cox1R, Cox3F/Cox3R und Cox6F/Cox6R betragen 54 °C; für die Primerpaare Cox 2f/Cox2R und Cox5F/Cox5R 57 °C und für das Primerpaar Cox7F/Cox7R 53 °C.

Das Cox4F/Cox4R-Amplifikat konnte auf Grund seiner Größe nicht auf dem LI-COR-System dargestellt werden, deshalb wurden die PCR-Produkte auf einem speziellen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kap. 3.2.6). Auch der PCR-Reaktionsansatz wurde folgendermaßen variiert:

2 x Mastermix	10 µl
Auftragspuffer	2 µl
A. bidest.	4 µl
Primermix	2 µl (f.c. 0,4 µM)
Ziel DNA	2 µl

Die Annealingtemperatur betrug 58 °C und die Zyklen zahl wurde auf 35 erhöht.

### 3.2.5 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Amplifikate der Multiplex-PCR zur Plasmiddifferenzierung und der *adaA*-PCR konnten auf einem 2%igen, die Amplifikate der XL-PCR auf einem 1%igen Agarosegel bei 1,25 V/cm für 45-60 min aufgetrennt werden. Dazu wurden 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl 6X *Loading Dye* auf einem Parafilm gemischt und davon 10 µl auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente bei der Multiplex- und *adaA*-PCR eine 100 Bp-Leiter und bei der XL-PCR ein 1 kb-Standard.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente in den Ethidiumbromid-haltigen Gelen (f.c. 0,5 µg/ml) auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und anschließend dokumentiert.

### 3.2.6 Analytische Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Alle Amplifikate der MLVA mussten aufgrund der geringen Längenunterschiede auf Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) aufgetrennt werden. Die Elektrophorese der Amplifikate aus der Cox4-PCR wurde in einer Minigel-Twin-Elektrophoresekammer, die der restlichen Amplifikate in einem LI-COR 4200 DNA Sequencing System durchgeführt.

Die Auftrennung der Amplifikate der Cox4-PCR erfolgte mit einem 5,56%igen PAA-Gel.

Zusammensetzung eines PAA-Gels:

1 x TAE	5,72 ml
30% Acrylamid	0,84 ml

10% Ammoniumperoxodisulfat <sup>1)</sup>	30,00 µl
TEMED	5,00 µl

Die Gellösung wurde zwischen zwei vorbereitete, vertikal angeordnete Glasplatten gegossen und zum Erzeugen von Probestaschen ein Kamm zwischen die Glasplatten eingesetzt. Nach 30 bis 60 min Polymerisation bei 40 °C konnte das Gel in eine Minigel-Twin-Kammer eingehängt und die Kammer mit 1 x TAE als Elektrophoresepuffer gefüllt werden. Die Proben wurden 1:1 mit *Loading Dye* versetzt und jeweils 10 µl in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Die Gene Ruler™ 100 Bp DNA Ladder diente als Größenstandard. Die Elektrophorese fand für 2 h bei 80 V statt. Die Färbung der Gele erfolgte für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (f. c. 0,5 µg/ml), mit anschließender Wässerung für 10 min und Sichtbarmachung sowie Dokumentation auf einem UV-Transilluminator.

Vor der Elektrophorese am LI-COR 4200 mussten die zwei Glasplatten vor dem Gießen des Geles gründlich mit Micro-90 und *A. dest.* gereinigt und zum Schluß mit 70%igem Isopropanol abgegespült werden.

Zusammensetzung zu eines 6%igen Polyacrylamidgeles:

Harnstoff	8,4 g
Long Ranger Gel Solution	2,4 ml
10 x TBE-Puffer	2,4 ml
ad 22,5 g mit <i>A. bidest.</i>	

Unmittelbar vor dem Gießen des Geles wurden 135 µl 10%iges Ammoniumperoxodisulfat und 13,5 µl TEMED zugesetzt. Anschließend wurde die Gellösung zwischen die Glasplatten gegossen. Sobald die Gellösung den unteren Rand der Glasplatten erreicht hatte, konnte der Kamm eingesetzt werden. Nach der Polymerisation des Geles (ca. 1,5 h) konnte es in den LI-COR 4200 DNA Sequencer eingehängt und das obere und untere Pufferreservoir mit 1 x TBE gefüllt werden. Vor dem Auftrag wurden die Proben 1:1 in LI-COR-Auftragspuffer (Gebrauchslösung) verdünnt, für 3 min bei 92 °C inkubiert (Hitzedenaturierung der DNA) und direkt auf Eis abgekühlt. Als Größenstandard dienten PCR-Amplifikate mit folgenden Amplifikatlängen: 71 Bp, 141 Bp, 180 Bp, 225 Bp und 281 Bp.

Zur Konditionierung des Geles erfolgte ein Vorlauf für 15 min unter den gleichen Bedingungen wie für die eigentliche Elektrophorese. Anschließend wurden die Proben und

Größenstandards auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese mit folgendem Parameter durchgeführt: Spannung 1500 V; Stromstärke 40 mA; Leistung 40 W; Temperatur 50 °C; Dauer 120 min. Die Übertragung der Elektrophoresedaten fand in Echtzeit mit Hilfe des Programms e-seq<sup>®</sup> statt. Die Auswertung des Gebildes erfolgte mit dem Programm 1DscanEX.

### 3.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

#### 3.3.1 Herstellung der Agaroseblöckchen für die *contour-clamped homogeneous electric field – pulse field gel electrophoresis* (CHEF-PFGE)

Zur Herstellung der Agaroseblöckchen musste eine Coxiellen-Suspension in 1 x TE-Puffer mit  $2 \times 10^9$  Partikel/ml bei 56 °C in einem Wasserbad vorgewärmt werden. Anschließend wurde diese Suspension zu gleichen Teilen mit einer 56 °C warmen Agarose-Lösung (1% Incert-Agarose in 1 x TE-Puffer) vermischt und in eine spezielle Form (Volumen 100 µl) gegossen. Nach 15 min auf Eis konnten die Blöckchen vorsichtig mit einem Plastikspatel der Form entnommen und bis zum Gebrauch in 1 x TE-Puffer bei 4 °C gelagert werden.

#### 3.3.2 Freisetzung und Verdau der in den Agaroseblöckchen enthaltenen DNA

Die Agaroseblöckchen (Kap. 3.3.1) wurden in 2 Vol. ES-Puffer für 30 min äquilibriert und nach Zugabe von Proteinase K (f. c. 0,5 mg/ml) bei 56 °C über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 1 x TE-Puffer (30 min, RT) erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K mit PMSF (f.c. 1 mM in 1 x TE-Puffer). Um PMSF-Reste zu entfernen wurden die Blöckchen zweimal in 1 x TE-Puffer bei RT gewaschen.

Nach Teilung der Blöckchen erfolgte der Verdau einer Hälfte mit *Not I*-Enzym. Dazu wurden die Blöckchen zunächst 30 min bei RT in *Not I*-Restriktionspuffer äquilibriert und anschließend durch frischen *Not I*-Restriktionspuffer ersetzt. Nach Zugabe des Restriktionsenzym *Not I* (f. c. 10 U/ml) erfolgte der Verdau bei 37 °C für 24 h.

Das Restriktionsenzym wurde nach dem Verdau durch Waschen der Blöckchen für 30 min in 1 x TE-Puffer entfernt.

### 3.3.3 ***Contour-clamped homogeneous electric field – pulse field gel electrophoresis (CHEF-PFGE)***

Für die Durchführung der CHEF-PFGE wurde ein 1%iges MBC-Agarosegel genutzt. In die Taschen des Gels wurden halbierte Blöckchen (Kap. 3.3.2) eingesetzt und anschließend mit Agarose versiegelt. Im Anschluß daran fand eine Elektrophorese mit auf 12 °C vorgekühltem Elektrophoresepuffer (1 x TBE) statt. Als DNA-Größenstandards dienten eine 1 kb-Leiter und ein Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker

Für die Elektrophorese wurden die folgenden Parameter verwendet:

2 – 20 kBp Bereich:

„*FIGE 180°*“-Modus und Pulszeiten von 0,05-0,125 s für 9 h 26 min bei 9 V/cm *Forward* Spannung und 6 V/cm *Reverse* Spannung. Anschließend wurde das Gel für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (f. c. 0,5 µg/ml) gefärbt und 5 min gewässert. Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und bildanalytisch dokumentiert.

20 – 500 kBp Bereich:

„*Multistate*“-Modus und Pulszeiten von 0,1-11 s mit linearem Gradienten für 8 h bei 5 V/cm konstanter Spannung und einem Winkel von 60° bis -60°, gefolgt von Pulszeiten von 9-34 s mit linearem Gradienten für 12 h bei 5 V/cm konstanter Spannung und einem Winkel von 60 bis -60°. Anschließend wurde das Gel für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (f. c. 0,5 µg/ml) gefärbt und 5 min gewässert. Die Darstellung der DNA-Fragmente fand mittels UV-Licht statt.

## 4 ERGEBNISSE

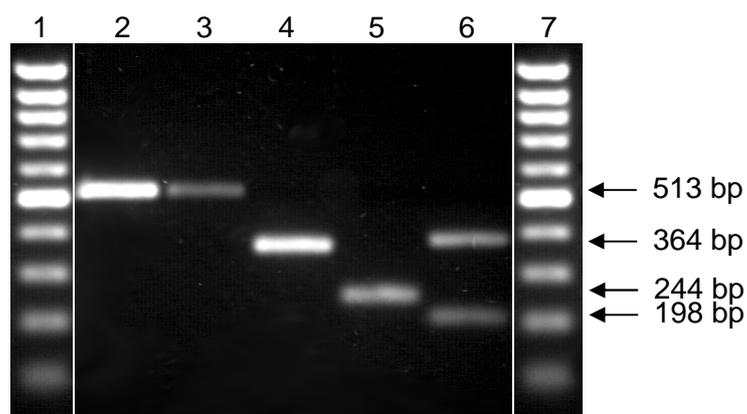
### 4.1 Genetische Charakterisierung von *C. burnetii*-Isolaten

#### 4.1.1 Darstellung der Plasmide mittels Multiplex-PCR

Um die Plasmide der *C. burnetii*-Isolate zu untersuchen wurden für das QpH1-, QpRS- und QpDV-Plasmid sowie für die Plasmid-homologen, ins Genom integrierten Sequenzen spezifische Primer entwickelt.

Für diese Primer wurde eine Multiplex-PCR etabliert, mit der es möglich war, die Plasmidausstattung eines *C. burnetii*-Isolates in nur einer einzigen PCR nachzuweisen.

In **Abb. 1** sind die Amplifikate für die entsprechenden Referenzisolate dargestellt (Spur 2 bis 6). Jedes Produkt hat eine unterschiedliche Größe, wodurch eine Differenzierung der Plasmide ermöglicht wird. Ein unerwartetes Ergebnis wurde bei Isolaten beobachtet, die das QpDV-Plasmid besitzen (Abb.1, Spur 6). Hier entstanden grundsätzlich zwei Amplifikate: ein QpDV-spezifisches Amplifikat (198 Bp) und ein Amplifikat (364 Bp), welches ursprünglich nur bei Isolaten mit dem QpRS-Plasmid gefunden wurde. Weitere Untersuchungen, die zur Klärung dieses unerwarteten Ergebnisses durchgeführt wurden, sind in Kapitel 4.1.2 beschrieben.



**Abb. 1:** Darstellung der plasmidspezifischen Sequenzen von *C. burnetii*-Isolaten mittels Multiplex-PCR mit plasmidspezifischen Primern und anschließender Agarosegelelektrophorese.

Spur 1: Marker (100 Bp Ladder)

Spur 2: *C. b.* „Nine Mile“ (QpH1-Plasmid)

Spur 3: *C. b.* „Dugway 5J108-111“ (QpH1-Plasmid)

- Spur 4: *C. b.* „Priscilla Q117“ (QpRS-Plasmid)
- Spur 5: *C. b.* „Scurry Q217“ (Plasmid-homologe, chromosomal integrierte Sequenz)
- Spur 6: *C. b.* „RT 1140“ (QpDV-Plasmid)
- Spur 7: Marker (100 Bp Ladder)

Von den untersuchten Isolaten besaßen 89 das QpH1-Plasmid, acht das QpRS-Plasmid und fünf das QpDV-Plasmid. Zwei Isolate enthielten die chromosomal integrierten, Plasmid-homologen Sequenzen. (**Abb. 4**).

#### 4.1.2 Vergleichende PCRs für die Plasmide QpRS und QpDV

Auf Grund der unerwarteten Ergebnisse der QpDV-spezifischen PCR (Kap. 4.1.1) war die Etablierung verschiedener PCRs nötig, um das Auftreten eines zusätzlichen Amplifikates bei QpDV-positiven *C. burnetii*-Isolaten abzuklären. Die Primer wurden anhand der für die beiden Plasmide veröffentlichten Sequenzen (ab 14.000 Bp) entwickelt. Entsprechend diesen Sequenzen besitzt QpRS drei exklusive Bereiche (**Abb. 2**), welche beim QpDV-Plasmid nicht vorhanden sind. Bei der Verwendung von QpDV-Primern (QpDVF, QpDVR) aus der Multiplex-PCR (Kap. 4.1.1) mit QpDV-Plasmidsequenzen entstand ein 198 Bp Amplifikat (**Abb. 2**). Bei Vorhandensein der QpRS-Plasmidsequenzen hätte ein über 2000 Bp großes Produkt amplifiziert werden müssen (**Abb. 2**). Unter den Bedingungen der Multiplex-PCR ist es jedoch nicht möglich ein über 2000 Bp großes Produkt zu amplifizieren.

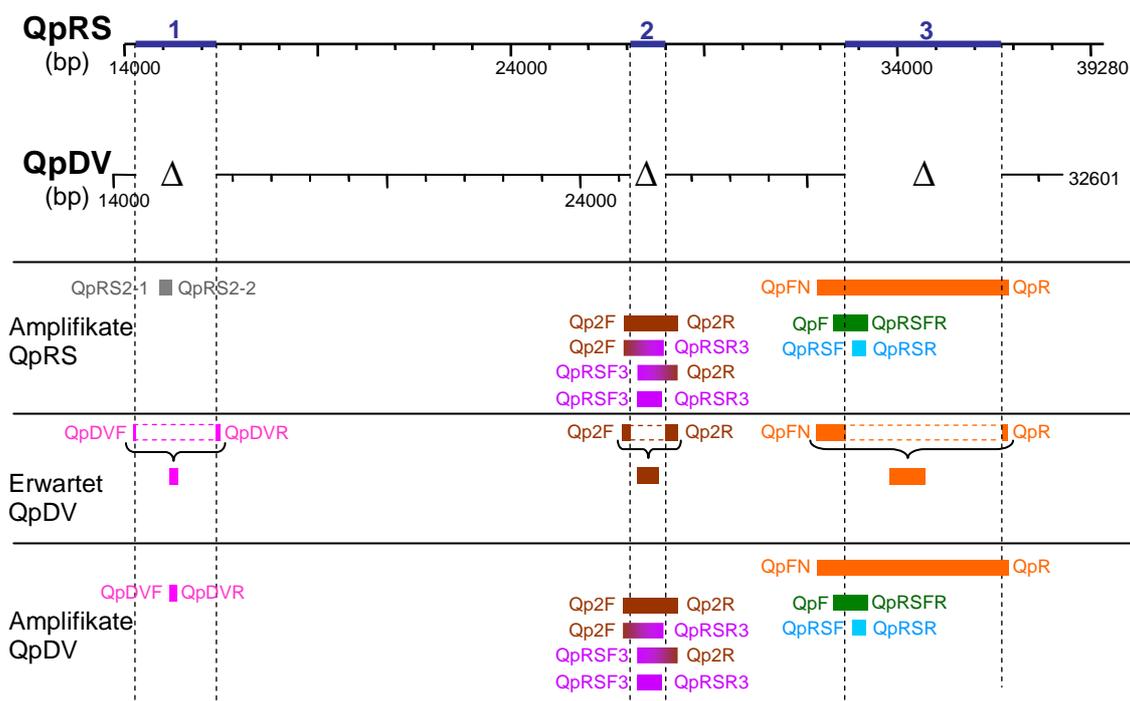
Die QpRS-Primer (QpRSF, QpRSR) aus der Multiplex-PCR (Kap. 4.1.1) binden beim QpRS-Plasmid in dem exklusiven Bereich 3 (**Abb. 2**). Ein Vergleich der Primersequenzen mit den in der Datenbank veröffentlichten Plasmidsequenzen (NCBI Acc.no. NC\_010258 und NC\_002131) ließ erwarten, dass nur bei dem QpRS-Plasmid und nicht bei dem QpDV-Plasmid ein Amplifikat entsteht. Da tatsächlich jedoch auch ein QpRS-spezifisches Amplifikat bei Isolaten mit dem QpDV-Plasmid (**Abb. 1**) gebildet wurde, wurden zwei weitere PCRs für diesen Bereich entwickelt, deren Primer sowohl innerhalb (QpRSFR) als auch außerhalb (QpF, QpFN, QpR) der exklusiven Segmente binden (**Abb. 2**). Auf Grund der in der Datenbank veröffentlichten Sequenzen wurde erwartet, dass unter Verwendung der Primer QpFN und QpR in der XL-PCR bei den Isolaten mit dem QpDV-Plasmid, im Gegensatz zu dem 4921 Bp großen Produkt der

QpRS-Isolate, ein nur 916 Bp großes Amplifikat entstehen würde (**Abb. 2**). Das PCR-Amplifikat für beide Plasmidtypen hatte jedoch die gleiche Größe.

Auch Primer, die für den exklusiven Bereich 2 im QpRS-Plasmid entwickelt wurden, (QpRSF3/QpRSR3) ergaben bei den Isolaten mit dem QpDV-Plasmid ein Amplifikat gleicher Größe. Ebenso wurden die gleichen Amplifikate für beide Plasmidtypen mit Primern gebildet, die den exklusiven Bereich 2 umfassten (Qp2F/Qp2R) bzw. mit Kombinationen von Primern, die einmal innerhalb (QpRSF3, QpRSR3) und einmal außerhalb (Qp2F, Qp2R) des exklusiven Bereiches 2 lagen (**Abb. 2**).

Schließlich wurden zwei neue Primer (QpRS2-1, QpRS2-2) für den exklusiven Bereich 1 des QpRS-Plasmids entwickelt (**Abb. 2**), die sich in der PCR als spezifisch für QpRS erwiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der erste exklusive Bereich spezifisch für Isolate mit dem QpRS-Plasmid ist, während die zweiten und dritten exklusiven Bereiche von QpRS-Isolaten auch in Isolaten mit dem QpDV-Plasmid vorkommen.

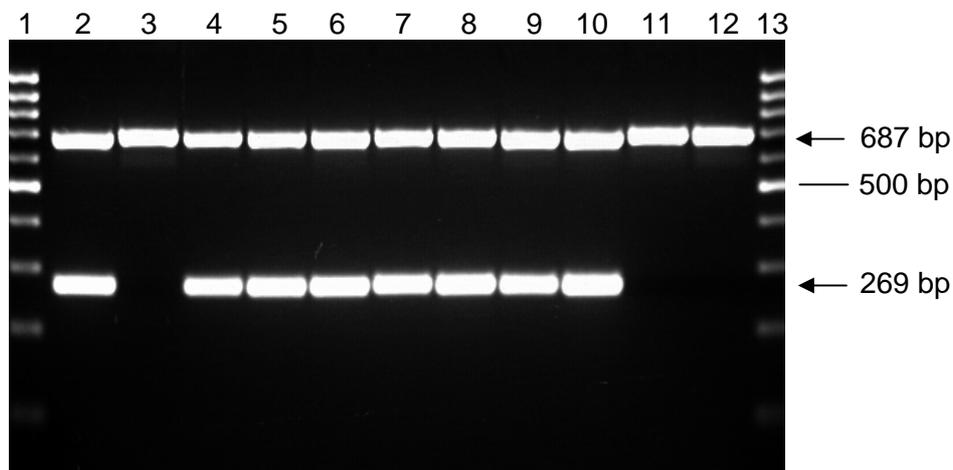


**Abb. 2\*:** Graphische Gegenüberstellung von QpRS- und QpDV-Plasmidsequenzen (ab 14000 Bp) sowie die erwarteten (erwartet QpDV) und die tatsächlich erhaltenen PCR-Produkte (Amplifikate QpDV).

\* 1, 2, 3: laut Datenbankeintrag (NCBI Acc. no. NC\_010258 und NC\_002131) exklusive Bereiche für das QpRS-Plasmid  
 Δ: laut Datenbankeintrag (NCBI Acc. no. NC\_010258 und NC\_002131) im QpDV-Plasmid deletierte Bereiche

#### 4.1.3 Nachweis des *acute disease antigen A (adaA)*-Gens

Eine PCR mit dem Primerpaar *adaAF* und *adaAR* ergab mit der Gesamt-DNA der *C. burnetii*-Isolate, die das *adaA*-Gen besitzen, ein 269 Bp großes Amplifikat (**Abb. 3**). Bei allen PCR-Reaktionen wurde eine interne Kontrolle mitgeführt (Primer Trans-1 und Trans-2), die an ein Transposase kodierendes Gen von *C. burnetii* bindet und ein 687 Bp großes Produkt ergab (**Abb. 3**). Diese Sequenz wiederholte sich mehrmals im Genom von *C. burnetii* und wurde bis jetzt bei allen untersuchten Isolaten gefunden. Daher sollte die interne Kontrolle bei allen *C. burnetii*-Isolaten positiv sein. Ein negatives Ergebnis für die interne Kontrolle deutet auf einen Fehler in der Durchführung der PCR hin oder auf Inhibitoren für die DNA-Polymerase.



**Abb. 3:** Darstellung des *adaA*-Gens verschiedener *C. burnetii*-Isolate mittels Duplex-PCR (687 Bp-Bande = Kontrollfragment, 269 Bp-Bande = *adaA*-Fragment) und anschließender Agarosegelelektrophorese.

- Spur 1: Marker (100 Bp Ladder); Spur 2: *C. b.* „Z 3478/92“;
- Spur 3: *C. b.* „Z 3574-1/92“; Spur 4: *C. b.* „Z 3574-2/92“;
- Spur 5: *C. b.* „Z 3574-3/92“; Spur 6: *C. b.* „Z 4485/93“;
- Spur 7: *C. b.* „C-2 Xia Quiao“, Spur 8: *C. b.* „C-3 Qi Yi“,
- Spur 9: *C. b.* „W-2“, Spur 10: *C. b.* „Frankfurt“;
- Spur 11: *C. b.* „Priscilla Q177“; Spur 12: *C. b.* „Scurry Q217“;
- Spur 13: Marker (100 Bp Ladder)

Von 104 untersuchten *C. burnetii*-Isolaten wurde das *adaA*-Gen bei 88 Isolaten nachgewiesen (**Abb. 4**). Bei vier Isolaten (F-8, RT 1140, RT-Schperling und F2), die von Menschen mit akuten Erkrankungen stammten, konnten keine *adaA*-Sequenzen nachgewiesen werden.

**4.1.4 Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)**

Eine genomische Charakterisierung der *C. burnetii*-Isolate wurde mittels MLVA vorgenommen. *Tandem Repeats* entsprechen Mikrosatelliten bei Eukaryonten und stellen Wiederholungen von Sequenzmotiven dar. Eine genomweite Suche nach solchen Motiven wurde erst durch die Komplettssequenzierung des Chromosoms des *C. burnetii*-Isolates „Nine Mile“ möglich.

Für die Genotypisierung der *C. burnetii*-Isolate wurden 7 verschiedene Sequenzmotive herangezogen. Die Sequenzmotive wurden mit Primern, die außerhalb der Sequenzmotive binden, amplifiziert. Anschließend wurden die Amplifikate auf einem Gel aufgetrennt und analysiert. Unterschiede in den Amplifikatlängen spiegeln eine unterschiedliche Anzahl an *Tandem Repeats* wieder und machen so eine Diskriminierung verschiedener Isolate möglich.

Da die Sequenzmotive der *Tandem Repeats* oft nur wenige Basenpaare groß sind und sich die Isolate eventuell nur durch einen *Repeat* oder wenige *Repeats* unterscheiden, war eine Analyse der PCR-Produkte meist nur auf hochauflösenden Polyacrylamidgelen möglich, wie sie bei der Sequenzierung verwendet werden.

Bei den untersuchten *C. burnetii*-Isolaten konnten pro Primerpaar zwischen 4 und 14 verschiedene PCR-Produktgrößen unterschieden werden (**Tab. 2**).

**Tab. 2:** Anzahl der pro Locus amplifizierten PCR-Produkte für die mittels MLVA untersuchten *C. burnetii*-Isolate.

Locus/Primer	Repeat-Größe* (Bp)	Repeat-Sequenz (5'-3')*	Anzahl der PCR-Produkte
#1 Cox1F	6	GAAAAG	9
#1 Cox1R			
#2 Cox2F	6	TGAAGA	4
#2 Cox2R			
#3 Cox3F	9	AGAAAATAA	14
#3 Cox3R			
#4 Cox4F	21	GACAGAAGACGGAAGACGGAA	7
#4 Cox4R			
#5 Cox5F	6	TAAGAA	6
#5 Cox5R			
#6 Cox6F	7	GAGGACA	5
#6 Cox6R			
#7 Cox7F	7	CAGAGGA	4
#7 Cox7R			

**Erläuterung:**

\* = Quelle Svraha *et al.* 2005

Die MLVA-Ergebnisse für die untersuchten Isolate sind in **Tab. 3** zusammengefasst. Aus praktischen Gründen wurde keine Sequenzierung der PCR-Produkte durchgeführt, sondern eine Klassifizierung anhand ihrer Größe vorgenommen. Für jedes Isolat ergab sich ein MLVA-Typ, der sich aus der Produktlänge an den entsprechenden Loci zusammensetzt. Das Isolat CS-P 31 (IHIT.Cb.-1) hat z. B. den MLVA-Typ 4-3-1-6-4-3-4.

**Tab. 3:** Klassifizierung der untersuchten *C. burnetii*-Isolate anhand der für die entsprechenden Loci (#1 bis #7) mittels MLVA ermittelten Produktlänge.

Isolat Nr.	Isolat-Name	Produktlänge am jeweiligen Locus						
		#1* <sup>1</sup>	#2* <sup>2</sup>	#3* <sup>3</sup>	#4* <sup>4</sup>	#5* <sup>5</sup>	#6* <sup>6</sup>	#7* <sup>7</sup>
IHIT.Cb.-								
1	CS-P 31	4	3	1	6	4	3	4
2	CS-F	2	2	10	1	1	1	1
3	CS-L 35	4	3	1	5	4	3	4
4	CS-Florian	2	2	12	1	1	1	1
5	CS-Z 57	2	2	11	1	1	1	1
7	Henzerling	4	3	1	6	4	3	4
9	Andelfingen	3	2	7	1	1	1	1
10	CS-S1	2	2	10	1	1	1	1
11	Soyta	1	3	6	1	1	1	1
12	Boren	4	3	5	5	4	3	4
13	CS-27	2	2	10	2	1	1	1
14	CS-48	2	2	11	1	1	1	1
16	CS-1/IIA	2	2	10	2	1	1	1
17	CS-KL 1	4	3	1	5	4	3	4
18	CS-KL 3	4	3	5	5	4	3	4
19	CS-KL 4	4	3	5	6	4	3	4
20	CS-KL 5	4	3	5	5	4	3	4
21	CS-KL 6	4	3	5	5	4	3	4
22	CS-KL 7	4	3	5	6	4	3	4
23	CS-KL 8	4	3	5	6	4	3	4
24	CS-KL 9	4	3	5	5	4	3	4
25	CS-KL 10	4	3	1	5	4	3	4
26	CS-KL 11	4	3	1	5	4	3	4
27	Nine Mile	4	3	5	5	4	3	4
28	Utvinis	3	2	14	n. n.	1	1	1
29	Stanica	2	2	9	1	1	1	1
30	Geier	2	2	12	1	1	1	1
31	Balaceanu	2	2	12	1	1	1	1
32	Brasov	4	3	5	5	1	3	4
33	CS-S	1	2	3	3	2	3	3
34	CS-Ixodes	2	2	13	2	1	1	1

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Isolat Nr.	Isolat-Name	Produktlänge am jeweiligen Locus						
		#1* <sup>1</sup>	#2* <sup>2</sup>	#3* <sup>3</sup>	#4* <sup>4</sup>	#5* <sup>5</sup>	#6* <sup>6</sup>	#7* <sup>7</sup>
35	RT 1140	1	2	2	2	5	n. n.	2
36	RT-Schperling	1	2	4	n. n.	6	1	2
37	RT-I	2	2	13	1	1	1	1
38	RT-III	2	2	13	1	1	1	1
39	CS-Kmen L	2	2	10	1	1	1	1
40	CS-BUD	2	2	11	1	1	1	1
41	CS-DER	4	2	13	2	1	1	1
42	CS-Polsko	4	3	5	6	4	3	4
43	Z 2534/90	2	1	4	5	1	n. n.	2
44	Hardthof/90	4	3	1	5	4	3	4
45	Z 2775/90	4	3	1	5	4	3	4
47	F-1	1	2	4	n. n.	4	n. n.	2
48	F-2	1	2	n.a.	n.a.	5	2	2
49	F-3	1	3	3	2	3	4	2
50	F-4	1	2	1	1	5	n. n.	2
51	F-5	4	3	5	5	4	3	4
53	F-7	1	3	3	n. n.	3	4	2
54	F-8	1	2	4	1	5	n. n.	2
55	F-9	4	3	5	5	4	3	4
56	F-10	1	2	n.a.	n.a.	5	2	2
57	S-1	1	2	6	1	1	1	1
58	S-4	1	2	6	1	1	1	1
59	Z 3027/91	6	1	5	4	5	2	2
60	Z 3055/91	5	2	5	3	1	n. n.	2
61	Z 3205/91a	7	1	5	4	5	2	2
62	Z 3205/91b	7	1	1	4	5	2	2
63	Namibia	1	2	4	n. n.	4	n. n.	2
64	CS-Dayer	4	3	5	6	4	3	4
65	Z 3351/92	8	1	5	4	5	2	2
66	Z 3567/92	9	1	5	4	3	2	2
67	Z 3568/92	7	1	5	4	5	2	2
68	Z 3749/92	6	1	5	4	5	2	2
69	Z 3464/92	3	2	8	1	1	1	1
70	Z 3468-5/92	3	2	8	1	1	1	1
71	Z 3478/92	3	2	8	1	1	1	1
72	Z 3574-1/92	1	2	8	1	4	n. n.	2
73	Z 3574-2/92	3	2	8	1	1	1	1
74	Z 3574-3/92	3	2	8	1	1	1	1
76	Z 4313/93	3	2	8	1	1	1	1
77	Z 4485/93	3	2	8	1	1	1	1
78	Z 4488/93	3	2	8	1	1	1	1
79	Z 104/94	3	2	8	1	1	1	1
80	Z 257/94	3	2	5	4	5	2	2
81	Z 349-36/94	3	2	8	1	1	1	1

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Isolat Nr.	Isolat-Name	Produktlänge am jeweiligen Locus						
		#1* <sup>1</sup>	#2* <sup>2</sup>	#3* <sup>3</sup>	#4* <sup>4</sup>	#5* <sup>5</sup>	#6* <sup>6</sup>	#7* <sup>7</sup>
82	Z 410/94	7	1	5	4	5	2	2
83	Z 488/94	6	1	5	4	5	2	2
84	J-1	4	3	5	6	4	3	4
85	J-3	4	3	5	6	4	3	4
86	J-27	4	3	5	6	4	3	4
87	J-60	4	3	5	6	4	3	4
88	J-82	4	3	5	6	4	3	4
89	M-34	4	3	5	6	4	3	4
90	C-1	1	5	4	n. n.	3	4	2
91	C-2	2	2	12	1	1	1	1
93	C-3	7	2	d. P	d. P	d. P	d. P	2
93	Z 163/95	7	1	5	4	5	2	2
94	Z 688/95	4	3	5	6	4	3	4
95	Z 66/96	5	2	4	3	1	n. n.	2
96	Z 416/96	1	3	4	n. n.	3	4	2
97	W-1	3	2	7	1	1	1	1
98	W-2	3	2	7	1	1	1	1
99	W-3	3	2	7	1	1	1	1
100	W-4	3	2	7	1	1	1	1
101	W-5	3	2	7	1	1	1	1
102	W-6	3	2	7	1	1	1	1
103	Z 346/99 Cox	3	2	7	1	1	1	1
104	Z 502/99	7	1	5	4	5	2	2
105	Z232-3/02	7	1	5	4	5	2	2
106	Frankfurt	4	2	9	1	1	1	1
107	München	2	2	12	1	1	1	1
108	Herzberg	1	2	6	1	1	1	1
110	Dugway 5J108-111	1	1	5	4	5	n. n.	2
111	Priscilla Q177	1	3	3	n. n.	3	4	2
112	Scurry Q217	1	2	3	1	2	3	3

**Erläuterung:**

d.P. = zwei verschiedene Produktlängen nachgewiesen

n.n. = nicht nachgewiesen

n.a. = nicht analysiert

\*<sup>1</sup> Produktlänge 1: 103-104 Bp, Produktlänge 2: 109-110 Bp, Produktlänge 3: 115-117 Bp, Produktlänge 4: 122-124 Bp, Produktlänge 5: 139-141 Bp, Produktlänge 6: 145 Bp, Produktlänge 7: 150-151 Bp, Produktlänge 8: 155 Bp, Produktlänge 9: 168 Bp

\*<sup>2</sup> Produktlänge 1: 144-147 Bp, Produktlänge 2: 153 Bp, Produktlänge 3: 154-159 Bp, Produktlänge 4: 164 Bp

\*<sup>3</sup> Produktlänge 1: 83-85 Bp, Produktlänge 2: 105 Bp, Produktlänge 3: 124-126 Bp, Produktlänge 4: 137-138 Bp, Produktlänge 5: 146-148 Bp, Produktlänge 6: 182-184 Bp, Produktlänge 7: 190-191 Bp, Produktlänge 8: 198-200 Bp, Produktlänge 9: 217-218 Bp, Produktlänge 10: 225-226 Bp, Produktlänge 11:

232-235 Bp, Produktlänge 12: 251-252 Bp, Produktlänge 13: 267-270 Bp, Produktlänge 14: 289 Bp

\*<sup>4</sup> Produktlänge 1: 205-215 Bp, Produktlänge 2: 218-222 Bp, Produktlänge 3: 234-237 Bp, Produktlänge 4: 244-261 Bp, Produktlänge 5: 325-339 Bp, Produktlänge 6: 340-355 Bp

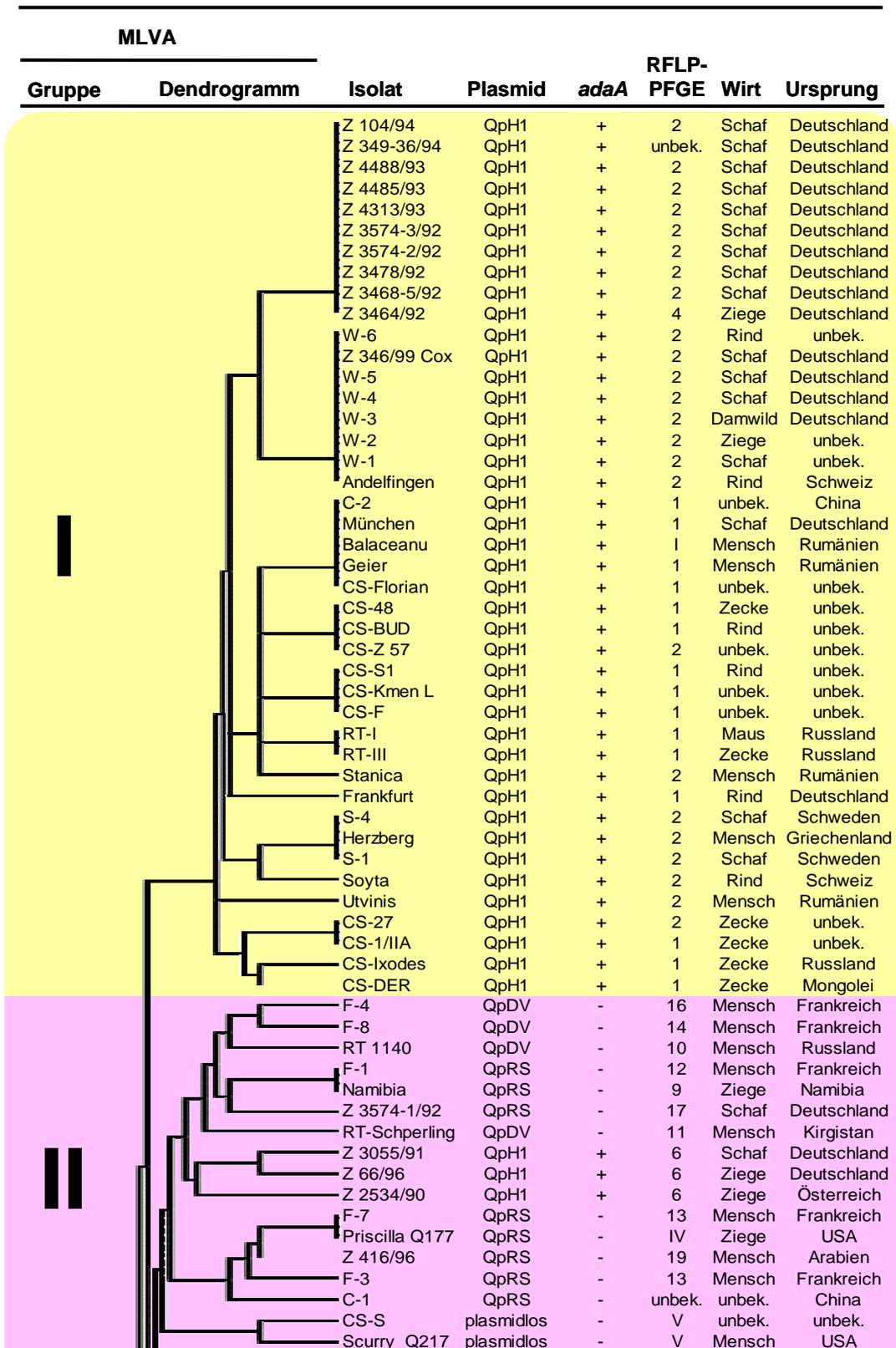
\*<sup>5</sup> Produktlänge 1: 125-128 Bp, Produktlänge 2: 134-136 Bp, Produktlänge 3: 142-143 Bp, Produktlänge 4: 146-149 Bp, Produktlänge 5: 153-154 Bp, Produktlänge 6: 160 Bp

\*<sup>6</sup> Produktlänge 1: 100-106 Bp, Produktlänge 2: 114-122 Bp, Produktlänge 3: 143-147 Bp, Produktlänge 4: 200-201 Bp

\*<sup>7</sup> Produktlänge 1: 118-121 Bp, Produktlänge 2: 127-131 Bp, Produktlänge 3: 136-139 Bp, Produktlänge 4: 144-146 Bp

Das Isolat IHIT 93 (C-3) zeigte für die Loci #3, #4, #5 und #6 je zwei verschiedene Produktlängen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass es sich nicht um einen Isolat, sondern um eine Mischung von Isolaten handelt. Die Isolate IHIT 48 (F-2) und IHIT 56 (F-10) ergaben für die Loci #3 und #4 keine auswertbaren Ergebnisse. Daher wurden die Isolate IHIT 48, 56 und 93 bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

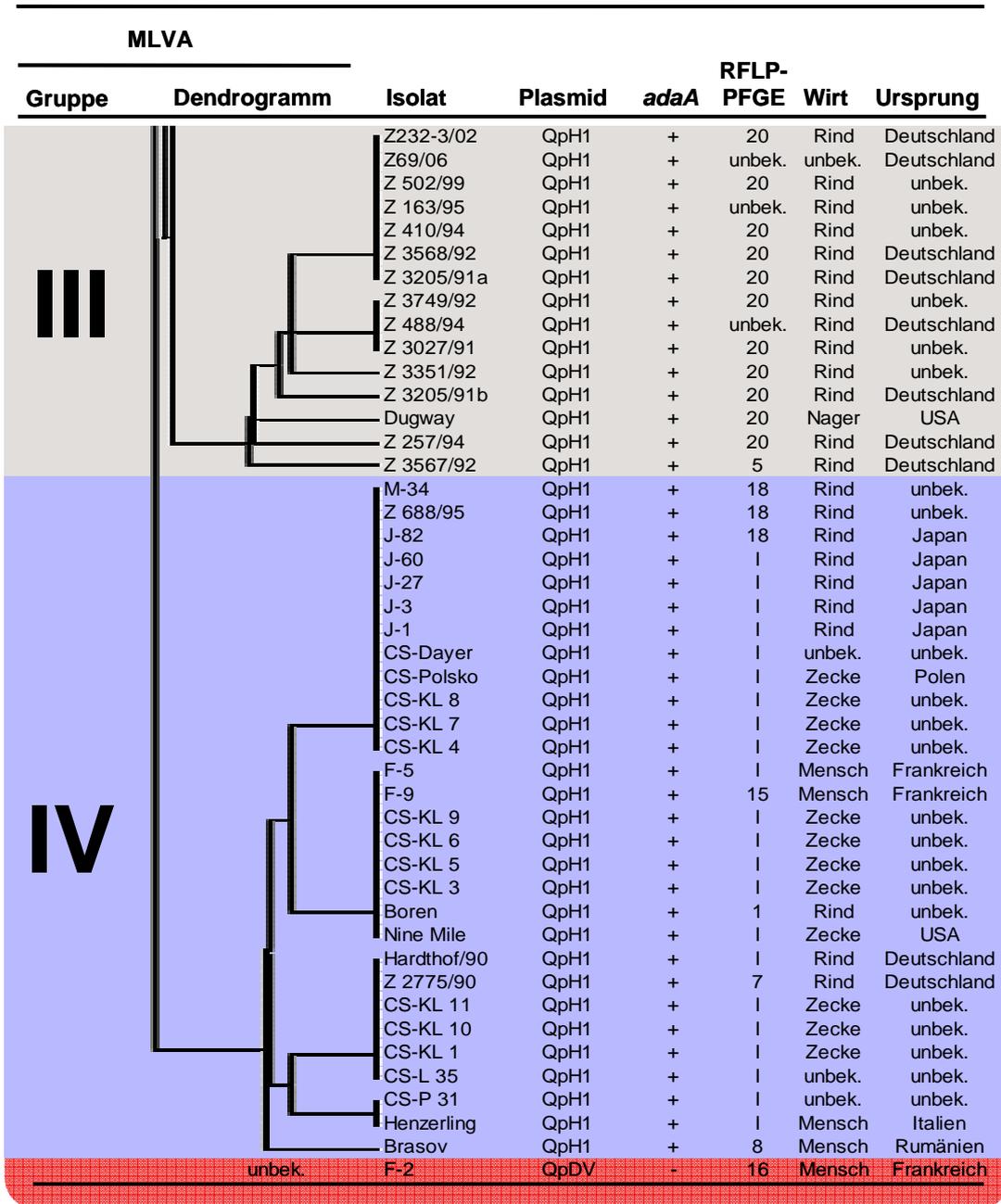
Nach der Übertragung der Daten aus **Tab. 3** in eine 0-1-Matrix, wurde ein Dendrogramm mit Hilfe eines Computerprogramms (*Hierarchical Clustering Explorer* 3.5) erstellt. Das Dendrogramm zeigte eine Einteilung der *C. burnetii*-Isolate in drei große Gruppen mit insgesamt 41 MLVA-Genotypen (**Abb. 4**). Die erste und dritte Gruppe erfasste nur Isolate mit dem QpH1-Plasmid. Die erste Gruppe umfasste 42 Isolate und 14 MLVA-Genotypen, wobei sechs Genotypen bei nur einem einzigen Isolat vorkamen. Die zweite Gruppe (**Abb. 4**) mit 32 Isolaten spaltete sich in zwei Untergruppen auf. Eine dieser Untergruppen enthielt alle Plasmidtypen, wohingegen in die andere Untergruppe nur Isolate mit dem QpH1-Plasmid entfielen. Die zweite Gruppe stellte sich mit 22 MLVA-Genotypen als genetisch sehr heterogen dar, zumal 18 Genotypen nur bei einem einzigen Isolat vorkamen. Im Gegensatz dazu verteilten sich die 29 Isolate der dritten Gruppe auf nur fünf MLVA-Genotypen (**Abb. 4**). Bis auf einen MLVA-Genotyp, der nur bei einem einzigen Isolat gefunden wurde, kamen alle anderen Genotypen bei mehreren Isolaten vor.



Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite

**Abb. 4:** MLVA-Dendrogramm der untersuchten *C. burnetii*-Isolate mit ihren zugehörigen genetischen Eigenschaften, ihrem geographischen Ursprung und dem Wirt, aus dem sie isoliert wurden.

Abb. 4 (Fortsetzung)



**4.1.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)**

In früheren Arbeiten wird berichtet, dass das Genom von verschiedenen *C. burnetii*-Isolaten unterschiedliche Bandenmuster nach dem Verdau mit selten schneidenden Restriktionsenzymen, wie z. B. *NotI*, zeigt. So gelang es Heinzen et al. (1990) anhand der DNA-Fragmentmuster zwischen vier verschiedenen genomischen Gruppen (I, IV, V und VI) zu unterscheiden. Bei späteren Untersuchungen (Jäger et al., 1998; Thiele et al., 1993) an einer größeren Anzahl von Isolaten konnten weitere 16 Restriktionsgruppen (1 – 16) nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit gingen 32 weitere *C. burnetii*-Isolate in die Untersuchung mit ein (**Tab. 4**). Bei drei Isolaten wurde nach Restriktion mit *NotI* und PFGE ein bisher noch nicht identifiziertes Bandenmuster gefunden. Diese Isolate wurden daher in die Restriktionsgruppen 17, 18 und 19 eingeteilt (**Tab. 4**). 21 Isolate konnten bereits bekannten Restriktionsgruppen zugeordnet werden.

**Tab. 4:** Einteilung verschiedener *C. burnetii*-Isolate in RFLP-Restriktionsgruppen anhand ihres mittels PFGE nach *NotI*-Verdau der genomischen DNA erhaltenen Profils.

Isolat Nr.	Isolat Name	Restriktionsgruppe*
1	CS-P 31	I
7	Henzerling	I
13	CS-27	2
39	CS-Kmen L	1
41	CS-DER	1
70	Z 3468-5/92	2
72	Z 3574-1/92	17
73	Z 3574-2/92	2
74	Z 3574-3/92	2
78	Z 4488/93	2
81	Z 349-36/94	Unbekannt
82	Z 410/94	20 (VI)
83	Z 488/94	Unbekannt
87	J-60	I
88	J-82	18
89	M-34	18
90	C-1	Unbekannt
91	C-2	1
92	C-3	20 (VI)
93	Z 163/95	Unbekannt
94	Z 688/95	18
95	Z 66/96	6

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Isolat Nr.	Isolat Name	Restriktionsgruppe*
96	Z 416/96	19
97	W-1	2
98	W-2	2
99	W-3	2
100	W-4	2
101	W-5	2
102	W-6	2
103	Z 346/99	2
104	Z 502/99	20 (VI)
105	Z232-3/02	20 (VI)

Erläuterung:

- \* I, VI = Restriktionsgruppen nach Heinzen et al. (1990)
- 1, 2, 6 = Restriktionsgruppen nach Jäger et al. (1998) und Thiele et al. 1993)
- 17, 18, 19, 20 = Im Rahmen dieser Arbeit neu ermittelte Restriktionsgruppen
- Unbekannt = keine Analyse möglich

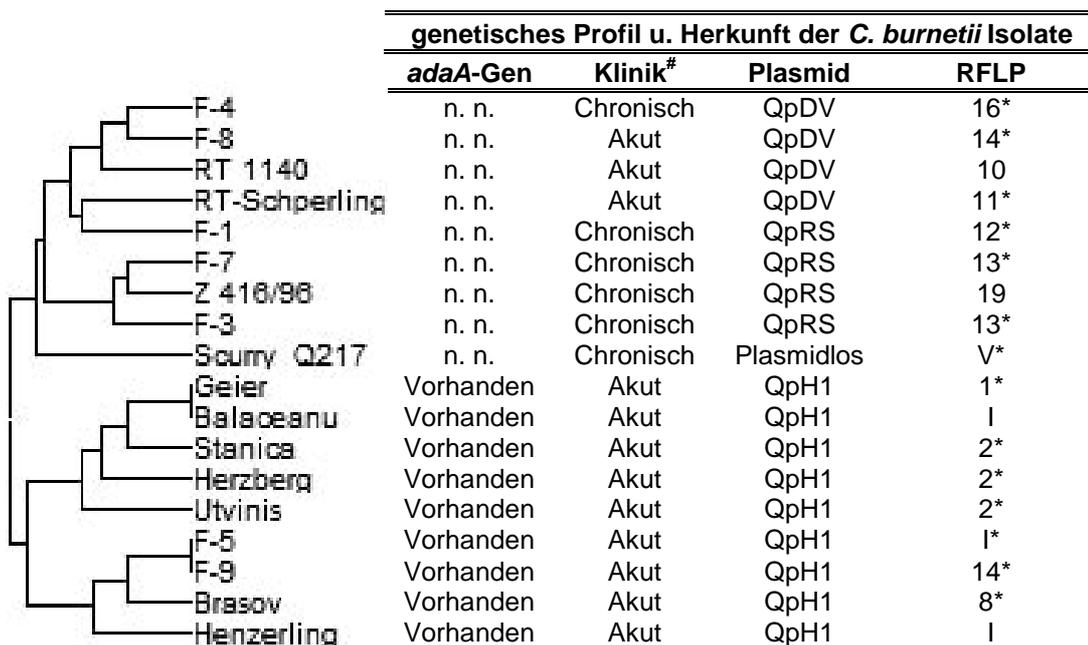
Vier der untersuchten Isolate (in **Tab. 4** als "Restriktionsgruppe unbekannt" bezeichnet) konnten nicht analysiert werden. Bei einem Isolat (Z 163/95) wurde die genomische DNA von dem Restriktionsenzym *Not I* nicht geschnitten und bei drei Isolaten (C1, Z488/94, Z 349-36/94) war das vorhandene Coxiellen-Material für eine PFGE-Analyse nicht ausreichend.

Jäger et al. (1998) stuften alle Isolate mit demselben Restriktionsmuster wie das Dugway 5J108-111-Isolat in die Gruppe VI (wie ursprünglich von Heinzen et al. (1990) beschrieben) ein. Das Dugway-Isolat kommt aus den USA und besitzt das QpDG-Plasmid. Untersuchungen von Lautenschläger et al. (2000) konnten jedoch keinen Unterschied zwischen dem QpH1-Plasmid und dem QpDG-Plasmid feststellen. Die spätere Sequenzierung des QpDG-Plasmids (Beare et al., 2009) zeigte jedoch, dass dieses Plasmid sich sehr wohl von dem QpH1-Plasmid unterscheidet. Nach Anfrage in den USA wurde bestätigt, dass es sich bei dem hier untersuchten Dugway-Isolat sehr wahrscheinlich nicht um Dugway 5J108-111 handelt, sondern um ein anderes Isolat, das vom Menschen isoliert wurde. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit alle Isolate, die bei den Untersuchungen von Thiele et al. (1993) und Lautenschläger et al. (2000) in die Gruppe VI klassifiziert wurden, in die neue Restriktionsgruppe 20 eingeteilt (**Tab. 4**). Zusammen mit den drei neu gefundenen Restriktionsgruppen 17, 18 und 19 steigt damit die Anzahl der *C. burnetii*-Restriktionsgruppen von 20 auf 24.

Der Diskriminierungsindex (Hunter et al., 1988) für die PFGE-RFLP-Methode betrug 0,85.

### 4.1.6 Genotypisierung von humanen Isolaten

18 *C. burnetii*-Isolate menschlicher Herkunft wurden mittels PFGE-RFLP und MLVA charakterisiert sowie mittels PCR auf das Vorhandensein des *adaA*-Genes und des Plasmidprofils hin untersucht. Anhand des MLVA-Dendrogrammes (**Abb. 5**) wurden die Isolate in zwei Gruppen eingeteilt. Die 9 *C. burnetii*-Isolate der ersten Gruppe enthielten keine *adaA*-Gen-spezifischen Sequenzen und verursachten bei 3 Patienten akutes Q-Fieber sowie bei 6 Patienten einen chronischen Krankheitsverlauf. Isolate dieser Gruppe besitzen das QpDV- oder QpRS-Plasmid oder eine ins Genom integrierte Plasmid-homologe Sequenz. Im Gegensatz dazu wurden bei allen *C. burnetii*-Isolaten der zweiten Gruppe *adaA*-Gen spezifische Sequenzen nachgewiesen. Diese Isolate besitzen nur das QpH1-Plasmid und stammten von Patienten mit akutem Q-Fieber. Bei den RFLP-Untersuchungen wurde nur das Restriktionsmuster 14 bei beiden Gruppen nachgewiesen.



**Abb. 5:** Dendrogramm nach MLVA-Analyse von *C. burnetii*-Isolaten menschlicher Herkunft; Korrelation von klinischer Symptomatik und genetischen Eigenschaften.

\* Daten extrahiert von Jäger et al. (1998)

# Krankheitsverlauf bei humanen Patienten

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Bedeutung des *adaA*-Gens für die Pathogenität

Das *adaA*-Gen wurde in den letzten Jahren als Kandidat für die Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei Q-Fieber angesehen (Fernandes et al., 2009; Frangoulidis et al., 2009; Zhang et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *C. burnetii*-Isolate mittels PCR auf die Ausstattung mit einem 269 Bp großen *adaA*-Sequenzsegment untersucht. Der amplifizierte Bereich befand sich innerhalb des 684 Bp großen ORF (CBU\_0952) des *adaA* (Zhang et al., 2005). Die Ergebnisse ergaben, dass nur bei Isolaten mit einem QpH1-Plasmid die *adaA*-spezifische Sequenz amplifiziert werden konnte. Isolate, die an Stelle des QpH1-Plasmids entweder eine Plasmid-homologe Sequenz, ein QpRS- oder QpDV-Plasmid besaßen, waren negativ. Da bei allen Amplifikationen eine interne Kontrolle mitgeführt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse durch PCR-Inhibitoren beeinflusst wurden.

To et al. (1998a) konnten mithilfe der SDS-PAGE und Antigen-Antikörper Reaktionen unter Verwendung homo- und heterologer Sera nachweisen, dass das 28 kDa AdaA-Polypeptid bei der Mehrheit der *C. burnetii*-Stämme, die akutes Q-Fieber verursachten, immundominant war. Mit den Sera von Patienten mit chronischen Verläufen kam es jedoch zu keiner immunologischen Antwort. Die spätere Identifizierung und Charakterisierung des *adaA* erlaubte das Design spezifischer Primer für den Nachweis des Gens mittels PCR. Bis dato wurden nur wenige *C. burnetii*-Isolate, die vom Menschen stammen, analysiert. Die Ergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass das *adaA*-Gen nur bei Isolaten, die einen akuten Krankheitsverlauf verursacht hatten, vorkam. Aus diesem Grund wurde dem *adaA*-Gen eine große Bedeutung für die Bewertung von *Coxiellen*-Infektionen beim Menschen zugesprochen (Zhang et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 19 *C. burnetii*-Stämme menschlichen Ursprungs untersucht. Neun davon besaßen die *adaA*-Sequenz und hatten – wie zu erwarten – ein akutes Q-Fieber ausgelöst. Unter den restlichen 10 Isolaten, ohne *adaA*-Sequenzen, gab es drei Isolate mit dem QpDV-Plasmid, die von Patienten mit akuten Symptomen, und sechs Isolate die von Patienten mit chronischen Q-Fieber stammten. Diese Ergebnisse widerlegen die von Zhang et al. (2005) aufgestellte Theorie, dass das *adaA*-Gen ein Virulenzfaktor von *C. burnetii* sei und immer bei Isolaten vorhanden sein muß, die von einem akuten Krankheitsgeschehen

stammen. Diese Diskrepanz könnte sich damit erklären lassen, dass die Anzahl der von Zhang et al. (2005) untersuchten humanen *C. burnetii*-Isolate (10 Isolate) zu gering und das Ergebnis daher nicht repräsentativ war.

Während in der vorliegenden Arbeit das *adaA*-Gen bei Isolaten mit dem QpDV-Plasmid nicht nachgewiesen werden konnte, wurde es von Beare et al. (2006) bei zwei von vier Isolaten die das QpDV-Plasmid besaßen und bei einem das das QpDG-Plasmid besaß nachgewiesen.

Zhang et al. (2005) geben an, dass *adaA*-positive *C. burnetii*-Isolate auch aus Zecken, Rindern und Nagern isoliert werden können, nicht aber aus Ziegen. In der Studie von Fernandes et al. (2009) und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch von Ziegen stammende *C. burnetii*-Isolate das *adaA*-Gen besitzen können.

Auf Grund der in der Literatur und der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das *adaA*-Gen kein zuverlässiger Virulenzfaktor zur Differenzierung von Isolaten, die einen akuten bzw. chronischen Krankheitsverlauf auslösen, ist. Selbst die aus dieser Arbeit abzuleitende Assoziation von *adaA* und dem QpH1-Plasmid wurde durch Ergebnisse von Beare et al. (2006) und Fernandes et al. (2009) widerlegt. Inwieweit eine differentielle Expression des *adaA* oder sogar eine unterschiedliche Translationseffizienz der mRNA eine Rolle bei der Verlaufsform des Q-Fiebers (akut oder chronisch) spielten, bleibt demnach offen.

## 5.2 Typisierung mittels RFLP-PFGE

Coxiellen weisen – mit einer Ähnlichkeit von mehr als 99% – eine sehr homogene 16S rRNA auf (Stein et al., 1993b). Aus diesem Grund werden alle Isolate unter derselben Spezies geführt. Die Analyse des *C. burnetii*-Genoms mittels Sequenzierung, RFLP oder MLVA stellte jedoch eindeutige genetische Unterschiede heraus (Beare et al., 2006; Jäger et al., 1998; Seshadri et al., 2003; Svraka et al., 2006).

Die RFLP-PFGE ist eine leistungsfähige Methode zur Typisierung von Bakterien und gilt immer noch als eine Referenzmethode für die genetische Charakterisierung von *C. burnetii*. Mehrere Arbeitsgruppen (Heinzen et al., 1990; Hendrix et al., 1990; Thiele et al., 1993; Jäger et al., 1998) nutzten diese Methode um *C. burnetii*-Isolate in Restriktionsgruppen einzuteilen. Voraussetzung für die Aussagekraft der Ergebnisse einer RFLP-PFGE ist das Vorhandensein von mehr als 10 unterschiedlichen DNA-

Fragmenten (Tenover et al., 1995). Diese Zahl wurde im Falle des *NotI*-RFLP bei *C. burnetii* eindeutig überschritten. Ein Parameter für die Diskriminierungsfähigkeit einer Methode ist der von Hunter et al. (1988) eingeführte Diskriminierungsindex. Er gibt bei der Typisierung von Isolaten die Wahrscheinlichkeit an mit der zwei unterschiedliche Isolate in zwei verschiedene Gruppen eingeordnet werden. Die Werte reichen von 0 (keine Diskriminierungsfähigkeit) bis 1 (alle Isolate ergeben ein unterschiedliches Typisierungsmuster). Laut Hunter und Gaston sollten Typisierungsmethoden einen Diskriminierungsindex von über 0,9 aufweisen. Jäger et al. (1998) errechneten bei ihren Untersuchungen mit 80 *C. burnetii*-Isolaten einen Diskriminierungsindex von 0,86, der annähernd diese Forderung erfüllt. Durch Einbeziehung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten *C. burnetii*-Isolate zu den Isolaten von Jäger et al. (1998) nahm der Diskriminierungsindex nur geringfügig auf 0,85 ab. Daher ist die Aussagekraft dieses Verfahrens für *C. burnetii* als ausreichend zu beurteilen. Neuere Methoden, wie z. B. die MLVA, die durch die Komplettssequenzierung des *C. burnetii*-Genoms ermöglicht wurden, zeichnen sich durch eine höhere Diskriminierungsfähigkeit aus (Kap. 5.3).

Anhand der Untersuchungen von Heinzen et al. (1990) und Jäger et al. (1998) wurden die *C. burnetii*-Isolate in 20 *NotI*-Restriktionsgruppen (I, IV, V, VI und 1 – 16) eingeteilt. Diese Einteilung konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Untersuchungen von weiteren 30 Isolaten um 3 neue RFLP-Muster (17, 18 und 19) erweitert werden. Weiterhin wurden alle *C. burnetii*-Isolate, die von Jäger et al. (1998) fälschlicherweise in die Gruppe VI eingeteilt wurden, der neuen Restriktionsgruppe 20 zugeordnet, wodurch sich die Gesamtzahl der Restriktionsgruppen auf 24 erhöhte. Die Neueinteilung der Isolate aus Gruppe VI in die Gruppe 20 liegt darin begründet, dass das Referenzisolat Dugway 5J108-111 für die Gruppe VI, welches von einer amerikanischen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, nicht diesem Referenzisolat entsprach. Erste Hinweise hierauf wurden bereits von Lautenschläger et al. (2000) gefunden, die in dem Referenzisolat Dugway 5J108-111 nicht wie erwartet das QpDG- sondern das QpH1-Plasmid nachwiesen.

Der *NotI*-Verdau genomischer DNA verschiedener *C. burnetii*-Isolate mit unterschiedlichen Plasmidtypen erzeugte immer unterschiedliche Bandenmuster. Daher fielen *Coxiellen*-Isolate mit unterschiedlichen Plasmidtypen immer in getrennte Restriktionsgruppen. **Tab. 5** erläutert, welche Restriktionsgruppen welchem Plasmidtyp zugeordnet werden konnten.

**Tab. 5:** Zuordnung der verschiedenen *C. burnetii*-Plasmidtypen zu den beim Verdau der genomischen DNA mit *NotI* entstehenden RFLP-Restriktionsgruppen.

Plasmidtyp	RFLP-Restriktionsgruppen
QpH1	I, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 18, 20
QpDV	10, 11, 14, 16
QpRS	IV, 9, 12, 13, 17, 19
Plasmid-homologe Sequenzen	V
QpDG	VI

Erläuterung:

- \* I, IV, V, VI = Restriktionsgruppen nach Heinzen et al. (1990)
- 2-16 = Restriktionsgruppen nach Jäger et al. (1998) und Thiele et al. (1993)
- 17, 18, 19, 20 = Im Rahmen dieser Arbeit neu ermittelte Restriktionsgruppen

Durch diese Ergebnisse wurde die Theorie von Heinzen et al. (1990) bestätigt, dass eine bestimmte chromosomale DNA-Sequenz immer in Kombination mit einem bestimmten *C. burnetii*-Plasmid anzutreffen ist.

Bereits 1991 fiel Hendrix et al. auf, dass die Restriktionsgruppen humaner *Coxiellen*-Isolate mit dem Krankheitsverlauf (akut oder chronisch) korrelieren. Nach den Untersuchungen von Jäger et al. (1998) und den hier durchgeführten Untersuchungen lassen sich die Isolate, die beim Menschen eine akute Erkrankung hervorriefen, den Restriktionsgruppen I, 1, 2, 8, 10, 11, 14, 15 und 16 zuordnen und Isolate, die beim Menschen eine chronische Erkrankung hervorriefen, den Restriktionsgruppen V, 12, 13, 16 und 19. In die Restriktionsgruppe 16 wurden zwei Isolate (F4 und F-2) mit dem QpDV-Plasmid eingestuft, die trotz identischer RFLP-Profile aus unterschiedlichen Krankheitsverläufen isoliert wurden. Dieses Ergebnis weist auf die fehlende Übereinstimmung zwischen dem Krankheitsverlauf und dem Genom- bzw. Plasmidtyp der *Coxiellen* hin, was auch schon von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurde (Stein et al., 1993a). Dass die unterschiedliche Virulenz der *Coxiellen*-Isolate das Ergebnis kleiner genetischer Unterschiede sein muss, ergibt sich aus den Ergebnissen der RFLP-Analyse von virulenten Phase I- und avirulenten Phase II- Nine Mile-Isolaten, die dasselbe Bandenmuster zeigten (Beare et al., 2006).

Jäger et al. (1998) konnten zeigen, dass die Restriktionsmuster mit der geographischen Herkunft der *C. burnetii*-Isolate korrelieren und daher als diagnostisches Mittel dienen könnten Isolate unbekanntes Ursprungs geographisch einzuordnen. Dies wäre vor allem vorteilhaft um die Epidemiologie während eines Q-

Fieber-Ausbruchs aufzuklären. Von allen bisher am Institut untersuchten *C. burnetii*-Isolaten können diejenigen, die in die Restriktionsgruppen 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 fallen als „europäische“, diejenigen die in die Restriktionsgruppen 11, 18 und 19 fallen als „asiatische“ und diejenigen die in die Restriktionsgruppen IV und V fallen als „amerikanische“ Isolate bezeichnet werden (**Tab. 6**). *Coxiellen*-Isolate der Restriktionsgruppen I, VI und 1 wurden dagegen in mehreren Kontinenten beschrieben (**Tab. 6**). Das genetische Profil der Isolate der Gruppe I inklusive des Referenzisolates Nine Mile ist gleich und weist auf die weltweite Verbreitung eines gemeinsamen Vorfahrens hin, der sich in den jeweiligen Gebieten genetisch nur geringfügig verändert hat (Beare et al., 2006).

**Tab. 6:** Überblick über den Plasmidtyp und die Restriktionsgruppe von *C. burnetii*-Isolaten im Bezug auf ihre geographische Herkunft\*.

Herkunft	Zahl der untersuchten <i>C. burnetii</i> Isolate	Plasmidtyp(en)	Zugehörigkeit zur RFLP-Gruppe
Deutschland	29	QpH1,QpRS	I, VI, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 17
Österreich	1	QpH1	6
Frankreich	7	QpH1, QpRS, QpDV	I,12,13,14, 15,16
Rumänien	5	QpH1	I, 1, 2, 8
Russland	4	QpH1, QpDV	1, 10
Schweden	2	QpH1	2
Schweiz	2	QpH1	2
Griechenland	1	QpH1	2
Polen	1	QpH1	I
Italien	1	QpH1	I
<b>Europa</b>	<b>53</b>	<b>QpH1, QpRS, QpDV</b>	<b>I, VI, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17</b>
Namibien	1	QpRS	9
<b>Afrika</b>	<b>1</b>	<b>QpRS</b>	<b>9</b>
Saudi Arabien	1	QpRS	19
Mongolei	1	QpH1	1
Kirgistan	1	QpDV	11
China	2	QpH1,	1, VI

Herkunft	Zahl der untersuchten <i>C. burnetii</i> Isolate	Plasmidtyp(en)	Zugehörigkeit zur RFLP-Gruppe
Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite			
Japan	5	QpH1	I, 18
<b>Asien</b>	<b>10</b>	<b>QpH1, QpRS, QpDV</b>	<b>I, VI, 1, 11, 18, 19</b>
<b>Amerika</b>	<b>4</b>	<b>QpH1, QpRS, Plasmidlos</b>	<b>I, IV, V, VI</b>

Erläuterung:

\*Die Daten in dieser Tabelle stammen zum Teil aus dieser Arbeit und zum Teil aus Jäger et al. (1998)

### 5.3 Typisierung mittels MLVA

Durch die Komplettssequenzierung vieler bakterieller Genome wurde es möglich VNTR-Regionen zu identifizieren, die sich aufgrund ihrer hohen Variabilität hervorragend für die Genotypisierung eignen (Lindstedt, 2005). Im Gegensatz zur PFGE, die große Mengen an DNA-Material benötigt und deshalb in den meisten Fällen nur über eine Kultivierung der Erreger möglich ist, kommt die MLVA mit geringsten DNA-Mengen aus und ermöglicht auch die Untersuchung von klinischen Proben. Dadurch kann in dem konkreten Fall von *C. burnetii* die Kultivierung, die nur in L3-Laboratorien durchgeführt werden darf und sehr arbeits- und zeitintensiv ist, umgangen werden. Da die PFGE auf der Restriktion gesamt-genomischer DNA beruht, ist es nicht ausgeschlossen, dass neben einem unvollständigen Verdau auch Banden mit unterschiedlicher Größe entstehen. Dadurch besteht die Gefahr, dass zwei Isolate in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, obwohl sie eigentlich in die gleiche Restriktionsgruppe gehören. Im Gegensatz dazu sind die VNTR-Sequenzen bekannt und werden mit spezifischen Primern amplifiziert. Dadurch ist ein direkter Vergleich der PCR-Produkte unterschiedlicher Isolate möglich und aufgrund der hohen Variabilität der VNTRs eine präzise Diskriminierung anhand der Amplifikatgrößen gegeben.

Die einfache Durchführung der MLVA erlaubt es, Daten zwischen verschiedenen Laboratorien unabhängig von der verwendeten Apparatur auszutauschen. Dies ist vor allem bei Erregern, mit welchen unter Hochsicherheitsbedingungen gearbeitet werden muss und deren Verbringung von Labor zu Labor extrem aufwendig ist, sehr wichtig. (Pourcel et al., 2004).

Die Auflösung der VNTRs ist kumulativ, so dass die Anwendung weiterer Marker die Diskriminierungsfähigkeit der MLVA erhöht (Le Fleche et al., 2002). Bei der Auswahl der TRs ist jedoch darauf zu achten, dass nicht alle TRs polymorph sind (Le Fleche et al., 2001) und manche so instabil sind, dass sie keine epidemiologische Relevanz besitzen (Bayliss et al., 2001). Die Stabilität der hier verwendeten TRs wurde dadurch bestätigt, dass identische *C. burnetii*-Isolate mit unterschiedlicher Passage und Phase den gleichen MLVA-Genotyp erzeugten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 7 VNTRs (Svraka et al., 2006) bei 103 *C. burnetii*-Isolaten untersucht. Drei dieser Isolate (IHIT 92 C-3, IHIT 48 F-2 und IHIT 56 F-10) lieferten keine auswertbaren Ergebnisse. Für die Loci #3, #4, #5 und #6 des Isolats IHIT 92 C-3 wurden je zwei verschiedene Produkttypen nachgewiesen. Dies ist durch die Kontamination mit einem anderen Isolat zu erklären. Die Isolate IHIT 48 F-2 und IHIT 56 F-10 zeigten für die Loci #3 und #4 keine auswertbaren Ergebnisse, was wahrscheinlich auf den suboptimalen PCR-Bedingungen beruht. Für diese beiden Loci konnte wegen PCR-Templatmaterialmangels eine Optimierung der MLVA PCR nicht durchgeführt werden.

Insgesamt wurden bei den 103 Isolaten 41 Genotypen nachgewiesen. Durch Erstellung eines Dendrogramms konnten die Isolate in vier genomische Gruppen (I bis IV) eingeordnet werden. Alle Isolate der Gruppen I, III und IV enthielten sowohl das Plasmid QpH1 als auch das *adaA*-Gen. Die Plasmidausstattung und das Vorhandensein des *adaA*-Gens konnten durch die MLVA-Analyse abgeleitet werden. Die genomische Gruppe II war im Gegensatz zu den anderen genomischen Gruppen sehr heterogen und enthielt neben *C. burnetii*-Isolaten mit genomisch integrierten Plasmidsequenzen auch Isolate mit allen anderen Plasmidtypen. Auffallend waren lediglich die drei Isolate mit dem QpH1-Plasmid, die zur RFLP-Restriktionsgruppe 6 gehörten. Im Gegensatz zu allen anderen Isolaten dieser Gruppe waren diese Isolate *adaA*-positiv. Die Einteilung der drei Isolate in die genomische Gruppe II bedeutet auf der anderen Seite, dass die genomischen Sequenzen dieser drei Isolate eher Isolaten ähneln, die einen anderen Plasmidtyp als QpH1 besitzen. Es könnte sich deshalb um Übergangsisolate aus den genomischen Gruppen I, II oder IV handeln. Eine ähnliche Vermutung, wurde von Beare et al. (2006) geäußert, der das QpH1-Plasmid als Vorgänger für alle anderen Plasmide sieht.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen bestätigen, dass die Plasmid Ausstattung direkt mit den genomischen Eigenschaften der Coxiellen korreliert, so dass das Vorhandensein eines bestimmten Plasmids auf spezifische chromosomale Sequenzen hinweist.

Die RFLP-Restriktionsgruppen innerhalb der genomischen Gruppen I, II, III und IV sind spezifisch für jede MLVA-Gruppe, wodurch es wie bei den Plasmiden möglich ist, eine direkte Korrelation zwischen den genomischen Gruppen und den Restriktionsgruppen aufzustellen. Nur zwei Isolate (Boren: genomische Gruppe IV, Restriktionsgruppe 1 und Balaceanu: genomische Gruppe I, Restriktionsgruppe I) folgen nicht diesem Schema. Für eine endgültige Bewertung müsste sowohl die MLVA-Analyse als auch die PFGE-RFLP für diese zwei Isolate wiederholt werden, was in der vorliegenden Arbeit auf Grund der schlechten Vermehrung der Coxiellen *in vitro* und dem daraus entstehenden Materialmangel nicht möglich war.

Ein unerwartetes Ergebnis ist die Tatsache, dass Isolate derselben genomischen Gruppe (mittels MLVA eingeteilt) verschiedene Restriktionsgruppen im RFLP aufweisen. Dadurch ergänzen sich beide Methoden und gewinnen zusammen an Aussagekraft. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die genomische DNA dieser Isolate nur partiell verdaut wurde, was fälschlicherweise zu einer Einstufung in unterschiedliche Restriktionsgruppen führen würde.

In 29 der 41 gefundenen MLVA-Genotypen sind *C. burnetii*-Isolate, die eine gemeinsame geographische Herkunft aufweisen. Vierundzwanzig dieser 29 Gruppen enthielten nur einen einzigen *C. burnetii* Stamm, was die hohe Diskriminierungsfähigkeit der MLVA bestätigt. Die MLVA ist die Methode der Wahl für epidemiologische Studien, bei denen es darum geht die Ausbreitungswege von *C. burnetii*-Isolaten zu verfolgen.

Aus den restlichen 12 Genotypen, die sich aus Isolaten unterschiedlicher oder unbekannter geographischer Herkunft zusammensetzen, kann man schließen, dass es in der Vergangenheit mittels Vektoren (Nutz- und Wildtieren) z. B. durch Wanderungen oder Viehtransport zu einer weiten Verbreitung von Coxiellen-Isolaten des gleichen Genotyps in verschiedene Kontinente gekommen ist.

Die sieben untersuchten VNTRs zeigten eine hohe Diskriminierungsfähigkeit aus der sich eine Aussage über die evolutionäre Distanz der Stämme ableiten lässt. Es gilt allerdings zu beachten, dass diese u.a. auch von dem Grad der Polymorphie der VNTRs abhängt. So sind z. B. zwei Coxiellen-Stämme, die sich in einem hochpolymorphen VNTR-Locus unterscheiden, genetisch näher verwandt, als zwei Coxiellen-Stämme, deren Unterschied in einem moderat polymorphen VNTR-Locus besteht. Dieser wichtige Aspekt wird von den am häufigsten angewendeten statistischen Parametern (Hunter und Gaston Index, UPGMA) nicht berücksichtigt, weshalb es nicht korrekt ist bei der MLVA von genetischen Distanzen zu sprechen.

Der Diskriminierungsindex (Hunter et al., 1988) betrug bei der MLVA-Analyse 0,96. Er ist damit eindeutig höher als bei der Analyse mittels der PFGE-RFLP-Methode (0,85). Die Diskriminierungsfähigkeit kann durch die Verwendung weiterer VNTRs gesteigert werden. So benutzten Arricau-Bouvery et al. (2006) zwei VNTR-Gruppen mit insgesamt 17 VNTR-Loci für die Untersuchung von insgesamt 42 *C. burnetii*-Isolaten. Davon wurden 22 auch im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Die zusätzlichen VNTRs von Arricau-Bouvery et al. (2006) ermöglichten eine stärkere Diskriminierung. So wurden Isolate, die im Rahmen dieser Arbeit dem gleichen Genotyp zugeordnet waren (Z 349-36/94, Z 4313/93, Z 3478/92, Z 3468-4/92, Z 3464/92, J-3 und CS-Dayer) in weitere Genotypen unterteilt. Nur zwei der Isolate (Z 3749/92 und Z 257/94) zeigten eine unerwartete Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Arbeiten. Arricau-Bouvery et al. (2006) klassifizierten beide Isolate als einen einzigen Genotyp, während in der vorliegende Arbeit beide Isolate zwei unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden konnten.

Svraka et al. (2006) benutzten die gleichen VNTRs und untersuchten damit 21 *C. burnetii*-Isolate, von denen 12 auch im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Im Vergleich zu der Arbeit von Svračka et al. (2006) ergaben sich jedoch bei 6 der Isolate Diskrepanzen im Bezug auf die Größe der analysierten TRs. Aus diesem Grund wurden die Isolate - im Vergleich zur Gruppierung von Svračka et al. (2006) - in andere genotypische Gruppen eingeteilt. Auch Arricau-Bouvery et al. (2006) berichten von Abweichungen für den VNTR Cox4n der als eine 21 Bp große Wiederholung von Svračka et al. (2006) beschrieben wird, während die von Arricau-Bouvery et al. (2006) ermittelte Größe bei 7 Bp liegt.

Glazunova et al. (2005) entwickelten ein MLVA-ähnliches Verfahren, die MST (*Multispacer sequence typing*) für die Differenzierung von *C. burnetii*-Isolaten. Diese Methode vergleicht die intergenischen Bereiche (*spacers*) zwischen der 16S und 23S rRNA der Bakterien. Auf diese Weise konnten 173 *C. burnetii*-Isolate in 30 unterschiedliche Sequenzierungstypen klassifiziert werden. 37 der Stämme wurden auch in dieser Arbeit analysiert. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt - bis auf wenige Ausnahmen - dass beide Methoden übereinstimmende Ergebnisse produzieren, allerdings ist die Diskriminierung bei der MST eindeutig niedriger als bei der MLVA. So ließen sich die 37 mit beiden Methoden parallel untersuchten *C. burnetii*-Isolate mittels MST in 14 Genotypen und mittels MLVA in 20 Genotypen einteilen. Die beiden *C. burnetii*-Isolate F-1 und Namibia lieferten in der MLVA identische Ergebnisse, während sie in der MST zwei verschiedene Sequenztypen zeigten.

Inzwischen ist die MLVA-Methode ein wichtiges Verfahren für die genetische Charakterisierung der Coxiellen, da sie einfach durchzuführen ist und wenig Material benötigt, so dass die zeitintensive und L3-Laboratorien vorbehaltene Anzucht der Coxiellen entfällt. Durch die Auswahl hochpolymorpher, aber dennoch genetisch stabiler VNTR-Loci kann die Anzahl der zu untersuchenden VNTR-Loci reduziert werden, ohne dass die Diskriminierungsfähigkeit abnimmt. Die Wahrscheinlichkeit, solche hochpolymorphen VNTR-Loci zu finden, steigt mit der Anzahl der komplett sequenzierten Coxiellen-Genome. Nach der Komplettssequenzierung vieler Bakteriengenome hat sich die MLVA-Methode weit verbreitet. Für einige Bakterien-spezies wurden inzwischen bereits MLVA-Datenbanken eingerichtet (<http://www.mlva.eu/>). Eine solche Datenbank könnte bei der Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen im Rahmen von Q-Fieber Ausbrüchen eine wichtige Hilfe darstellen.

#### 5.4 Vergleich der Plasmidsequenzen

Ein Vergleich der *C. burnetii*-Plasmidsequenzen mit Sequenzen in der Datenbank zeigt, dass nur wenige Gemeinsamkeiten mit anderen Bakterien-spezies vorhanden sind. Dies ist vermutlich auf die intrazelluläre Vermehrung der Coxiellen zurückzuführen. Bis heute ist unklar welche Rolle die Plasmide im Lebenszyklus der Coxiellen oder für die Pathogenität des Erregers spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Plasmidtyp für 104 *C. burnetii*-Isolate nachgewiesen. QpH1 war das häufigste vorkommende Plasmid, was vermuten lässt, dass QpH1 das "Urplasmid" darstellt, aus dem alle anderen Plasmide hervorgingen.

Bei der etablierten Plasmid-spezifischen PCR entstanden für das QpDV-Plasmid überraschenderweise zwei verschiedene Amplifikate. Ein QpDV-spezifisches Amplifikat (198 Bp) und ein Amplifikat (364 Bp), welches nur bei Isolaten mit dem QpRS-Plasmid erwartet wurde. Der direkte Vergleich der in der GenBank veröffentlichten Sequenzen beider Plasmide mittels BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) führte zu einem QpRS-Plasmid, das aufgrund drei exklusiver DNA-Segmente um 6,5 kBp größer war als das QpDV-Plasmid. Durch die Kombination mehrerer PCR-Systeme konnte jedoch nachgewiesen werden, dass das zweite und dritte exklusive QpRS DNA-Segment auch beim QpDV vorkommt, sodass von einem Fehler bei der Sequenzierung des QpDV-Plasmides ausgegangen werden muss.

Die QpDV-Sequenzierung wurde von Radomski (1999) mit der *primer walking* Strategie durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein kloniertes QpDV-Fragment sequenziert und anschließend anhand der Sequenz des 3'-Endes ein neuer Sequenzierungsprimer entwickelt und mit diesem eine erneute Sequenzierung durchgeführt. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das klonierte Fragment komplett durchsequenziert ist. Durch diese schrittweise Sequenzierung erhält man sich an ihren Enden überschneidende Fragmente, die aneinandergelagert die Gesamtsequenz ergeben. Problematisch wird es bei der Sequenzierung mittels *primer walking* wenn sich größere, sich wiederholende Bereiche auf dem Plasmid befinden. Genau dies ist der Fall vor und nach dem dritten exklusiven QpRS DNA-Segment (3369 Bp). An dieser Stelle befindet sich ein 655 Bp großer *direct repeat* (Sequenzwiederholung), welcher Ähnlichkeiten zu einem Integrase-ähnlichen Gen von *Pseudomonas spp.* aufweist (Kholodii et al., 1997). Wenn nun ein Sequenzierungsprimer gegen Sequenzen dieses *direct repeats* entwickelt wurde, kann dieser statt im ersten *direct repeat* (vor dem exklusiven DNA-Segment) im zweiten *direct repeat* (nach dem exklusiven DNA-Segment) binden. Somit würde die Sequenz des 3369 Bp großen, zwischen den beiden *direct repeats* liegenden Segmenten verloren gehen.

Ein anderer Grund für eine fehlerhafte Sequenzierung könnte die Bildung von so genannten Haarnadelstrukturen (*stem loop*) sein. Diese Strukturen bilden sich aus einzelsträngiger DNA wenn zwei palindromische, komplementäre Nucleotidsequenzen (*inverse repeats*) eine Doppelhelix bilden, die am Ende durch eine ungepaarte Schleife abgeschlossen wird (**Abb. 6**). Die Entstehung und Stabilität dieser Struktur hängt von den Nucleotiden und der Endschleife ab.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung einer DNA-Haarnadelstruktur.

Die Suche nach solchen *inverse repeats* im Bereich des zweiten exklusiven QpRS-Segments ergab diverse Kandidaten. Allerdings konnte die Distanz bzw. die Position

der gefundenen palindromischen Sequenzen die Unterschiede zwischen QpRS und QpDV nicht ausreichend erklären. Als Ursache für das Fehlen des zweiten exklusiven Segmentes bleibt demzufolge nur ein Sequenzierfehler, welcher durch das doppelte Vorhandensein der Primersequenz auf dem Plasmid zu erklären wäre.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden auf chromosomaler und extrachromosomaler Ebene verschiedene *C. burnetii*-Isolate genetisch charakterisiert. Das Ziel war es, eine Verbindung zwischen dem jeweiligen *Coxiella*-Genotyp und der Verlaufsform des Q-Fiebers herzustellen.

Die Entwicklung einer plasmidspezifischen Multiplex-PCR erlaubte die Diskriminierung zwischen Isolaten mit dem QpH1-, QpRS- und QpDV-Plasmid und Isolaten mit chromosomal integrierten Plasmidsequenzen. Das Vorhandensein des QpH1-Plasmids konnte bei der Mehrheit der analysierten Isolate bestätigt werden. Ein unerwarteter Befund, nämlich das Vorkommen von vermeintlich QpRS-Plasmid-spezifischen Sequenzen bei Isolaten mit dem QpDV-Plasmid wurde durch die Etablierung einer XL-PCR, sowie anderer konventioneller PCRs überprüft. Als Ergebnis zeigte sich, dass zwei von drei QpRS-Plasmid-spezifischen Segmenten auch bei Isolaten mit dem QpDV-Plasmid vorkamen. Diese beiden Sequenzabschnitte fehlten in der veröffentlichten Sequenz des QpDV-Plasmids und wurden vermutlich durch einen Sequenzierfehler nicht erkannt. Die neuen Informationen zum QpDV-Plasmid konnten genutzt werden um eine QpDV-spezifische PCR zu etablieren.

Das *acute disease antigen A-* (*adaA-*) Gen von *C. burnetii* galt bisher als Virulenzmerkmal und wurde nur bei Isolaten nachgewiesen, die akutes Q-Fieber beim Menschen verursachten, während *C. burnetii*-Isolate von Patienten mit chronischem Q-Fieber dagegen *adaA*-negativ waren. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass drei *Coxiella*-Stämme, welche von Menschen mit akuten Verlaufsformen stammten, keine *adaA*-Sequenz enthielten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Präsenz des *adaA*-Gens und die Verlaufsform des Q-Fiebers beim Menschen (akut oder chronisch) nicht miteinander korrelieren. Da in der Literatur auch *adaA*-positive *C. burnetii*-Isolate beschrieben wurden, die das QpDV-Plasmid enthalten, scheint die gefundene Korrelation zwischen dem *adaA*-Gen und dem QpH1-Plasmid, welche immer gleichzeitig im Genom vorhanden waren, nicht generell zu gelten.

Mittels PFGE wurden nach *Not* I-Verdau der genomischen DNA von 30 *C. burnetii*-Isolaten, zusätzlich zu den 20 schon vorher in der Literatur beschriebenen Restriktionsgruppen, drei neue genomische Gruppen identifiziert. Die Anzahl der zuvor beschriebenen Gruppen konnte außerdem durch den Nachweis, dass ein von Jäger et al. (1998) verwendeter Referenzstamm falsch der Gruppe VI zugeordnet wurde, auf 21 erhöht werden. Somit gibt es nun bei *C. burnetii* insgesamt 24 Restriktionsgruppen. Die meisten Restriktionsgruppen enthielten Isolate aus einer bestimmten geographischen

Herkunft, während nur ein geringerer Teil der Isolate eine weltweite Verbreitung aufwies.

Die MLVA-Technik mit nur sieben untersuchten polymorphen VNTRs erwies sich als die beste Methode für eine schnelle und präzise Charakterisierung des *C. burnetii*-Genoms. 101 der 103 untersuchten *C. burnetii*-Isolate wurden in vier große genomische Gruppen mit insgesamt 41 Genotypen eingeteilt. Wie bei der PFGE, waren manche der Genotypen nur in einem Gebiet vorhanden, während andere in mehreren Kontinenten nachgewiesen werden konnten. Bisher gibt es für die Untersuchung von *C. burnetii*-Isolaten mittels MLVA noch keine standardisierte Methode, wie sie bereits für andere Bakterienspezies beschrieben und auch in einer MLVA-Datenbank (<http://www.mlva.eu/>) veröffentlicht ist. Deshalb wäre es dringend erforderlich eine solche Standardisierung der MLVA-Methode für *C. burnetii* vorzunehmen und alle identifizierten Genotypen in einer Datenbank niederzulegen. Dies würde einen schnellen und weltweiten Zugriff auf diese Daten ermöglichen und auch zur effektiven Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen beitragen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten genetischen Analysen bestätigen die Annahme, dass die Plasmid-Ausstattung eine direkte Korrelation zu den genomischen Eigenschaften der Coxiellen aufweist, was bedeutet, dass die Präsenz eines bestimmten Plasmidtyps mit dem Vorhandensein definierter Chromosomen einhergeht. Es konnten jedoch keine direkten Beziehungen zwischen Genom und Krankheitsverlauf festgestellt werden, was die Annahme einer Interaktion zwischen Wirt und Erreger als Hauptursache für den Krankheitsverlauf beim Menschen verstärkt.

## 7 SUMMARY

In the present study basic research on the genetic characterization of *C. burnetii* isolates with respect to their chromosomes and plasmids was conducted with the aim to establish a connection between genetic endowment and epidemiological properties of coxiellae.

A plasmid specific multiplex PCR was developed to differentiate between isolates carrying QpH1, QpRS, and QpDV plasmids and plasmid sequences integrated into the chromosome. As was expected most of the *C. burnetii* isolates carried the QpH1 plasmid. To clarify a rather unexpected result, namely the presence of QpRS specific sequences in QpDV bearing coxiellae, a XL PCR as well as several conventional PCRs were established. As a result two out of three QpRS specific sequences were shown to be also present in QpDV plasmids. These two segments are missing in the published sequence of the QpDV plasmid and were most obviously the result of a sequencing error. This new information was used to establish a QpDV specific PCR.

So far the *acute disease antigen A (adaA)* gene was considered as a virulence factor and was only detected in isolates inducing acute Q fever manifestation in humans. "Chronic" *C. burnetii* isolates were shown to be *adaA* negative. However, in this study three of the investigated strains causing acute disease in humans did not contain the *adaA* sequence. These results suggest that the presence of the *adaA* gene and the kind of disease in humans (acute or chronic) do not correlate. Even the correlation between *adaA* gene and the QpH1 plasmid which always grouped together in this study, has to be revised. In literature *adaA* positive *C. burnetii* isolates are described harboring the QpDV plasmid.

PFGE of *NotI* restricted genomic DNA of 30 *C. burnetii* strains revealed three new restriction groups in addition to the 20 groups already described in literature. Furthermore, the number of the previously described restriction groups could be increased to 21 due to the finding that a reference strain of restriction group VI used by Jäger et al. (1998) did not correspond with that. Therefore the number of restriction groups for *C. burnetii* could be extended to 24. Most of the restriction groups contained strains from a delimited geographic area, only a few demonstrated a worldwide distribution.

The MLVA technique with only seven polymorphic VNTRs was found to be the best method for a fast and accurate characterization of the genome of *C. burnetii*. One hundred and one of 104 analyzed strains were classified in 4 genomic groups with a total of 41 genotypes. As with PFGE, some genotypes were locally delimited whereas

others could be detected in several continents. Currently there is no standardized MLVA protocol for *C. burnetii* as is the case for other bacteria whose MLVA patterns are published in a database (<http://www.mlva.eu/>). Therefore it is essential to standardize the MLVA method for *C. burnetii* to deposit all identified genotypes in that database. This would allow a fast and worldwide access of data and contribute to the effective answering of epidemiological questions.

Taken together, genetic characterization of *C. burnetii* isolates performed in this study confirms a direct correlation between plasmid type and chromosomal properties. This means, that a certain plasmid type is accompanied by the presence of a defined chromosome. However, no direct relations between genome and clinic form were observed. These findings further strengthen the suggestion that interaction between host and pathogen is the main factor for course of disease in humans.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Amano, K. & Williams, J. C.** 1984. Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 160 (3): 994-1002.
2. **Amano, K., Williams, J. C., Missler, S. R. & Reinhold, V. N.** 1987. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 262 (10): 4740-4747.
3. **Andoh, M., Naganawa, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Masegi, T. & Hirai, K.** 2003. SCID mouse model for lethal Q fever. *Infect. Immun.* 71 (8): 4717-4723.
4. **Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. & Hirai, K.** 2004. Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol. Immunol.* 48 (12): 971-975.
5. **Andoh, M., Russell-Lodrigue, K. E., Zhang, G. & Samuel, J. E.** 2005. Comparative virulence of phase I and II *Coxiella burnetii* in immunodeficient mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063: 167-170.
6. **Arens, M.** 1983. [Continuous multiplication of *Coxiella burnetii* through persisting infection in buffalo-green monkey (BGM) cell cultures]. *Zent. Vet. Med. B.* 30 (2): 109-116.
7. **Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C. C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A. & Vergnaud, G.** 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 6 (1): 38.
8. **Baca, O. G., Li, Y. P. & Kumar, H.** 1994. Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends Microbiol.* 2 (12): 476-480.
9. **Baca, O. G., Roman, M. J., Glew, R. H., Christner, R. F., Buhler, J. E. & Aragon, A. S.** 1993. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. *Infect. Immun.* 61 (10): 4232-4239.
10. **Bayliss, C. D., Field, D. & Moxon, E. R.** 2001. The simple sequence contingency loci of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Invest.* 107 (6): 657-662.
11. **Beare, P. A., Samuel, J. E., Howe, D., Virtanena, K., Porcella, S. F. & Heinzen, R. A.** 2006. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J. Bacteriol.* 188 (7): 2309-2324.
12. **Beare, P. A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D. E., Omsland, A., Gilk, S. D., Williams, K. P., Sobral, B. W., Kupko, J. J., 3rd, Porcella, S. F., Samuel, J. E. & Heinzen, R. A.** 2009. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* 77 (2): 642-656.

13. **Briggs, H. L., Pul, N., Seshadri, R., Wilson, M. J., Tersteeg, C., Russell-Lodrigue, K. E., Andoh, M., Baumler, A. J. & Samuel, J. E.** 2008. Limited role for iron regulation in *Coxiella burnetii* pathogenesis. *Infect. Immun.* 76 (5): 2189-2201.
14. **Briggs, H. L., Wilson, M. J., Seshadri, R. & Samuel, J. E.** 2005. Fur-regulated genes in *Coxiella burnetii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063: 68-72.
15. **Burton, P. R., Stueckemann, J. & Paretsky, D.** 1975. Electron microscopy studies of the limiting layers of the rickettsia *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 122 (1): 316-324.
16. **Ciacciotta, N. P., Eisenstein, B. I., Mody, C. H., Toews, G. B. & Engleberg, N. C.** 1989. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* 57 (4): 1255-1262.
17. **Coleman, S. A., Fischer, E. R., Cockrell, D. C., Voth, D. E., Howe, D., Mead, D. J., Samuel, J. E. & Heinzen, R. A.** 2007. Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. *Infect. Immun.* 75 (1): 290-298.
18. **Cutler, S. J., Bouzid, M. & Cutler, R. R.** 2007. Q fever. *J. Infect.* 54 (4): 313-318.
19. **Chiou, C. S., Watanabe, H., Wang, Y. W., Wang, W. L., Terajima, J., Thong, K. L., Phung, D. C. & Tung, S. K.** 2009. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. *J. Clin. Microbiol.* 47 (4): 1149-1154.
20. **Denison, A. M., Massung, R. F. & Thompson, H. A.** 2006. Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.*
21. **Denoeud, F. & Vergnaud, G.** 2004. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics.* 5: 4.
22. **Ede, A. J. & Crawford, A. M.** 1995. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the KAP8 locus prevent the amplification of some alleles. *Anim. Genet.* 26 (1): 43-44.
23. **Fenollar, F., Fournier, P. E., Carrieri, M. P., Habib, G., Messina, T. & Raoult, D.** 2001. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 33 (3): 312-316.
24. **Fernandes, I., Rousset, E., Dufour, P., Sidi-Boumedine, K., Cupo, A., Thiery, R. & Duquesne, V.** 2009. Serological and molecular characterization of AdaA: a potential marker of Q-fever abortion in goats? *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 2: 163-164.
25. **Fournier, P. E., Casalta, J. P., Piquet, P., Tournigand, P., Branchereau, A. & Raoult, D.** 1998b. *Coxiella burnetii* infection of aneurysms or vascular grafts: report of seven cases and review. *Clin. Infect. Dis.* 26 (1): 116-121.

26. **Fournier, P. E., Marrie, T. J. & Raoult, D.** 1998a. Diagnosis of Q fever. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7): 1823-1834.
27. **Frangoulidis, D., Rodolakis, A., Heiser, V., Landt, O., Spletstoesser, W. & Meyer, H.** 2009. DNA microarray-chip based diagnosis of Q-fever (*Coxiella burnetii*). *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 2: 165-166.
28. **Frazier, M. E., Heinzen, R. A., Stiegler, G. L. & Mallavia, L. P.** 1991. Physical mapping of the *Coxiella burnetii* genome. *Acta Virol.* 35 (6): 511-518.
29. **Gimenez, D. F.** 1965. Gram Staining of *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 90 (3): 834-835.
30. **Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T. J. & Raoult, D.** 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (8): 1211-1217.
31. **Gutierrez, M. G., Vazquez, C. L., Munafo, D. B., Zoppino, F. C., Beron, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I.** 2005. Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* 7 (7): 981-993.
32. **Hackstadt, T.** 1986. Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. *Infect. Immun.* 52 (1): 337-340.
33. **Hackstadt, T.** 1990. The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 27-32.
34. **Hackstadt, T., Peacock, M. G., Hitchcock, P. J. & Cole, R. L.** 1985. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect. Immun.* 48 (2): 359-365.
35. **Heinzen, R. & Samuel, J.** 2001. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Database for the Microbiological Community.* M. Dworkin. Springer, New York.
36. **Heinzen, R., Stiegler, G. L., Whiting, L. L., Schmitt, S. A., Mallavia, L. P. & Frazier, M. E.** 1990. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 504-513.
37. **Heinzen, R. A. & Hackstadt, T.** 1996a. A developmental stage-specific histone H1 homolog of *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 178 (16): 5049-5052.
38. **Heinzen, R. A., Howe, D., Mallavia, L. P., Rockey, D. D. & Hackstadt, T.** 1996b. Developmentally regulated synthesis of an unusually small, basic peptide by *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol.* 22 (1): 9-19.
39. **Hendrix, L. R., Mallavia, L. P. & Samuel, J. E.** 1993. Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene com1. *Infect. Immun.* 61 (2): 470-477.
40. **Hendrix, L. R., Samuel, J. E. & Mallavia, L. P.** 1991. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J. Gen. Microbiol.* 137 (2): 269-276.

41. **Hendrix, L. R., Samuel, J. E. & Mallavia, L. P.** 1990. Identification and cloning of a 27-kDa *Coxiella burnetii* immunoreactive protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 534-540.
42. **Hotta, A., Kawamura, M., To, H., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Amano, K. & Hirai, K.** 2003. Use of monoclonal antibodies to lipopolysaccharide for antigenic analysis of *Coxiella burnetii*. *J. Clin. Microbiol.* 41 (4): 1747-1749.
43. **Hotta, A., Kawamura, M., To, H., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H. & Hirai, K.** 2002. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 70 (8): 4747-4749.
44. **Hotta, A., Zhang, G. Q., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H. & Hirai, K.** 2004. Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens. *J. Vet. Med. Sci.* 66 (10): 1289-1291.
45. **Hunter, P. R. & Gaston, M. A.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26 (11): 2465-2466.
46. **Jager, C., Willems, H., Thiele, D. & Baljer, G.** 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol. Infect.* 120 (2): 157-164.
47. **Jones, A. G., Stockwell, C. A., Walker, D. & Avise, J. C.** 1998. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish. *J. Hered.* (89): 339-342.
48. **Juhas, M., Crook, D. W. & Hood, D. W.** 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol.* 10 (12): 2377-2386.
49. **Kholodii, G. Y., Yurieva, O. V., Gorlenko, Z., Mindlin, S. Z., Bass, I. A., Lomovskaya, O. L., Kopteva, A. V. & Nikiforov, V. G.** 1997. Tn5041: a chimeric mercury resistance transposon closely related to the toluene degradative transposon Tn4651. *Microbiology.* 143 (Pt 8): 2549-2556.
50. **Kovacova, E., Vavrekova, M., Lukacova, M., Daiter, A. B., Tokarevich, N. K., Karceva, N. A., Gorbachev, E. N., Urvolgyi, J., Kocianova, E., Rehacek, J. & et al.** 1994. Immunochemical and antigenic characterization of *Coxiella burnetii* strains isolated in Europe and Mongolia. *Eur. J. Epidemiol.* 10 (1): 9-15.
51. **Lautenschlager, S., Willems, H., Jager, C. & Baljer, G.** 2000. Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*. *Plasmid.* 44 (1): 85-88.
52. **Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J. L. & Vergnaud, G.** 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.* 2: 37.
53. **Le Fleche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F. & Vergnaud, G.** 2001. A tandem re-

- peats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 1: 2.
54. **Le Fleche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoed, F., Nockler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L. A. & Vergnaud, G.** 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6: 9.
  55. **Li, Y. P., Curley, G., Lopez, M., Chavez, M., Glew, R., Aragon, A., Kumar, H. & Baca, O. G.** 1996. Protein-tyrosine phosphatase activity of *Coxiella burnetii* that inhibits human neutrophils. *Acta Virol.* 40 (5-6): 263-272.
  56. **Lindstedt, B. A.** 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis.* 26 (13): 2567-2582.
  57. **Luhrmann, A. & Roy, C. R.** 2007. *Coxiella burnetii* inhibits activation of host cell apoptosis through a mechanism that involves preventing cytochrome c release from mitochondria. *Infect. Immun.* 75 (11): 5282-5289.
  58. **Lukacova, M., Barak, I. & Kazar, J.** 2007. Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.*
  59. **Lukacova, M., Kazar, J. & Gajdosova, E.** 1994. *Coxiella burnetii* phase I and II proteins studied by SDS-page. *Acta Virol.* 38 (5): 263-267.
  60. **Lukacova, M., Kazar, J., Gajdosova, E. & Vavrekova, M.** 1993. Phase variation of lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii*, strain Priscilla during chick embryo yolk sac passaging. *FEMS Microbiol. Lett.* 113 (3): 285-289.
  61. **Mallavia, L. P.** 1991. Genetics of rickettsiae. *Eur. J. Epidemiol.* 7 (3): 213-221.
  62. **Mallavia, L. P. & Samuel, J.** 1989. Genetic diversity of *Coxiella burnetii*. In: *Intracellular parasitism*. Hrsg.: J. Moulder. CRC Press, Boca Raton, Florida. 117-126
  63. **Mallavia, L. P., Samuel, J. & Frazier, M. E.** 1990. The genetics of *Coxiella burnetii*: etiologic agent of Q fever and chronic endocarditis. In: *Q fever: The biology of Coxiella burnetii*. Hrsg.: J. C. Williams and H. A. Thompson. CRC Press, Boca Raton, Florida. 259-284
  64. **Marrie, T. J.** 2003. *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur. Respir. J.* 21 (4): 713-719.
  65. **Masuzawa, T., Sawaki, K., Nagaoka, H., Akiyama, M., Hirai, K. & Yanagihara, Y.** 1997. Relationship between pathogenicity of *Coxiella burnetii* isolates and gene sequences of the macrophage infectivity potentiator (Cbmip) and sensor-like protein (qrsA). *FEMS Microbiol. Lett.* 154 (2): 201-205.
  66. **Maurin, M. & Raoult, D.** 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4): 518-553.
  67. **McCaul, T. F., Banerjee-Bhatnagar, N. & Williams, J. C.** 1991. Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect. Immun.* 59 (9): 3243-3253.

68. **McCaul, T. F. & Williams, J. C.** 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J. Bacteriol.* 147 (3): 1063-1076.
69. **Meghari, S., Desnues, B., Capo, C., Grau, G. E., Raoult, D. & Mege, J. L.** 2006. *Coxiella burnetii* stimulates production of RANTES and MCP-1 by mononuclear cells: modulation by adhesion to endothelial cells and its implication in Q fever. *Eur. Cytokine Netw.* 17 (4): 253-259.
70. **Melnicakova, J., Lukacova, M., Howe, D., Heinzen, R. A. & Barak, I.** 2003. Identification of *Coxiella burnetii* RpoS-dependent promoters. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990: 591-595.
71. **Mertens, K., Lantsheer, L., Ennis, D. G. & Samuel, J. E.** 2008. Constitutive SOS expression and damage-inducible AddAB-mediated recombinational repair systems for *Coxiella burnetii* as potential adaptations for survival within macrophages. *Mol. Microbiol.* 69 (6): 1411-1426.
72. **Mertens, K., Lantsheer, L. & Samuel, J. E.** 2005. A minimal set of DNA repair genes is sufficient for survival of *Coxiella burnetii* under oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063: 73-75.
73. **Micoud, M., Brion, J. P., Boulard, J. C., Magne, J. L., Gratacap, B., Stahl, J. P., Farah, I. & Raoult, D.** 1991. Infection of aortic aneurysm with *Coxiella burnetii*. *Lancet.* 338 (8766): 584.
74. **Minnick, M. F., Heinzen, R. A., Reschke, D. K., Frazier, M. E. & Mallavia, L. P.** 1991a. A plasmid-encoded surface protein found in chronic-disease isolates of *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 59 (12): 4735-4739.
75. **Minnick, M. F., Small, C. L., Frazier, M. E. & Mallavia, L. P.** 1991b. Analysis of the *cbhE'* plasmid gene from acute disease-causing isolates of *Coxiella burnetii*. *Gene.* 103 (1): 113-118.
76. **Mo, Y. Y., Cianciotto, N. P. & Mallavia, L. P.** 1995. Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology.* 141 (Pt 11): 2861-2871.
77. **Moos, A. & Hackstadt, T.** 1987. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect. Immun.* 55 (5): 1144-1150.
78. **Mülhardt, C.** 2006. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* S. A. Verlag. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH.
79. **Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. & Markham, A. F.** 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17 (7): 2503-2516.
80. **Nguyen, S. V. & Hirai, K.** 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 180 (2): 249-254.

81. **Ning, Z., Yu, S. R., Quan, Y. G. & Xue, Z.** 1992. Molecular characterization of cloned variants of *Coxiella burnetii* isolated in China. *Acta Virol.* 36 (2): 173-183.
82. **Norlander, L.** 2000. Q fever epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2 (4): 417-424.
83. **Novak, M. & Brezina, R.** 1989. Comparison of protein and lipopolysaccharide patterns of several *Coxiella burnetii* strains in phase I. *Acta Virol.* 33 (2): 172-176.
84. **Novak, M., Brezina, R. & Kazar, J.** 1992. Immunoblot analysis of antibody response in mice infected with *Coxiella burnetii* phase I. *Acta Virol.* 36 (1): 39-44.
85. **O'Rourke, A. T., Peacock, M., Samuel, J. E., Frazier, M. E., Natvig, D. O., Mallavia, L. P. & Baca, O.** 1985. Genomic analysis of phase I and II *Coxiella burnetii* with restriction endonucleases. *J. Gen. Microbiol.* 131 (6): 1543-1546.
86. **Pan, X., Luhrmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M. A. & Roy, C. R.** 2008. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science.* 320 (5883): 1651-1654.
87. **Pourcel, C., Andre-Mazeaud, F., Neubauer, H., Ramisse, F. & Vergnaud, G.** 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 4: 22.
88. **Pourcel, C., Visca, P., Afshar, B., D'Arezzo, S., Vergnaud, G. & Fry, N. K.** 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* 45 (4): 1190-1199.
89. **Radomski, K. U.** 1999. Sequenzierung und Charakterisierung des Plasmids QpDV von *Coxiella burnetii*. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
90. **Raoult, D.** 1996. Q fever: still a query after all these years. *J. Med. Microbiol.* 44 (2): 77-78.
91. **Raoult, D., Levy, P. Y., Harle, J. R., Etienne, J., Massip, P., Goldstein, F., Micooud, M., Beytout, J., Gallais, H., Remy, G. & et al.** 1990. Chronic Q fever: diagnosis and follow-up. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 51-60.
92. **Ritter, M.** 1996. Identifikation, Klonierung und Analyse plasmidhomologer Sequenzen im Chromosom des Stammes Scurry Q217 von *Coxiella burnetii*. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
93. **Ross, I. L., Parkinson, I. H. & Heuzenroeder, M. W.** 2009. The use of MAPLT and MLVA analyses of phenotypically closely related isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Med. Microbiol.* 299 (1): 37-41.
94. **Salmon, M. M., Howells, B., Glencross, E. J., Evans, A. D. & Palmer, S. R.** 1982. Q fever in an urban area. *Lancet.* 1 (8279): 1002-1004.

95. **Samuel, J. E., Frazier, M. E., Kahn, M. L., Thomashow, L. S. & Mallavia, L. P.** 1983. Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 41 (2): 488-493.
96. **Samuel, J. E., Frazier, M. E. & Mallavia, L. P.** 1985. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 49 (3): 775-779.
97. **Samuel, J. E., Kiss, K. & Varghees, S.** 2003. Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990: 653-663.
98. **Savinelli, E. A. & Mallavia, L. P.** 1990. Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 523-533.
99. **Schramek, S. & Mayer, H.** 1982. Different sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 38 (1): 53-57.
100. **Segal, G., Feldman, M. & Zusman, T.** 2005. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (1): 65-81.
101. **Sekeyova, Z., Roux, V. & Raoult, D.** 1999. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mucZ* sequence comparison. *FEMS Microbiol. Lett.* 180 (1): 61-67.
102. **Seshadri, R., Hendrix, L. R. & Samuel, J. E.** 1999. Differential expression of translational elements by life cycle variants of *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 67 (11): 6026-6033.
103. **Seshadri, R., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Nelson, K. E., Nelson, W. C., Ward, N. L., Tettelin, H., Davidsen, T. M., Beanan, M. J., Deboy, R. T., Daugherty, S. C., Brinkac, L. M., Madupu, R., Dodson, R. J., Khouri, H. M., Lee, K. H., Carty, H. A., Scanlan, D., Heinzen, R. A., Thompson, H. A., Samuel, J. E., Fraser, C. M. & Heidelberg, J. F.** 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (9): 5455-5460.
104. **Seshadri, R. & Samuel, J.** 2005. Genome analysis of *Coxiella burnetii* species: insights into pathogenesis and evolution and implications for biodefense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063: 442-450.
105. **Seshadri, R. & Samuel, J. E.** 2001. Characterization of a stress-induced alternate sigma factor, RpoS, of *Coxiella burnetii* and its expression during the development cycle. *Infect. Immun.* 69 (8): 4874-4883.
106. **Sexton, J. A. & Vogel, J. P.** 2002. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic.* 3 (3): 178-185.
107. **Shannon, J. G., Howe, D. & Heinzen, R. A.** 2005. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (24): 8722-8727.

108. **Stein, A., Louveau, C., Lepidi, H., Ricci, F., Baylac, P., Davoust, B. & Raoult, D.** 2005. Q fever pneumonia: virulence of *Coxiella burnetii* pathovars in a murine model of aerosol infection. *Infect. Immun.* 73 (4): 2469-2477.
109. **Stein, A. & Raoult, D.** 1993a. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb. Pathog.* 15 (3): 177-185.
110. **Stein, A., Saunders, N. A., Taylor, A. G. & Raoult, D.** 1993b. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 113 (3): 339-344.
111. **Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K. & Homan, W. L.** 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254 (2): 268-274.
112. **Tan, C. K. & Owens, L.** 2000. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Organ.* 41 (2): 115-122.
113. **Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. & Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33 (9): 2233-2239.
114. **Thiele, D. & Willems, H.** 1994a. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? *Eur. J. Epidemiol.* 10 (4): 427-434.
115. **Thiele, D., Willems, H., Haas, M. & Krauss, H.** 1994b. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid QpH1 from *Coxiella burnetii*. *Eur. J. Epidemiol.* 10 (4): 413-420.
116. **Thiele, D., Willems, H., Kopf, G. & Krauss, H.** 1993. Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis. *Eur. J. Epidemiol.* 9 (4): 419-425.
117. **Thompson, H. A., Bolt, C. R., Hoover, T. & Williams, J. C.** 1990. Induction of heat-shock proteins in *Coxiella burnetii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 127-135.
118. **Tigertt, W. D., Benenson, A. S. & Gochenour, W. S.** 1961. Airborne Q fever. *Bacteriol. Rev.* 25: 285-293.
119. **To, H., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H. & Hirai, K.** 1998a. Antigenic characteristic of the lipopolysaccharides of *Coxiella burnetii* isolates. *J. Vet. Med. Sci.* 60 (2): 267-270.
120. **To, H., Hotta, A., Zhang, G. Q., Nguyen, S. V., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Amano, K. & Hirai, K.** 1998b. Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. *Microbiol. Immunol.* 42 (2): 81-85.
121. **Toman, R. & Skultety, L.** 1996. Structural study on a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* strain Nine Mile in avirulent phase II. *Carbohydr. Res.* 283: 175-185.

122. **Valkova, D. & Kazar, J.** 1995. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol. Lett.* 125 (2-3): 275-280.
123. **Varghees, S., Kiss, K., Frans, G., Braha, O. & Samuel, J. E.** 2002. Cloning and porin activity of the major outer membrane protein P1 from *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 70 (12): 6741-6750.
124. **Vergnaud, G. & Denoeud, F.** 2000. Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res.* 10 (7): 899-907.
125. **Vergnaud, G. & Pourcel, C.** 2006. Multiple Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Analysis (MLVA). In: *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*. Hrsg.: E. Stackebrandt. Springer-Verlag. 83-104
126. **Vodkin, M. H. & Williams, J. C.** 1986a. Overlapping deletion in two spontaneous phase variants of *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* 132 (9): 2587-2594.
127. **Vodkin, M. H., Williams, J. C. & Stephenson, E. H.** 1986b. Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* 132 (2): 455-463.
128. **Voth, D. E. & Heinzen, R. A.** 2007. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell. Microbiol.* 9 (4): 829-840.
129. **Voth, D. E. & Heinzen, R. A.** 2009. Sustained activation of Akt and Erk1/2 is required for *Coxiella burnetii* antiapoptotic activity. *Infect. Immun.* 77 (1): 205-213.
130. **Weisburg, W. G., Dobson, M. E., Samuel, J. E., Dasch, G. A., Mallavia, L. P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J. E., Weiss, E. & Woese, C. R.** 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.* 171 (8): 4202-4206.
131. **Wilson, H. G., Neilson, G. H., Galea, E. G., Stafford, G. & O'Brien, M. F.** 1976. Q fever endocarditis in Queensland. *Circulation.* 53 (4): 680-684.
132. **Willems, H., Jager, C. & Baljer, G.** 1998. Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 180 (15): 3816-3822.
133. **Willems, H., Ritter, M., Jager, C. & Thiele, D.** 1997. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J. Bacteriol.* 179 (10): 3293-3297.
134. **Williams, J. C. & Stewart, S.** 1984. Identification of immunogenic proteins of *Coxiella burnetii* phase variants. In: *Microbiology*. Hrsg.: L. Leive and D. Schlessinger. American Society for Microbiology. 257-262
135. **Williams, J. C. & Waag, D. M.** 1981. Antigens, virulence factors and biological response modifiers of *Coxiella burnetii*: strategies for vaccine development. In: *Q Fever: The Biology of Coxiella burnetii*. Hrsg.: J. C. Williams and H. A. Thompson. CRC Press, Boca Raton, Florida. 175-222
136. **Zamboni, D. S., McGrath, S., Rabinovitch, M. & Roy, C. R.** 2003. *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to compo-

- nents of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol. Microbiol.* 49 (4): 965-976.
137. **Zhang, G., To, H., Russell, K. E., Hendrix, L. R., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K. & Samuel, J. E.** 2005. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect. Immun.* 73 (3): 1561-1567.
  138. **Zhang, G. Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. & Hirai, K.** 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol. Immunol.* 41 (11): 871-877.
  139. **Zuber, M., Hoover, T. A. & Court, D. L.** 1995. Analysis of a *Coxiella burnetii* gene product that activates capsule synthesis in *Escherichia coli*: requirement for the heat shock chaperone DnaK and the two-component regulator RcsC. *J. Bacteriol.* 177 (15): 4238-4244.
  140. **Zusman, T., Aloni, G., Halperin, E., Kotzer, H., Degtyar, E., Feldman, M. & Segal, G.** 2007. The response regulator PmrA is a major regulator of the *icm/dot* type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol.* 63 (5): 1508-1523.

## 9 ANHANG

### Chemikalien

Agarose	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland
30% Acrylamid	Fa. Applichem, Darmstadt/Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Borsäure	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Dextrose	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
EDTA	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
EDTA Disodium	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland
Eisessig	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland
Formamid	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Fuchsin	Fa. Applichem, Darmstadt/Deutschland
KCl	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
Harnstoff	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Incert-Agarose	Fa. Biozym Scientific, Oldendorf/Deutschland
Long Ranger Gel Solution	Fa. Cambrex, U.S.A.
Malachitgrün	Fa. Fluka, Schweiz
MBC Agarose	Fa. Bio-Rad, München/Deutschland
Micro-90	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
NaOH	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Natrium-N-Laurylsarcosin	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Neufuchsin	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
<i>Orange G</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Phenolrot	Fa. EGA Chemie, Steinheim/Deutschland
PMSF	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Proteinase K	Fa. Roche, Mannheim/Deutschland
Saccharose	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
SDS	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland

TEMED	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Tris	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Trypsin	Fa. Difco, Augsburg/Deutschland

### **Puffer, Medien und Lösungen**

Minimal Essential Medium (MEM A):

MEM A mit Earle's Salzen und 0,85 g/l NaHCO<sub>3</sub> ergänzt mit 2 mmol/l L-Glutamin, Vitaminkonzentrat und 5 % fötalem Kälberserum.

Karbofuchsin Stammlösung:

- 100 ml 10% (w/v) Neufuchsin
  - 250 ml 4% wässriges Phenol
  - 650 ml A. dest.
- 48 h bei 37 °C stehen lassen, Lagerung bei 4 °C

Karbofuchsin Gebrauchslösung:

- 3 ml Karbofuchsin-Stammlösung
  - 5 ml Na-Phosphat-Puffer
- vor gebrauch frisch filtrieren, nicht länger als 40 h aufbewahren

Malachitgrün-Gebrauchslösung:

- 0,8% wässriger Malachitgrünlösung

0,1 M Na-Phosphat-Puffer:

- 3,5 ml 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 15,5 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 19,0 ml A. dest.
- auf pH 7,45 einstellen

Versen-Puffer Gebrauchslösung:

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,45 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 g EDTA
- 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,015 g Phenolrot  
auf 1 l mit *A. bidest.* Auffüllen, à 80 ml portionieren, autoklavieren  
und bei 4 °C lagern

Trypsin-Puffer Stammlösung:

8,0 g NaCl  
0,38 g KCl  
0,125 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,0 g Dextrose  
3,0 g Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan  
mit *A. bidest.* auf ca. 700 ml auffüllen, mit 1 N HCl auf pH 7,2  
einstellen und  
2,5 g Trypsin zugeben, mit *A. dest.* auf 1 l auffüllen, steril filtrieren,  
20 ml Portionen abfüllen und bei -20 °C lagern. Vor Gebrauch wird  
diese Stammlösung 1:5 mit Versen-Puffer verdünnt. 0,5 M EDTA pH 8,0

bzw. pH 8,3

186,1 g EDTA  
auf 900 ml mit *A. bidest.* auffüllen, pH auf 8,0 bzw. 8,3 mit NaOH  
einstellen,  
auf 1 l auffüllen

PMSF (100 mM)

0,1742 g PMSF  
10 ml Isopropanol

Lösung unter Laborabzug ansetzen

Auftragspuffer

25,0 g Saccharose  
0,3 g Orange G  
auf 100 ml mit *A. bidest.* auffüllen. In 2 ml Eppendorfgefäße  
aliquotieren und bei - 20 °C lagern.

LI-COR Auftragspuffer (Stammlösung)

12,5 ml Formamid  
0,5 ml 0,5 M EDTA pH 8.3  
78,0 mg Fuchsin

## LI-COR Auftragspuffer (Gebrauchslösung)

14,4	ml	Formamid
600,0	µl	0,5 M EDTA pH 8.3
1	ml	Licor Auftragspuffer (Stammlösung)

## 1 x ES-Puffer

50,00	ml	0,5 M EDTA pH 8.0
0,50	g	Natrium-N-Lauroylsarcosin

## 50 x TAE-Puffer

242,0	g	Tris
57,1	ml	Eisessig
100,0	ml	0,5 M EDTA pH 8.0

auf 1 l mit *A. bidest.* auffüllen. Vor Gebrauch 1:50 mit *A. bidest.* verdünnen

## 10 x TBE-Puffer für LI-COR

107,82	g	Tris
55,00	g	Borsäure
7,40	g	EDTA

auf 950 ml mit *A. bidest.* auffüllen. Den pH-Wert auf 8.3 mit 5 N NaOH einstellen und anschließend ad 1000 ml mit *A. bidest.* auffüllen.

## 10 x TBE-Puffer für RFLP

108	g	Tris
55,00	g	Borsäure
40	ml	EDTA Disodium pH 8.0

auf 1000 ml mit *A. bidest.* auffüllen

## 1 x TE-Puffer

1	ml	1 M Tris/HCl pH 8.0
0,20	ml	0,5 M EDTA pH 8.0

auf 100 ml mit *A. bidest.* auffüllen, pH kontrollieren und autoklavieren

## Gefäße

### Anzucht:

Polystyrolröhrchen (16,5/40 mm) Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen/Deutschland

Deckgläschen (12 mm Ø) Glasswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim/Deutschland

### Vermehrung:

Cellstar® Tissue Culture Flasks (25 cm<sup>2</sup>/50 ml; 75 cm<sup>2</sup>/250 ml und 175 cm<sup>2</sup>/550 ml) von Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen/Deutschland

## Geräte

### Brutschränke

Modell KB 240 (Fa. Binder, Tuttlingen/Deutschland) für die Anzucht von Coxiellen.

Modell INC 246 (Fa. Memmert, Schwabach/Deutschland) für die Anzucht von BGM-Zellen.

### Ultraschallstab

Modell Sonifier B12 mit 3 mm Spitze (Fa. Branson Sonic Power Company, U.S.A.)

### Zentrifuge

Modell L2-21 Centrifuge (Fa. Beckman, München/Deutschland)

Zentrifugenrotoren JA 7,5, JA-10, JA-14, JA-20 (Fa. Beckman, München/Deutschland)

### Elektrophoresekammern

Hybaid Elektro-4 Fa. Thermo Fisher Scientific, U.S.A.

Minigel-Twin Fa. Biometra, Göttingen/Deutschland

Chef Mapper® Fa. Bio-Rad, München/Deutschland

### Sequenzierungsgerät

Modell 4200 DNA Sequencer Fa. LI-COR, U.S.A.

### Thermocycler

Gene AMP PCR System 9600 Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt/  
Deutschland

TGradient Fa. Biometra, Göttingen/Deutschland

T1 Thermocycler Fa. Biometra, Göttingen/Deutschland

## Primer

Für die genotypische Charakterisierung der *C. burnetii*-Isolate wurden plasmidspezifische (Tab. 7 und Tab. 10), *adaA*-spezifische Primer (Tab. 8), sowie Primer flankierend zu Mikrosatellitensequenzen

Tab. 9) eingesetzt.

**Tab. 7:** Liste der plasmidspezifischen Primer.

Name	Sequenz 5'-3'
QpDVF	TTCTTAGTAACCGGTAGTGGATGTCC
QpDVR	GGCTGTTGTGCATATTAGTGTGATG
QpH1F	GCGAGTTGAGGCAGAAGAGG
QpH1R	GCACGGTAGAATGGAAGGAAG
QpRSF	CTTTCTAATGGGATTCCGTCAGC
QpRSR	AGTATTCAATTAAGGACACCCGTCA
ScurryF	GCATGCTCCATAGCCAACGTAATCT
ScurryR	TGCAATTCTGTTGTTATCAGTGCCTT

**Tab. 8:** Liste der für die *adaA*-PCR verwendeten Primer.

Name	Sequenz 5'-3'
<i>adaA</i> F (P28F)	TCACCGCTGTTTTTTCAGACG
<i>adaA</i> R (P28R)	AATAGATTTCGCTCTCTCAAGCCG
TRANS 1	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC
TRANS 2	CCCAACAACACCTCCTTATTC

**Tab. 9:** Primer flankierend zu Mikrosatellitensequenzen für die MLVA-PCR.

Name	Sequenz 5'-3'
Cox1F*	AGAAAAAAGCACAGACCTTGA
Cox1R	TTCTTGATTTAAAAGGGTGACT
Cox2F*	TTCTTTATTTTCAGGCCGGAGT
Cox2R	CCGGTAACGCCGATTAGTAA
Cox3F*	GCAATCCAGTTGGAAAGAA
Cox3R	ATTGAAGTAATCCATCGATGATT
Cox4F*	ATGAAGAAAGGATGGAGGG
Cox4R	TGCAAGGATAGCCT
Cox5F*	AATGGAGTTTGTAGCAAAGAAA
Cox5R	AAAGACAAGCAAACGATAAAAA
Cox6F*	GACAAAATCAATAGCCCGT
Cox6R	GAGTTGTGTGGCTTCGC
Cox7F*	ACAGGCCGGTATTCTAACC
Cox7R	CCTCAGCACCCATTGAG

### Erläuterung:

\* Primer am 5'-Ende mit DY-781 markiert

**Tab. 10:** Primer für die Differenzierung von QpRS- und QpDV-Plasmid.

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
QpDVF	TTCTTAGTAACCGGTAGTGGATGTCC
QpDVR	GGCTGTTGTGCATATTAGTGTGATG
QpF	CGCTTTTCAACTTATGCCACTG
QpFN	ACTACGTTTTGCGCCAATGTC
QpR	TGTTTATTGGGCACGGAGC
QpRSF	CTTTCTAATGGGATTCCGTCAGC
QpRSFR	CTGACGGAATCCCATTAGAAAGA
QpRSF3	TGTATCCTTGCGCCCCACCTAC
QpRSR	AGTATTCAATTAAGGACACCCGTCA
QpRSR3	TAAGTCGGGAGAAACATCGGAAAGC
QpRS2-1	CTCAGCGGCATGATGGACTC
QpRS2-2	ACATGACCCCTTTTGACGTAGC
Qp2F	ATTCCAACAGAACACCCAATGC
Qp2R	CGAGGATTACAGGGAAAAGTGG

Alle Primer wurden bei *biomers.net* bestellt und mit 1 x TE-Puffer auf 20 µM verdünnt.

### PCR Kits

GeneAmp® XL PCR Kit Fa. Applied Biosystems, U.S.A.

enthält rTth DNA Polymerase, XL, 2 U/µl

3,3x XL BufferII

Mg(OAC)<sub>2</sub>, 25 mM

QIAGEN Multiplex PCR Kit Fa. Qiagen, Hilden/Deutschland

beinhaltet 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix (kurz 2x Mastermix)

enthält HotStarTaq DNA Polymerase, Multiplex PCR-Puffer, dNTP-Mix

### DNA-Größenstandards

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Fa. Fermentas, St. Leon-Rot/Deutschland

1 kb DNA Ladder Fa. Gibco-BRL, Eggenstein/Deutschland

Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker Fa. Fermentas, St. Leon-Rot/ Deutschland

### Ladepuffer

6X DNA Loading Dye

Fa. Fermentas, St. Leon-Rot/Deutschland

**Enzyme**

*Not I* Fa. (Amersham) GE Healthcare, Freiburg/Deutschland

***Not I*-Restriktionspuffer**

40,00	µl 10 x H Buffer
40,00	µl 0,1% BSA
40,00	µl 0,1% Triton X-100
278,00	µl A. bidest.

**Software**

1DscanEX Fa. BD Biosciences-scanalytics, U.S.A.

e-seq<sup>®</sup> V 2.0 Fa. LI-COR, U.S.A

## 10 TABELLEN

<b>Tab. 1:</b>	Überblick über die Daten der verwendeten <i>C. burnetii</i> -Isolate .....	15
<b>Tab. 2:</b>	Anzahl der pro Locus amplifizierten PCR-Produkte für die mittels MLVA untersuchten <i>C. burnetii</i> -Isolate .....	31
<b>Tab. 3:</b>	Klassifizierung der untersuchten <i>C. burnetii</i> -Isolate anhand der für die entsprechenden Loci (#1 bis #7) mittels MLVA ermittelten Produktlängen .....	32
<b>Tab. 4:</b>	Einteilung verschiedener <i>C. burnetii</i> -Isolate in RFLP-Restriktionsgruppen anhand ihres mittels PFGE nach <i>NotI</i> -Verdau der genomischen DNA erhaltenen Profils .....	32
<b>Tab. 5:</b>	Zuordnung der verschiedenen <i>C. burnetii</i> -Plasmidtypen zu den beim Verdau der genomischen DNA mit <i>NotI</i> entstehenden RFLP-Restriktionsgruppen .....	32
<b>Tab. 6:</b>	Überblick über den Plasmidtyp und die Restriktionsgruppe von <i>C. burnetii</i> -Isolaten im Bezug auf ihre geographische Herkunft* .....	32
<b>Tab. 7:</b>	Liste der plasmidspezifischen Primer .....	32
<b>Tab. 8:</b>	Liste der für die <i>adaA</i> -PCR verwendeten Primer .....	32
<b>Tab. 9:</b>	Primer flankierend zu Mikrosatellitensequenzen für die MLVA-PCR .....	32
<b>Tab. 10:</b>	Primer für die Differenzierung von QpRS- und QpDV-Plasmid .....	32

## 11 ABBILDUNGEN

- Abb. 1:** Darstellung der plasmidspezifischen Sequenzen von *C. burnetii*-Isolaten mittels Multiplex-PCR mit plasmidspezifischen Primern und anschließender Agarosegelelektrophorese..... 27
- Abb. 2:** Graphische Gegenüberstellung von QpRS- und QpDV-Plasmidsequenzen (ab 14000 Bp) sowie die erwarteten (Erwartet QpDV) und die tatsächlich erhaltenen PCR-Produkte (Amplifikate QpDV)..... 29
- Abb. 3:** Darstellung des *adaA*-Gens verschiedener *C. burnetii*-Isolate mittels Duplex-PCR (687 Bp-Bande = Kontrollfragment, 269 Bp-Bande = *adaA*-Fragment) und anschließender Agarosegelelektrophorese ..... 30
- Abb. 4:** MLVA-Dendrogramm der untersuchten *C. burnetii*-Isolate mit ihren zugehörigen genetischen Eigenschaften, ihrem geographischen Ursprung und dem Wirt, aus dem sie isoliert wurden..... 32
- Abb. 5:** Dendrogramm nach MLVA-Analyse von *C. burnetii*-Isolaten menschlicher Herkunft; Korrelation von klinischer Symptomatik und genetischen Eigenschaften ..... 32
- Abb. 6:** Schematische Darstellung einer DNA-Haarnadelstruktur ..... 32

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die fortgesetzte finanzielle Unterstützung, die zur Erstellung dieser Arbeit notwendig waren.

Mein größter und aufrichtiger Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich auf meinem gesamten Lebensweg immer bedingungslos unterstützt und geliebt haben.

Ines, du bist die Inspiration meines Lebens und der Hauptgrund, dass ich an diesem Projekt teilgenommen habe. Vielen Dank für deine Unterstützung und für das Leben, das ich Tag für Tag an deiner Seite genieße.

Des Weiteren gilt ein besonderes Dankeschön meiner Betreuerin Judith Tyczka und meinen Betreuern Hermann Willems und Carsten Heydel. Vielen Dank für eure Betreuung und vor allem für eure Freundschaft.

Der ganzen ehemaligen Arbeitsgruppe ein großes Dankeschön, zunächst einmal an Julia, die mit ihrer netten Art die Alltagsroutine neutralisiert hat. Bettina, Peppi und Uschi, vielen Dank dafür, dass ihr mir mit Tat und Rat geholfen habt. Aus demselben Grund möchte ich mich auch bei Gabi und Anja bedanken.

DANKE sage ich allen, durch deren Unterstützung diese Doktorarbeit möglich wurde!

Por ultimo quiero agradecer al Dr. Joaquín Goyache sus métodos de enseñanza tan humanos y amenos a la par que rigurosos, así como su apoyo incondicional para la obtención de mi beca. Joaquín, para mí has sido el mejor didacta de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Cover image provided and copyright by Dennis Kunkel Microscopy, Inc. ([www.denniskunkel.com](http://www.denniskunkel.com)).

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



ISBN: 978-3-8359-5918-7



9 783835 195918 7