

Einfluss der UV-Desinfektion auf molekulare Reparaturmechanismen bei Bakterien im Trinkwasser

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.), vorgelegt an der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik
der Universität Fridericiana Karlsruhe**

von

**Dipl.-Biol. Christina Jungfer
geboren am 12. März 1976 in Karlsruhe**

Tag des Kolloquiums: 25. Januar 2007

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ursula Obst

**Institut für Technische Chemie
Bereich Wasser- und Geotechnologie
Forschungszentrum Karlsruhe**

Karlsruhe 2006

Für Judith

Danksagung

Professor Dr. Christoph Syldatk

danke ich für die Bereitschaft der Übernahme des Gutachtens und das Interesse an dieser Arbeit.

PD Dr. Ursula Obst

danke ich für die Überlassung des Themas, die fachlichen Diskussionen und Ratschläge, vor allem in Sachen Trinkwasserversorgung.

Dr. Thomas Schwartz

danke ich für die vielen Diskussionen und Anregungen, die fortwährende Unterstützung im Verlauf der Arbeit und die Ermutigungen bei Tiefpunkten, vor allem bei meiner schriftlichen Ausarbeitung.

Oluf Hoyer

danke ich für die Bereitstellung des UV-Sensors und die fachlichen Diskussionen und Anregungen in Sachen UV.

Silke Kirchen

danke ich für die Diskussionsbereitschaft bei meinen Ergebnissen, die kreativen Ideen zur Optimierung und die große Hilfe mit den Biofilmen. Auch Silkes Fahrrad möchte ich an dieser Stelle danken!

Yusra Chaibi und Heike Vollmer

danke ich für den Beitrag zu dieser Arbeit im Rahmen ihrer Studien-, Diplom- und Praxisarbeiten. Ihr unermüdlicher Einsatz im Labor war mit viel Eigeninitiative und Interesse für das Thema verbunden.

Peter Krolla-Sidenstein, Petra Bischoff, Katja Nilles, Mareike Marten und Markus Geis

danke ich für die Hilfe bei der Abrundung meiner Schreibaarbeit trotz vollen Terminkalendern.

Der gesamten Abteilung Umweltmikrobiologie

danke ich für die tolle Atmosphäre bei der Arbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen.

Dr. Harald Krug und der Abteilung Toxikologie (ITG)

danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Seminar, das Interesse an meinem Thema, die Anregungen und die Unterstützung bei den Anfängen meiner Protein-Untersuchungen.

Den „Kochmädels“

danke ich für das Interesse am Verlauf meiner Arbeit und das Interesse dafür, dass ich fertig werde.

Annette

danke ich dafür, dass sie in einfach allen Lebenslagen für mich da war.

Meiner Familie

danke ich für ihre Unterstützung und Anwesenheit.

Zusammenfassung

Das Erholen und ggf. Wiederaufkeimen von Bakterien im Verteilungsnetz nach der Trinkwasseraufbereitung kann ein Problem für die Trinkwasserversorgung darstellen. Bei UV-Desinfektion können nicht letal geschädigte Bakterien Zell-Reparaturmechanismen aktivieren, die UV-bedingte DNA-Schäden beseitigen, so dass die Bakterien im Verteilungssystem regenerieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die Induktion von Dunkelreparaturmechanismen bei ausgewählten Bakterien nach der UV-Desinfektion untersucht. Im Gegensatz zur Licht-abhängigen Photoreaktivierung wurden diese Dunkelreparaturmechanismen bisher wenig untersucht, obwohl sie im Verteilungssystem unter Abwesenheit von Licht sicher relevanter sind.

Untersucht wurden die autochthon im Trinkwasser vorkommenden Bakterien *Caulobacter crescentus* und *Aquabacterium commune* sowie als Stellvertreter für die hygienisch relevanten Bakterien gemäß der Trinkwasserverordnung *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* nach UV-Bestrahlung. Wichtigster Parameter in der mikrobiellen Dunkelreparatur ist das sogenannte *recA*-System. Mit neu erstellten Primern und Sonden konnte die Synthese der *recA*-mRNA über die Northern Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden. Die reverse Transkription mit anschließender Real Time-PCR war ein zusätzlicher Nachweis für die *recA*-mRNA. Weiterhin wurde die Bildung des RecA-Proteins über das Western Blot-Verfahren mit Hilfe eines RecA-spezifischen Antikörpers überprüft.

Sowohl in den Trinkwasserbakterien als auch in den opportunistischen Bakterien wurde eine spezifische Induktion des Dunkelreparaturmechanismus detektiert, teilweise sogar nach UV-Strahlungsintensitäten höher als 400 J/m^2 , dem deutschen Standard für UV-Desinfektion. Es wurde gezeigt, dass die Induktion von *recA*-Genprodukt Spezies-spezifisch war und sich in den untersuchten Bakterien unterschied. So zeigte einerseits *Caulobacter crescentus* noch nach einer UV-Bestrahlung von 400 bis 600 J/m^2 eine deutliche Induktion von *recA*-mRNA und RecA-Protein, während bei *Aquabacterium commune* diese Induktion nur nach 100 J/m^2 beobachtet wurde. Außerdem war die Induktion des Dunkelreparaturmechanismus zeitabhängig. Während die Induktion der *recA*-Genexpression und RecA-Proteinbildung bei *Pseudomonas aeruginosa* bis zu 6 h nach der UV-Bestrahlung erfolgte, zeigte *Enterococcus faecium* eine RecA-Proteinbildung nach frühestens 6 h mit einem Maximum zwischen 20 und 27 h.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen *recA*-mRNA als effektiven Biomarker für die Wiedererholungsfähigkeit von Bakterien erscheinen, da die Halbwertszeit von mRNA im Vergleich zu Proteinen als sehr kurz beschrieben ist.

Die Ergebnisse unterstreichen, dass die Aufklärung der molekularen Antworten von Bakterien in Aufbereitungsprozessen zur Optimierung von technischen Prozessen beitragen kann, um letztlich Qualitätsminderungen in Produktionsverfahren einzuschränken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung		
Zusammenfassung		
Inhaltsverzeichnis	I	
Abkürzungsverzeichnis	III	
1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand.....	3
2.1	Bakterien und Trinkwasser	3
2.2	UV-Desinfektion und Reparatur.....	9
2.2.2	UV-Desinfektion und Desinfektion von Trinkwasser.....	9
2.2.3	Molekulare Grundlagen: UV-Strahlung und DNA	11
2.2.4	UV-Lampendesign	12
2.2.5	Vor- und Nachteile der UV-Desinfektion.....	14
2.2.6	Reparaturmechanismen von Bakterien	15
2.3	Ziel der Arbeit	22
2.4	Molekulare Grundlagen der angewandten Nachweismethoden.....	25
3	Material und Methoden.....	27
3.1	Bakterien.....	27
3.2	Wachstumsbedingungen für Bakterien zur Untersuchung der SOS-Antwort	27
3.3	Geräte und Materialien	28
3.4	Primer	28
3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
3.6	Optische Vermessung von DNA und RNA	30
3.7	Sequenzierung.....	31
3.8	Herstellung der Bakterien-Ausgangssuspension für die Bestrahlung mit UV	33
3.9	UV-Bestrahlung	33
3.10	Bestimmung der Kolonien-bildende Einheiten (KBE)	34
3.11	Gesamt-RNA-Isolierung.....	35
3.12	Northern Blot-Hybridisierung	36
3.13	Reverse Transkription.....	38
3.14	Real Time-PCR.....	39
3.15	Proteinextraktion und –quantifizierung	41
3.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.17	Western Blot-Analyse und immunologischer Nachweis	44
3.18	Behandlung der Bakterien mit Natriumhypochlorit als alternativer Stressfaktor.....	45

3.19	Biofilmuntersuchungen.....	46
4	Ergebnisse	48
4.1	Grundlagen zum Nachweis von Dunkelreparaturmechanismen	48
4.1.1	Gensondenberechnung für recA-Nachweissysteme in verschiedenen Bakterien... 48	
4.1.2	Prinzip des Nachweises der <i>recA</i> -mRNA mit markierten <i>recA</i> -Oligonukleotiden.... 58	
4.1.3	Quantifizierung der Genexpression von <i>recA</i> über reverse Transkription..... 59	
4.1.4	Etablierung des RecA-Protein-Nachweises über Antikörper	61
4.2	Induktion des <i>recA</i> -Gens und RecA-Proteins bei den Trinkwasserbakterien <i>Caulobacter crescentus</i> und <i>Aquabacterium commune</i>	62
4.2.1	UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in <i>Caulobacter crescentus</i>	62
4.2.2	UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in <i>Aquabacterium commune</i>	70
4.3	Induktion des <i>recA</i> -Gens und RecA-Proteins bei den opportunistischen Bakterien <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Enterococcus faecium</i>	74
4.3.1	UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
4.3.2	UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in <i>Enterococcus faecium</i>	84
4.4	UV-Bestrahlung und Quorum sensing-regulierte Gene in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
4.5	Chemische Desinfektion und deren Einfluß auf <i>recA</i> -gesteuerte Reparatursysteme	94
4.5.1	NaOCl-Behandlung und spezifische Genexpression in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94
4.5.2	NaOCl-Behandlung und spezifische Genexpression in <i>Enterococcus faecium</i>	98
4.6	Induktion der Dunkelreparatur bei adhärenenten Bakterien.....	104
4.7	Übersicht zu den Ergebnissen	106
5	Diskussion	109
6	Ausblick	123
7	Literatur	124
8	Anhang	133
	Tabellenverzeichnis	150
	Abbildungsverzeichnis	152
	Lebenslauf	155

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abs.	Absorption
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
ConA	Concanavalin A
Ct	threshold cycle
2CS	two component regulation system
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V. Technisch-wissenschaftlicher Verein
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNU	Formazin Nephelometric Unit
G	Guanin
GAC	Aktivkohle (<i>granulated activated carbon</i>)
$x g$	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
h	Stunde (<i>hour</i>)
IF	Induktionsfaktor
J/m ²	Joule/Quadratmeter
kDa	Kilodalton
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.b.	nicht bearbeitet

n.d.	nicht detektiert
n.g.	nicht gemessen
OD	Optische Dichte (<i>optical density</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
QS	<i>Quorum sensing</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuclease
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
THM	Trihalogenmethan
U	Uracil
unv.	unverdünnt
UV	Ultraviolett
VBNC	viable but nonculturable

1 Einleitung

Wesentlicher Teil unserer Lebensqualität ist die Verfügbarkeit von gutem Trinkwasser in allen Lebensbereichen. Trinkwasser wird häufig als Lebensmittel Nr.1 bezeichnet, da Leben ohne Wasser nicht möglich ist. Folglich ist es wichtig, mit sauberem, hygienisch einwandfreiem Trinkwasser versorgt zu werden.

Abhängig von der Rohwasserquelle (z.B. Oberflächenwasser oder angereichertes Grundwasser) ist die Desinfektion ein wichtiger Schritt bei der Aufbereitung von Trinkwasser, um Kontaminationen mit hygienisch relevanten Bakterien im Verteilungssystem und beim Verbraucher zu vermeiden. Weltweiter Standard und weit verbreitet ist die Desinfektion mit Chlor oder Chlorderivaten. Eine Alternative ist die Inaktivierung von Mikroorganismen mit ultravioletter Strahlung (UV). Die UV-Desinfektion gilt als kosteneffektiv und bildet keine bis jetzt bekannten toxischen Rückstände und Desinfektionsnebenprodukte im Wasser (Hoyer, 2003, Liu et al., 2002).

Trinkwasser ist nach geltenden Regeln (DVGW, TrinkwV 2001) nicht steril, sondern keimarm. Es ist vorgeschrieben, dass Wasser für den menschlichen Gebrauch frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein sein muss. Die meisten Bakterien, die im Verteilungsnetz gefunden werden, sind in der Regel harmlose Trinkwasserbakterien. Jedoch gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die trotz Aufbereitungs- und Desinfektionsbarrieren das Vorhandensein von pathogenen oder opportunistischen Bakterien, wenn auch meist in sehr geringen Mengen, nachgewiesen haben (Emtiazi et al., 2004, Payment und Robertson, 2004, Kilb et al., 2003, Exner, 2003, LeChevallier et al., 1996, u.a.). Bakterien liegen im Verteilungssystem entweder einzeln, als Aggregate oder in Biofilmen an Oberflächen oder an Partikel gebunden vor. Solche Bakterien können vom Rohwasser, von Aufbereitungsanlagen, Biofilm-Ablösungen (Camper et al., 2003, Pozos et al., 2004) oder einer Resuspension von Ablagerungen (Gauthier et al., 1999) stammen. Biofilme wurden auch direkt nach Desinfektionsanlagen gefunden (Schwartz et al., 2003).

Das Überleben der Bakterien kann verschiedene Gründe haben. Mikroorganismen können z.B. gegenüber UV-Strahlung unterschiedliche Sensitivität ausbilden (Sommer et al., 2000). Auch wird beschrieben, dass Bakterien, die an Partikel gebunden sind, besser die Desinfektionsbarriere überwinden können und somit resistenter als suspendierte Bakterien sind (Morin und Camper, 1997, Wu et al., 2005). Durch das Anlagern an Partikel, die Ausbildung von extrazellulärer polymerer Substanz (EPS) oder die Bildung von Zellaggregaten sind die Bakterien besser vor äußeren Einflüssen geschützt oder können bei UV-Bestrahlung

abgeschattet werden, d.h. das Bakterium ist nicht der vollen Strahlungs- und somit Desinfektionswirkung ausgesetzt.

Ein weiterer Punkt ist, dass immer wieder neue Opportunisten oder Krankheitserreger („new emerging pathogens“) auftreten, deren Verhalten bei der Desinfektion noch nicht bekannt ist und die sich nicht an Indikator-Organismen messen lassen (Schindler, 2004).

Gründe für das Überleben können andererseits auch indigene molekulare Mechanismen der Bakterienzellen sein, die für die Kompensation von subletalen Schädigungen verantwortlich sind. Wenn Bakterien nicht abgetötet wurden, können sie sich wieder regenerieren. Weit verbreitet bei Bakterien sind u.a. DNA-Reparaturmechanismen wie die Photoreaktivierung und die Dunkelreparatur (Sinha und Häder, 2002). Die Photoreaktivierung wurde im Hinblick auf die UV-Desinfektion von Trinkwasser schon weitgehend untersucht (Oguma et al., 2002, 2004, 2005, Clauß et al., 2005, Giese und Darby, 2000, Tosa und Hirata, 1999). Da im Verteilungssystem Licht jedoch keine Rolle spielt, sollte die Dunkelreparatur im Hinblick auf die Trinkwasserrelevanz von größerer Bedeutung sein. Bisher wurde lediglich versucht, Photoreaktivierung und Dunkelreparatur von Referenzbakterien im Kultivierungsverfahren gegeneinander abzugrenzen (Oguma et al., 2002). Dunkelreparaturmechanismen als Reaktion auf die UV-Desinfektion von Trinkwasser konnten bei Bakterien bisher noch nicht gezielt auf molekularer Ebene über Genexpressionsanalysen untersucht werden. Die Untersuchungen solcher molekularer Prozesse in Bakterien zeigen gegenüber den klassischen Kultivierungsverfahren Vorteile, da deren Zielmoleküle (DNA, RNA, Proteine) unabhängig von physiologischen Zuständen in Zellen vorliegen und nachweisbar sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Relevanz der Dunkelreparaturmechanismen bei Bakterien nach UV-Bestrahlung zur Desinfektion von Trinkwasser. Dazu war es notwendig, verschiedene molekularbiologische Nachweissysteme zu entwickeln, mit denen diese Mechanismen bei ausgewählten Bakterien untersucht werden können.

2 Kenntnisstand

2.1 Bakterien und Trinkwasser

Trinkwasseraufbereitung

Die deutsche Trinkwasseraufbereitung entspricht den hohen Qualitätsanforderungen der nationalen und internationalen Regelungen und zeigt im internationalen Vergleich einen technisch sehr hohen Standard. Die Aufbereitung basiert auf dem Multibarrierenprinzip und der kontinuierlichen Überwachung von chemischen und mikrobiologischen Standardparametern. Sie entspricht somit den Prinzipien der Vorsorge. Ziel der Trinkwasseraufbereitung ist es, das Wasser für den menschlichen Gebrauch frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein zu machen (DVGW, TrinkwV 2001). Ein Auftreten von pathogenen Mikroorganismen, die aus Wasserressourcen (Vorfluter, Talsperren und Grundwässer) stammen können, soll vermieden werden. Hygienisch relevante Mikroorganismen werden möglichst quantitativ bereits bei der Aufbereitung z.B. durch natürliche und technische Filtersysteme reduziert und nachträglich oft durch geeignete Desinfektionsverfahren inaktiviert. Dennoch kann auch bei einem hohen technischen Standard nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Krankheitserreger oder opportunistische Bakterien aus verschiedenen Quellen wie Abwasser, landwirtschaftliche Abschwemmungen etc. zu einer Kontamination von Wasserressourcen führen und trotz Aufbereitung in geringen Konzentrationen zum Menschen gelangen können. Dies kann im Extremfall zu einer Gefährdung von Menschen mit geschwächten Immunsystemen (z.B. durch AIDS, Organtransplantationen, Krebspatienten in immunsupprimierter Therapie etc.) sowie von alten Menschen und Säuglingen bzw. Kleinkindern führen.

Statistisch gesicherte Daten zu trinkwasserbedingten Erkrankungen sind in Deutschland selten. Weltweit jedoch gibt es immer wieder Informationen über bakterielle Erkrankungen, die von im Trinkwasser auftretenden Mikroorganismen hervorgerufen wurden (siehe Tab. 2.1).

Die hohen hygienischen Anforderungen an die Qualität des Wassers sind in den Regularien und Trinkwasserverordnungen verschiedener Länder festgelegt (DVGW, W294, 2003; ÖNORM 5873, 2001; US-EPA, 2006; WHO, 2004). Der Trinkwasseraufbereitung kommt daher eine große Bedeutung zu. Vor der Aufbereitung steht jedoch die Trinkwassergewinnung. In Deutschland werden zur Aufbereitung von Trinkwasser durchschnittlich 64% Grundwasser, 27% Oberflächenwasser und 9% Quellwasser verwendet (http://www.forum-trinkwasser.de/datenundfakten/versorgung_gebrauch.html). Grundwasser wird aus Tiefen von rund 50 Metern, häufig aber auch aus tiefer liegenden Schichten gefördert. Beim Grundwasser wird echtes und angereichertes Grundwasser bzw. Uferfiltrat unterschieden. Quellwasser ist Grundwasser, das von selbst zu Tage tritt. Oberflächenwasser ist solches aus fließenden

Gewässern, Talsperren und Seen. Viele andere Länder verwenden im Gegensatz zu Deutschland überwiegend Oberflächenwässer zur Trinkwasseraufbereitung.

Oberflächenwasser ist im Gegensatz zu Grundwasser äußeren Einflüssen unmittelbar zugänglich. Beeinflussungen sind vor allem klimatisch (Licht, Wärme), hydrologisch (Niederschlag, Zuflüsse), geogen (Sedimenteinschwemmungen, Bodenabtrag) und anthropogen (Abwassereinleitung, wirtschaftliche Nutzung) (Hoyer und Bernhardt, 1996). Im jahreszeitlichen Zyklus sowie abhängig von Hochwassereinbrüchen ändert sich die Wasserbeschaffenheit in Oberflächenwässern (Talsperren und Seen) erheblich. Hochwässer sind meist reich an Bakterien, organischen und anorganischen Substanzen sowie Trübstoffen, die aus dem Einzugsgebiet und den Bachläufen abgeschwemmt bzw. ausgespült werden.

Auch bei Einhaltung des Multibarrierensystems kann der Rückhalt von Bakterien durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden (Stevik et al., 2004). Neben den Partikelgrößen poröser Matrices und den Zellgrößen, die wichtige Parameter zur Immobilisierung von Bakterien darstellen, wird die Adsorption von Zellen in porösen Medien weiterhin von hydraulischen Bedingungen, DOC-Gehalt, Grad der Biofilmentwicklung, elektrostatischen Wechselwirkungen und anderen physikalisch-chemischen Parametern beeinflusst. Nwachuku und Gerba (2004) beschrieben weitere Faktoren für das Überleben und die Resistenz von Mikroorganismen gegenüber der UV-Desinfektion. Mycobakterien z.B. besitzen einen hohen Anteil von Lipiden in der Zellwand, der die Zellen robust und für viele desinfizierende Agenzien unzugänglicher macht. Beschrieben sind bei einigen Mikroorganismen auch Dauer-Stadien wie Cysten, Oocysten oder Sporen. Weitere Aspekte für die Resistenz von Mikroorganismen gegenüber Aufbereitung und Desinfektion sind kleine Zellgrößen, Adsorption an Partikel und Aggregatbildung.

Der Gehalt von mikrobiell verwertbaren Nährstoffen in Trinkwasser ist entscheidend für die biologischen Prozesse in den Biofilmen und in der freien Wasserphase. Die übliche Bestimmung des gesamten organisch gebundenen Kohlenstoffs (TOC), des gelösten organisch gebundenen Kohlenstoffs (DOC) und des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) sind chemische Parameter, die zwar summarisch organische Verbindungen in verschiedenen Wasserkörpern beschreiben können, jedoch wird der tatsächliche Anteil mikrobiell assimilierbarer organischer Kohlenstoffverbindungen (AOC) mit diesen Parametern nicht erfasst.

Im aufbereiteten Trinkwasser kommen nicht-pathogene Bakterien natürlicherweise vor. Die mikrobiellen Gemeinschaften im Trinkwasserverteilungsnetz bestehen hauptsächlich aus oligotrophen Bakterien, die in ihrem Wachstum an die niedrigen Nährstoffkonzentrationen ihrer Umwelt angepasst sind. Die bevorzugte Lebensform von oligotrophen Trinkwasserbakterien ist der Biofilm (Flemming und Wingender, 2001). Die Zusammensetzung bakterieller Populationen in Biofilmen im Verteilungsnetz des Trinkwassers können sehr vielfältig sein. Vertreter der

Gattungen *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Sphingomonas* und *Agrobacter* gehören zu den häufig nachgewiesenen Biofilmbewohnern (Exner, 2003).

Es ist aber je nach Versorgungssituation nicht auszuschließen, dass sich in den Biofilmen auch hygienisch relevante Organismen anreichern können. Beispiele für hygienisch relevante Mikroorganismen, die in Biofilmen nachgewiesen wurden, sind *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Mycobacterium* spp., coliforme Keime, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Acanthamoeba* und Enteroviren. In Tabelle 2.1 sind einige primäre und opportunistische bakterielle Pathogene aufgeführt, die im Wasser gefunden wurden und teilweise schon zu Ausbrüchen von Krankheiten geführt haben.

Trotz allgemein guter Trinkwasserqualität in den meisten Industrieländern gibt es weltweit immer wieder durch mikrobiell kontaminiertes Wasser verursachte Erkrankungen mit zum Teil epidemieartigen Ausbrüchen. Beunruhigend ist, dass immer wieder neue Krankheitserreger im Trinkwasser auftauchen, wie z.B. Cryptosporidien, Legionellen oder Viren, deren Sensibilität gegenüber Desinfektionsmaßnahmen teilweise noch nicht umfassend untersucht ist. Zu den neuen Krankheitserregern gehören z.B. verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC), die auch als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet werden. Eine erhöhte Toleranz gegenüber chemischen und physikalischen Desinfektionsmaßnahmen wird auch als Desinfektionsresistenz beschrieben (Payment und Roberts, 2004; Hijnen et al., 2006).

Gerade der Nachweis von *Cryptosporidium parvum* (Nwachuku und Gerba, 2004, Goldstein et al., 1996, Payment und Robertson, 2004) oder *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC, Schindler, 2004) unterstreicht den wachsenden Bedarf nach Strategien zur Erkennung und zur Eliminierung von potentiell auftretenden aus dem Wasser stammenden Pathogenen und opportunistischen Keimen durch geeignete Desinfektionsmaßnahmen.

Tabelle 2.2 stellt u.a. einige Krankheitserreger dar, die neuerdings auch für die Trinkwasseraufbereitung von Bedeutung sind.

Tab. 2. 1: Primäre und opportunistische bakterielle Pathogene aus dem Wasser.**A:** Primäre pathogene Bakterien.

Organismen	Gesundheitliche Bedeutung	Ursprüngliche Herkunft	Ausbrüche ¹	CCL ²
<i>Salmonella typhi</i>	Typhus	humane Fäkalien	X	
<i>Salmonella paratyphi</i>	Paratyphus	humane Fäkalien	X	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastroenteritis	humane/tierische Fäkalien	X	
<i>Andere Salmonella sp.</i>	Gastroenteritis	humane/tierische Fäkalien	X	
<i>Shigella</i>	Bakterielle Ruhr	humane Fäkalien	X	
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera	humane Fäkalien, Küsten	X	
<i>Enterovirulente E.coli</i>	Gastroenteritis	humane Fäkalien	X	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis	humane/tierische Fäkalien	X	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	humane/tierische Fäkalien	X	
<i>Legionella pneumophila</i>	Legionärs-Krankheit	Oberflächenwasser	X	
<i>Helicobacter pylori</i>	Magengeschwüre	Speichel/humane Fäkalien		X

B: Opportunistische pathogene Bakterien aus dem Verteilungssystem/ Biofilm.

Organismen	Gesundheitliche Bedeutung	Ausbrüche ¹	CCL ²
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Lungenentzündung, Meningitis u.a.		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sepsis u.a.		X
<i>Citrobacter spp.</i> ³	Septicemia/ Lungenentzündung		
<i>Enterobacter spp.</i> ³	Septicemia/ Lungenentzündung		
<i>Flavobacterium spp</i>	Septicemia/ Meningitis		
<i>Klebsiella pneumonia</i> ³	Septicemia/ Lungenentzündung		
<i>Moraxella spp.</i>	Lungenentzündung u.a.		
<i>Mycobacterium avium complex</i>	Chronische Diarrhöe, chronische Lungenentzündung	X	X
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Fuss-Infektionen		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infektionen bei schweren Verbrennungen, Krebspatienten, der Lunge bei Cystis Fibrosis, Lungenentzündung, Meningitis u.a.		
<i>Serratia marcescens</i>	Septicemia/ Lungenentzündung		

¹ dokumentierte, aus dem Wasser stammende Krankheitsausbrüche in den USA² Pathogen; in der EPA Contaminant Candidate List (CCL), März 1998, aufgeführt.³ einige Spezies sind Coliforme.

(Aus: US-EPA, 2002).

Tab. 2. 2: „Neue“ Krankheitserreger mit Relevanz für die Trinkwasseraufbereitung.

Mikroorganismen	Literatur	Besonderheiten/ Resistenzen
<i>Cryptosporidium</i>	Nwachuku und Gerba, 2004 Goldstein et al., 1996 Payment und Roberts, 2004	resistent gegenüber Chlor
<i>Adenovirus</i>	Ko et al., 2005 Nwachuku et al., 2005	doppelsträngiges DNA-Genom; resistent gegenüber UV-Strahlung
Entero-Viren, Bakteriophagen	Shin et al., 2005	kleine Zellgröße
<i>Bacillus subtilis</i> -Sporen	Farjardo-Cavazos et al., 2005 Rice und Ewell, 2001	resistent gegenüber UV-Strahlung
enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> -Stämme (EHEC)	Sommer et al., 2000	unterschiedliche Sensitivität gegenüber UV-Strahlung

1998 wurde von der „United States Environmental Protection Agency“ (US-EPA) die erste „Drinking Water Contamination Candidate List“ (CCL) erstellt. Sie beinhaltet unkontrollierte Kontaminationen, von denen man weiß oder erwartet, dass sie in öffentlichen Wassersystemen auftauchen und ein Risiko für das Trinkwasser darstellen können. Die erste Liste beinhaltet 10 Mikroorganismen. Von dieser Liste scheinen *Mycobacterium avium*, Microsporidien und Adenovirus diejenigen zu sein, die mit konventioneller Trinkwasseraufbereitung am schwierigsten zu eliminieren sind (US-EPA CCL 2005, Gerba et al., 2003).

Problematisch beim Nachweis von Bakterien aus dem aufbereiteten Trinkwasser ist die Tatsache, dass kulturelle Isolierungsmethoden teilweise nicht genügen, um Mikroorganismen in den verschiedenen Lebensstadien nachzuweisen.

Mikroorganismen können natürlicherweise eine erhöhte Toleranz gegenüber den Desinfektionsmaßnahmen besitzen. Hier spricht man auch, wie schon beschrieben, von Resistenz. Andererseits können diese Mikroorganismen Lebensstadien einnehmen, in denen sie noch lebensfähig sind, aber auf gängigen Kulturmedien nicht mehr kultiviert werden können. Dieses lebensfähige aber nicht mehr kultivierbare Stadium (VBNC: viable but nonculturable) wird auch für viele pathogene Bakterien einschließlich *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio* spp. und *Legionella pneumophila* beschrieben (Oliver, 2005, Signoretto et al., 2005, Byrd et al., 1991). Unberücksichtigt bleiben Bakterien, die durch Desinfektionsmaßnahmen, wie UV-Bestrahlung, geschädigt, aber nicht dauerhaft inaktiviert sind. Zunächst können auch diese Bakterien nicht im Kulturverfahren nachgewiesen werden.

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Reparatur ist es jedoch möglich, dass sie nachfolgend im Verteilungssystem die Vermehrungsfähigkeit wieder erlangen.

Aus diesem Zusammenhang wird deutlich, wie wichtig es ist, die zellulären und molekularen Mechanismen hinsichtlich Lebensfähigkeit und Resistenz gegenüber Desinfektion zu verstehen. Gemäß dem Vorsorgeprinzip sind diese molekularen Methoden zur Evaluierung von Desinfektionsverfahren zu entwickeln und ergänzend einzusetzen.

2.2 UV-Desinfektion und Reparatur

2.2.2 UV-Desinfektion und Desinfektion von Trinkwasser

Es gibt verschiedene Arten der Trinkwasserdesinfektion. Die in Deutschland zulässigen Möglichkeiten zur Desinfektion von Wasser sind vom Umweltbundesamt in der Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren (Stand 2005) in Teil I c vorgegeben. In Tabelle 2.3 ist diese Liste zusammengefasst.

Tab. 2. 3: Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren für Trinkwasser in Deutschland (aus: Umweltbundesamt, 2005).

Stoffname	Zulässige Zugabe	Konzentrationsbereich nach Abschluss der Aufbereitung
Calciumhypochlorit	1,2 mg/L freies Chlor	max. 0,3 mg/L freies Chlor min. 0,1 mg/L freies Chlor
Chlor	1,2 mg/L freies Chlor	max. 0,3 mg/L freies Chlor min. 0,1 mg/L freies Chlor
Chlordioxid	0,4 mg/L freies Chlor	max. 0,2 mg/L freies Chlor min. 0,05 mg/L freies Chlor
Natriumhypochlorit	1,2 mg/L freies Chlor	max. 0,3 mg/L freies Chlor min. 0,1 mg/L freies Chlor
Ozon	10 mg/L O ₃	max. 0,05 mg/L O ₃
Desinfektionsverfahren:		
<ul style="list-style-type: none"> ➤ UV-Bestrahlung (240-290 nm) ➤ Dosierung von Chlorgaslösung ➤ Dosierung von Natrium- und Calciumhypochloritlösung ➤ Elektrolytische Herstellung und Dosierung von Chlor vor Ort ➤ Dosierung einer vor Ort hergestellten Chlordioxidlösung ➤ Erzeugung und Dosierung von Ozon und Ozonlösung vor Ort. 		

Das traditionell verwendete Verfahren ist die Desinfektion mit Chlor (Kerwick et al., 2005; Roeske und Müller, 2003). Mikroorganismen werden durch unspezifische oxidative Prozesse inaktiviert. Es werden Zerstörung von Zellmembran, Inhibition von Metabolismus und Proteinbiosynthese sowie Modifizierungen von Purin- und Pyrimidinbasen beschrieben (LeChevallier und Au, 2004). Vorteilhaft bei Chlor ist die sogenannte Nachhaltigkeit, d.h. die Restdesinfektionswirkung im Verteilungsnetz. Nachteile sind Veränderung von Geruch, Geschmack und Farbe des Wassers (Schmidt, 2004). Ein großer Nachteil bei der Behandlung mit Chlor kann die Entstehung von Desinfektionsnebenprodukten wie halogenierte

Reaktionsnebenprodukte z.B. Haloforme, Trihalogenessigsäure oder halogenierte höher molekulare Verbindungen z.B. halogenierte Kohlenwasserstoffe und Trihalogenmethane (THM's) sein (Grohmann, 2004). Sie sind teilweise kanzerogen und besitzen ein mutagenes Potential. Auch beim Einsatz von Chlorderivaten und Ozon können unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Daher gibt es für einige dieser Desinfektionsmittel eine gesetzliche Festlegung von Höchstkonzentrationen (s. Tab. 2.3).

Aufgrund der Problematik von Desinfektionsnebenprodukten wurde der Desinfektion mit UV-Licht als alternatives Verfahren größere Beachtung geschenkt. UV-Strahlung schädigt die Zelle durch Veränderungen an deren DNA. Ist die Zelle dadurch letal geschädigt, kann sie sich nicht mehr replizieren und stirbt. Der große Vorteil der UV-Desinfektion ist, dass keine bis jetzt bekannten toxischen Nebenprodukte gebildet werden (Haider et al., 2002). Es sind jedoch bei Bakterien weit verbreitete Reparaturmechanismen bekannt, die aktiv werden, wenn die Zelle nicht abgetötet, sondern nur geschädigt war.

Die Prinzipien der Trinkwasserdesinfektion sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

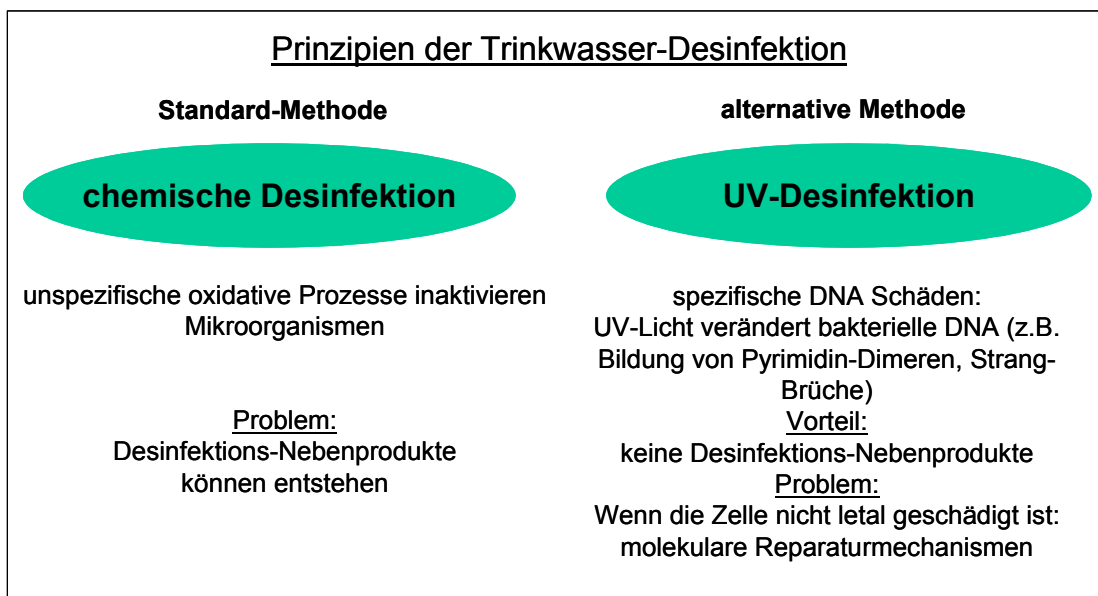


Abb. 2. 1: Verschiedene Prinzipien der Trinkwasserdesinfektion mit relevanten Vor- und Nachteilen.

Schwartz et al. (2003) untersuchten Biofilme in einem Wasserwerk direkt nach verschiedenen Desinfektionsverfahren von Trinkwasser. Es konnte gezeigt werden, dass die Art der Trinkwasserdesinfektion einen signifikanten Einfluss auf die Biofilmbildung in einem realen Trinkwasserverteilungsnetz ausübt (Schwartz et al., 1998 a und 2003). Sowohl die Gesamtzellzahl als auch im besonderen Maße die metabolische Aktivität der Bakterien in den Biofilmen war nach der UV-Desinfektion im Vergleich zur früher durchgeführten Chlordioxid-

Desinfektion deutlich erhöht. Es konnten direkt nach dem UV-Bestrahlungsreaktor opportunistische Bakterien wie Enterokokken (potentielle Träger von Resistenz- und Virulenzgenen) in Biofilmen gefunden werden. Auch im unterstromigen Verteilungssystem wurden lebensfähige Opportunisten nachgewiesen (Emtiazi et al., 2004, Schwartz et al., 1998 b).

In Europa wird seit den 80er Jahren die Anwendung von UV-Strahlung in der Trinkwasserdesinfektion zunehmend eingesetzt. Der große Durchbruch für diese Techniken, auch in den USA, kam mit der Entdeckung ihrer Wirkung gegenüber *Cryptosporidium* und *Giardia*, die als sehr unempfindlich gegenüber Chlor gelten (Clancy et al., 1998).

2.2.3 Molekulare Grundlagen: UV-Strahlung und DNA

Licht ist durch seine Wellenlänge charakterisiert (Abb. 2.2). Sichtbares Licht umfasst einen Bereich von 400 nm bis 700 nm. Licht mit einer Wellenlänge länger als 700 nm liegt im infraroten und Radiostrahlungs-Bereich.

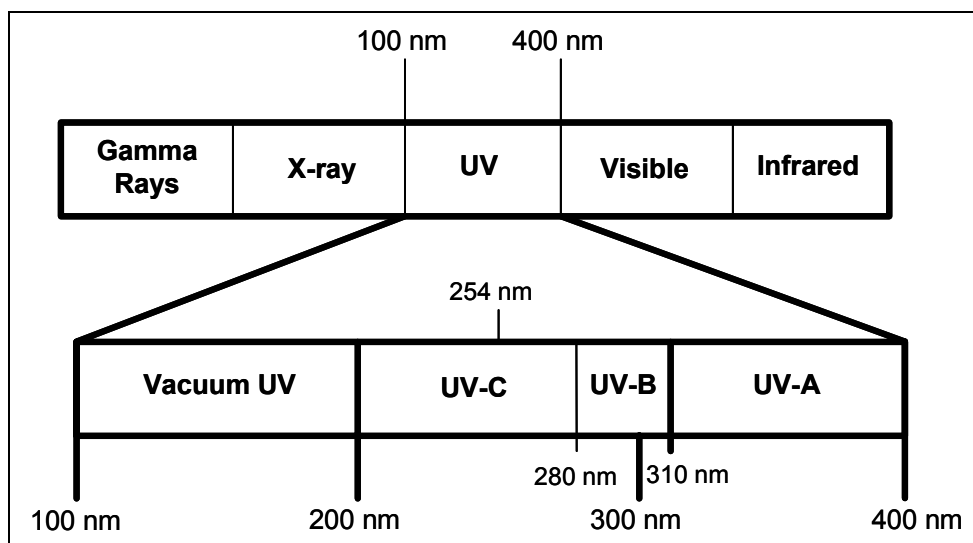


Abb. 2. 2: UV-Licht im elektromagnetischen Spektrum (aus: Liu, 2005)

Der ultraviolette Bereich wird durch die Wellenlängen unterhalb 400 nm abgedeckt. Dieser Bereich wurde in drei Wellenlängen-Banden unterteilt, die als UV-A (320 – 400 nm), UV-B (280 – 320 nm) und UV-C (200-280 nm) bezeichnet werden. UV-C-Licht bzw. -Strahlung wird oft als „germizid“ (keimtötend) bezeichnet, da es von Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Ribonukleinsäuren (RNA) und Proteinen absorbiert wird und die Inaktivierung von Bakterien und Viren verursacht. Licht mit Wellenlängen unter 200 nm wird vom Wasser und von Luft

absorbiert und kann nur in einem Vakuum übertragen werden. Deshalb wird dieser Bereich „Vakuum-Ultraviolett“ genannt (Bolton und Henke, 1999).

UV-Strahlung ist generell biologisch hoch relevant, da lebende Organismen seit Beginn der Evolution des Lebens auf diesem Planeten sich gegenüber dem genotoxischen Effekt der UV-Strahlung der Sonne zu behaupten hatten. Üblicherweise verwendet man als praktikable germizide Wellenlänge einen Bereich zwischen 200 und 300 nm (Bolton, 1999), d.h. hauptsächlich UV-C- und UV-B-Strahlung.

In Abbildung 2.3 ist der Verlauf einer typischen DNA-Absorptionskurve dargestellt. Die DNA hat ihr Absorptionsmaximum nahe 260 nm. Die Absorption fällt nahe 300 nm auf den Nullpunkt. Mikroorganismen sind innerhalb der germiziden Wellenlängen um 260 nm am sensitivsten. Es gibt aber auch Ausnahmen. MS2-Bakteriophage und Herpes Simplex-Virus haben beispielsweise ihre größte Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung bei einer Wellenlänge unter 230 nm (Linden et al., 2001).

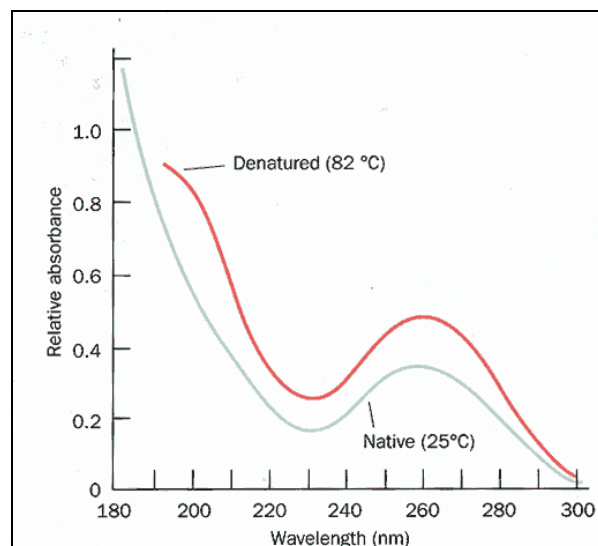


Abb. 2. 3: Absorptionsspektrum der DNA (aus: Voet und Voet, 1994).

2.2.4 UV-Lampendesign

Für die Trinkwasserdesinfektion mit UV-Licht werden verschiedene Arten von Lampentypen eingesetzt. Die Erzeugung von UV-Licht beruht darauf, dass in einer elektrischen Entladungslampe ein Lichtbogen erzeugt wird, in dem Atome angeregt werden und UV-Strahlen emittieren. Art der Atome, Dampfdruck, Temperatur, Stromdichte etc. beeinflussen diese Emission. Bewährt haben sich bislang Quecksilber- (Hg-) Dampflampen mit speziellen für die UV-Lichtabgabe optimierten Quarzglas Kolben und Vorschaltgeräten. Die UV-Lampen befinden sich in Hüllrohren aus Quarzglas, die zur Trinkwasserdesinfektion in Bestrahlungskammern eingebaut sind und vom Wasser umströmt werden.

Hg-Niederdrucklampen haben eine nahezu monochromatische Emission bei 254 nm, die fast mit dem Absorptionsmaximum der DNA korrespondiert (Abb. 2.4, links, Abb. 2.5). Sie sind die klassischen UV-Quellen, die traditionell für die Wasserdesinfektion verwendet werden (Clauß et al., 2005). Weiterhin werden Hg-Mitteldruckstrahler verwendet. Sie besitzen einen Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm (Abb. 2.4 rechts, Abb. 2.5).

In Tabelle 2.4 sind einige Fakten und Daten zu den unterschiedlichen Lampentypen zusammengefasst. Abbildung 2.5 zeigt die Lage der DNA-Absorptionskurve zusammen mit den Spektral-Kurven der beiden UV-Lampentypen in einem Schaubild.

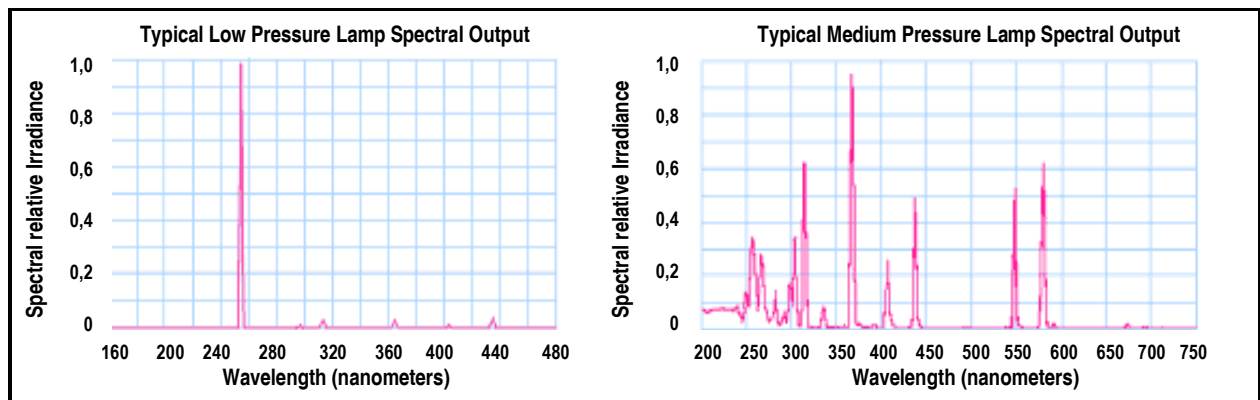


Abb. 2. 4: Relative spektrale Emission von einer typischen Niederdrucklampe (low pressure, LP, links) und einer Mitteldrucklampe (medium pressure, MP, rechts) (aus: UV-Xtender).

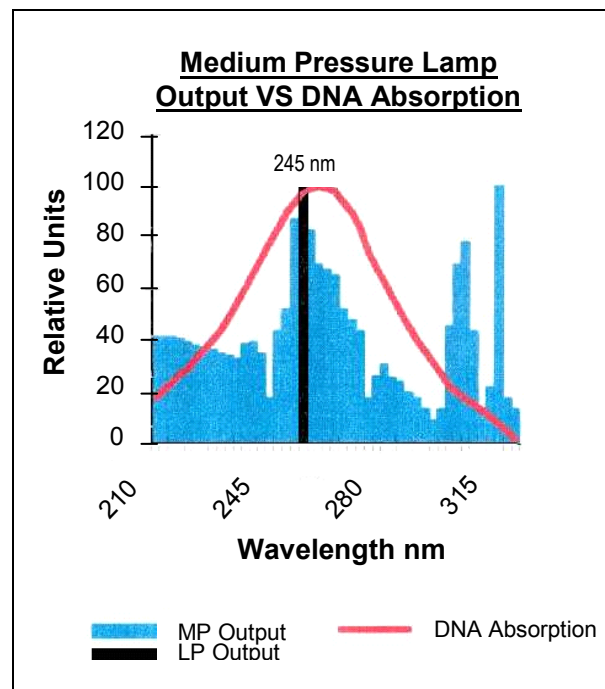


Abb. 2. 5: Spektrale Energieverteilungskurve keimtötender Effekte und die Strahlungsleistung von Nieder- und Mitteldruck-UV-Lampen (aus: Lenntech).

Tab. 2. 4: Daten und Fakten der Hg-Niederdruck- und -Mitteldrucklampen

Hg-Niederdrucklampe	Hg-Mitteldrucklampe
→traditionell für Wasserdeseinfektion verwendet →nahezu monochromatische Emission bei 254 nm →hohe Temperaturempfindlichkeit →geringe UV-Leistung pro cm Leuchtlänge <u>Amalgam-Lampen:</u> →2-4 fach stärker als Hg-Niederdrucklampen →spezielle, meist regelbare Vorschaltgeräte →25% der aufgenommenen elektrischen Energie wird in desinfektionswirksame UV-Strahlung umgesetzt →90% der Strahlung werden im UV-Spektralbereich bei 254 nm abgegeben →Leistungsdichte: 0,4 Watt UV-Licht pro cm Leuchtlänge	→Wellenlängenbereich von 200 und 400 nm →wesentlich intensiver →produzieren überwiegend sichtbares Licht und Wärmestrahlung →setzen nur 5-10% der elektrischen Energie in desinfektionswirksame UV-Strahlung um →Leistungsdichte: etwa 8 Watt UV-Licht pro cm Leuchtlänge →Regelung der Leistung ausgezeichnet

2.2.5 Vor- und Nachteile der UV-Desinfektion

Voraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz der UV-Desinfektion sind eine geeignete Wasserqualität und das Erfüllen einiger technischer Forderungen. Außerdem ist zu bedenken, dass das Wasser nach dem Verlassen des Bestrahlungsreaktors keine restdesinfizierende Schutzwirkung besitzt.

Im Folgenden sind einige Vor- und Nachteile der UV-Desinfektion aufgelistet.

Vorteile der UV Desinfektion:

- gute Desinfektionseigenschaften, verändert im Gegensatz zu Chlor weder den Geschmack, den Geruch, die Farbe noch den pH-Wert des Wassers
- kein Bedarf an gesundheitsschädlichen Chemikalien
- keine Gefährdung durch Überdosierung
- keine bekannten Rückstände bzw. Nebenprodukte im Wasser
- geringer Energiebedarf (5 - 50 W/m³)
- kompakte Bauweise, geringer Platzbedarf (keine Wasserkammer als Reaktionsvolumen) und einfache Installation
- geringer Wartungsaufwand
- Automatisierung und Fernüberwachung möglich
- die laufenden Kosten sind häufig niedriger als die einer normalen Haushaltsglühbirne

Nachteile der UV Desinfektion:

- 5 – 15 Minuten nach Einschalten bis zur vollen Desinfektionswirkung
- bei Stromausfall Unterbrechung der Desinfektion
- regelmäßiger Tausch der UV-Lampen erforderlich (etwa 1 mal pro Jahr)
- regelmäßige Kontrolle und ggf. Reinigung (je nach Gerät und Einsatzbedingungen etwa monatlich)
- keine Restdesinfektionswirkung im nachfolgenden Verteilungssystem

Eigene Untersuchungen bei einer realen Wasserverteilungsanlage zeigten, dass sogar direkt nach dem UV-Bestrahlungsreaktor Biofilme existieren, die opportunistischen Keimen wie Enterokokken eine Möglichkeit zur Reparatur und zum Schutz bieten. Das Reparatur- und Wiedererholungs- (Regenerations-) Verhalten bzw. die generelle Auslösung von Schutzmechanismen (Stressantwort) bei Bakterien nach UV-Desinfektion wurde im Detail und auf molekularer Ebene noch nicht praxisnah untersucht.

2.2.6 Reparaturmechanismen von Bakterien

Bakterielle genomische DNA ist wie jedes Makromolekül konstantem chemischen und physikalischen Angriff/Stress unterworfen. Die Reparatur der daraus resultierenden Schäden ist essentiell, da DNA als Matritze (Template) der Transkription und ihrer eigenen Reduplikation dient. Im Verlauf der Evolution hat sich eine komplexe enzymatische Maschinerie entwickelt, um die Struktur und Funktion dieses zentralen und wichtigen Moleküls in einer brauchbaren Form aufrechtzuerhalten.

Die Existenz von biologischen Reparatursystemen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber DNA-schädigenden Umwelteinflüssen.

Die Zellkomponenten, die hauptsächlich im UV-C-Wellenlängenbereich Strahlung absorbieren, sind Nukleinsäuren und die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Cystin, sowie die daraus abzuleitenden Proteine (Clauß et al., 2005). Die Absorption der UV-Strahlung durch Proteine spielt bei der Inaktivierung durch UV-Strahlung gegenüber den Nukleinsäuren eine untergeordnete Rolle. Die Nukleinsäurebestandteile mit der höchsten UV-Absorption sind die Nukleinbasen (Adenin, Guanin, Thymin bzw. Uracil und Cytosin). Als Reinsubstanz absorbieren die Purine stärker als die Pyrimidine. Die meisten Photoprodukte in Nukleinsäuren finden sich jedoch bei den Pyrimidinen. Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um Dimere, Addukte und Hydrate.

Das wichtigste zur Inaktivierung beitragende Photoprodukt ist das *cis-syn* Thymindimer (Abb. 2.6 a), das bei 254 nm mit der höchsten Quantenausbeute entsteht (Setlow und Carrier, 1964). Ein weiteres bedeutsames Photoprodukt ist das Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Addukt (Abb. 2.6 b),

das bei der Mutationsauslösung eine wichtige Rolle spielt (Franklin und Haseltine, 1986). Andere Effekte, die durch die UV-Strahlung verursacht werden, sind Basenverluste, Basenvernetzungen bzw. Basenproteinvernetzungen und Einzelstrangbrüche. Einzelstrangbrüche und Basenverluste sind jedoch sekundäre Effekte. Durch die UV-Strahlung kommt es somit zur Veränderung der DNA. Replikation und Transkription werden beeinträchtigt bzw. verhindert, was zum Tod der Zelle führen kann.

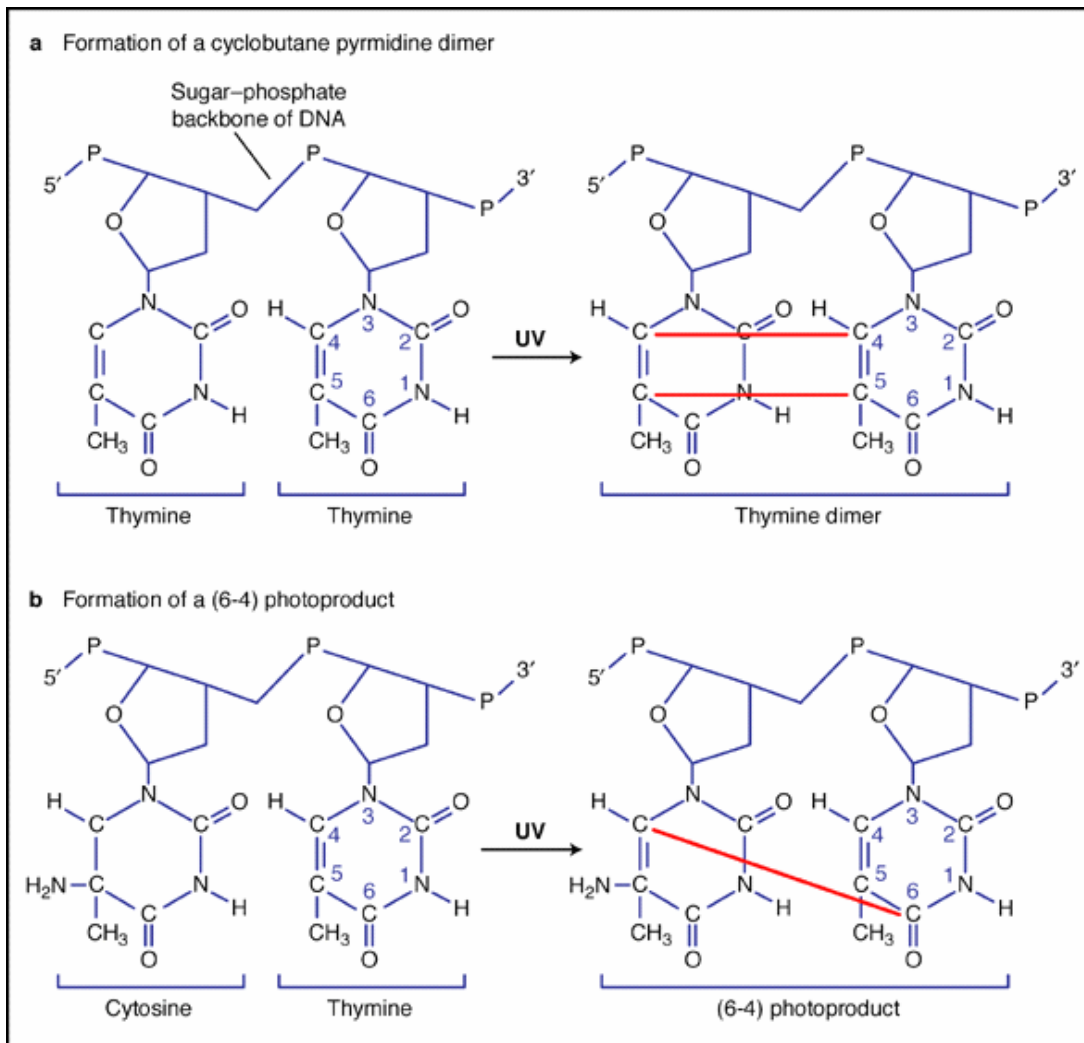


Abb. 2. 6: Struktur der Haupt-Photoprodukte der DNA, die durch UV-Strahlung induziert werden (aus: Matsumura und Ananthaswamy, 2002). Thymin (T), Cytosin (C). a) Bildung zwei benachbarter T -Moleküle (diese Abb.) oder zwei benachbarter C- Reste (nicht gezeigt) zu einem T-T-oder zu einem C-C- Cyclobutan-Pyrimidindimer. b) Bildung von (6-4) Photoprodukten zwischen 5' C-4-Position und der 3' C-6-Position der zwei benachbarten Pyrimidine, entweder zwischen T-C- (diese Abb.) oder C-C –Resten (nicht gezeigt).

Die bakterielle Zelle besitzt eine Anzahl von verschiedenen Strategien, um auf negative Umwelteinflüsse und Stressfaktoren zu reagieren. Durch diese Stressregulation wird sie weniger angreifbar. In Abbildung 2.7 sind einige dieser Stressantworten dargestellt z.B. Hunger-Antwort bei niedrigem Nährstoffangebot, Ausbildung und Übertragung von Resistenzgenen oder Efflux-Pumpen bei bestimmten Chemikalien (z.B. Antibiotika), Ausbildung resistenter Dauerstadien (z.B.) Sporenbildung oder Übergang in das VBNC („viable but nonculturable“) - Stadium.

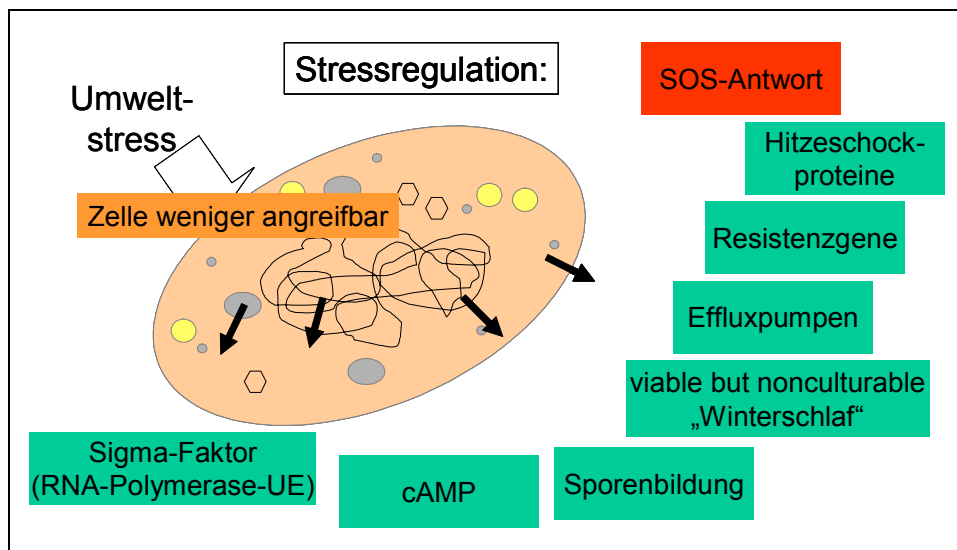


Abb. 2. 7: Stress auf Bakterien: genetische oder metabolische Antwort der Zelle.

Einige Stressantworten werden durch spezifischen Stress induziert. So induzieren DNA-Schäden das SOS-System, während die Hitzeschock-Antwort bei Protein-Denaturierung aktiviert wird. Andere Antworten, wie z.B. die Induktion des Sigma-Faktors (*rpoS* regulon) durch unterschiedliche Stressoren, resultieren in der Expression eines sehr komplexen Netzwerkes funktioneller, unabhängiger Gene. Diese erhöhen die zelluläre Fähigkeit, gegen eine große Anzahl von Stressfaktoren zu bestehen. Diese Antworten sind mehr in Schutz und Vorbeugung involviert als in Reparatur (Matic et al., 2004).

Das SOS-System stellt eine generelle Antwort der Zelle auf unterschiedliche Stressoren dar, die – wie die UV-Strahlung – die DNA schädigen. Das RecA-Protein ist das Schlüssel-Protein in diesem System. Es wird durch einzelsträngige Bereiche in der DNA aktiviert und fungiert dann nicht nur als Rekombinations-Enzym, sondern auch als Protease (s.u. SOS-Antwort). Die SOS-Antwort wird nur ausgelöst, wenn ein Bedarf an Reparatur vorliegt und unreparierte, also einzelsträngige DNA-Bereiche sich in der Zelle anhäufen.

Es gibt verschiedene Arten von DNA-Reparaturmechanismen bei Bakterien. Die einen werden durch Licht induziert (Photoreaktivierung), die anderen benötigen kein Licht zur Aktivierung (Dunkelreparatur). Für UV-Schäden der DNA werden drei prinzipiell unterschiedliche Dunkelreparatur-Mechanismen beschrieben, die bei *Escherichia coli* weitgehend aufgeklärt sind und die z.T. auch bereits für Eukaryonten bestätigt werden konnten (Booth et al., 2001 b):

- 1) die Nucleotid-Excisions-Reparatur
- 2) die postreplikative oder Rekombinations-Reparatur
- 3) die mutagene oder SOS-Reparatur

Reparatur unter Einwirkung von Licht (Photoreaktivierung)

Der Mechanismus, der der Photoreaktivierung zugrunde liegt, ist nahezu vollständig aufgeklärt. Die Photolyase, das Enzym, auf dem der Effekt der Photoreaktivierung beruht, erkennt und monomerisiert die *cis-syn* Thymindimere vom Cyclobutantyp (Berg und Sancar, 1998, Mees et al., 2004). Dafür benötigt sie die Zufuhr von Aktivierungsenergie in Form von Licht der Wellenlänge 310 nm bis 490 nm (sichtbares Licht), welches durch das Chromophor des Enzyms absorbiert wird. Es wurde ein direkter Elektronentransfer vom angeregten Flavin-Kofaktor (FADH⁻) auf das Dimer und ein Elektronenrücktransfer von den reparierten Thyminen beobachtet (Kao et al., 2005). Die Wellenlänge, die eine maximale Aktivierung induziert, variiert in Abhängigkeit von der Spezies. Bei *Escherichia coli* beträgt diese Wellenlänge 385 nm. Das aktivierte Enzym bewerkstelligt dabei die katalytische Umsetzung mit einer außerordentlich hohen Effektivität.

Die Befähigung zur Photoreaktivierung ist bei vielen Spezies bekannt. Untersuchungen beim Genus *Bacillus* ergaben große Unterschiede in dieser Fähigkeit zur Photoreaktivierung. Einige Stämme zeigten sehr starke Photoreaktivierungsaktivität, während bei anderen eine schwache (*B. subtilis*) bzw. keine Photoreaktivierungsaktivität beobachtet werden konnte (Nicholson, 1995).

Die Photoreaktivierung wurde im Hinblick auf die Überlebensfähigkeit von Indikatorkeimen und pathogenen Mikroorganismen nach der UV-Desinfektion von Trinkwasser und Abwasser vielfach untersucht (Harris et al., 1987, Schoenen und Kolch, 1992, Lindauer und Darby, 1994, Kolch und Schoenen, 1994, Chang und Killig, 1995, Liltved und Landfald, 1996, Kashimada et al., 1996, Shaban et al., 1997, Tosa und Hirata, 1999, Sommer et al., 2000, Oguma et al., 2002).

Weitere Reparaturmechanismen sind für die Stabilität der DNA von essentieller Bedeutung. Reparatur bedeutet in diesem Fall Entfernung geschädigter DNA-Stellen und Einbau (Polymerisierung) neuer Teilstücke. Hier wird keine Zuführung von zusätzlicher Aktivierung in Form von Licht benötigt. Deshalb nennt man diese Mechanismen Dunkelreparatur.

Die mikrobielle Dunkelreparatur-Antwort auf DNA-Schäden ist die SOS-Antwort. Diese wurde im Hinblick auf die UV-Desinfektion von Trinkwasser noch nicht untersucht.

Dunkelreparatur und die Rolle von RecA (SOS-Antwort)

Die Bezeichnung SOS-Antwort wurde als erstes von Miroslav Radman in der Mitte der 70er Jahre geprägt (Radman, 1974). Die bakterielle SOS-Antwort ist eine globale Antwort auf DNA-Schäden, wobei die DNA-Replikation gestoppt und die DNA-Reparatur induziert wird. Die SOS-Regulation beinhaltet somit den Zellzyklus-Kontrollpunkt und das DNA-Reparatursystem (McGrew und Knight, 2003). *Escherichia coli* wurde im Hinblick auf die SOS-Antwort bisher am intensivsten untersucht.

Das RecA-Protein ist ubiquitär und hoch konserviert bei Prokaryoten und niederen Eukaryoten (Miller, 2000). Es stellt eine zentrale Komponente in der Katalyse der Rekombinations-DNA-Reparatur dar und reguliert die zelluläre SOS-Antwort. Es ist in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert, u.a. homologe Rekombination, Reparatur von stillgelegten Replikationsgabeln, Doppelstrangbruch-Reparatur, SOS-Antwort, SOS-Mutagenese und Koordination der Zellteilung. Es koordiniert die Induktion von über 20 Genen (McKenzie et al., 2000). Konola et al. (2000) berichtet von 27 Genen, Fernandez de Henestrosa et al. (2000) von 31 Genen und Courcelle et al. (2001) von 40 Genen in *E.coli*, deren Expression durch RecA gesteuert werden. Im gesamten Genom von *E.coli* liegen ungefähr 4300 Gene vor. 31 Gene machen schon 0,7% des Genoms aus.

RecA ist ein klassisches, allosterisch reguliertes Enzym. Die Bindung von ATP resultiert in einer drastischen Erhöhung der DNA-Bindungs-Affinität und einer kooperativen Zusammensetzung von RecA-Untereinheiten zu einem geordneten, helikalen Nucleoprotein-Filament. Trotz der mechanischen Unterschiede in seinen Funktionen ist immer die Bildung eines aktiven RecA/ATP/DNA-Komplexes notwendig (McGrew und Knight, 2003, Stohl et al., 2003).

Die SOS-Antwort einer *E.coli*-Zelle ist schematisch in Abbildung 2.8 zu sehen. Hier ist ein DNA-Abschnitt dargestellt, auf dem beispielhaft einige SOS-Gene liegen. (a) zeigt den nicht induzierten Zustand und (b) den induzierten Zustand der Zelle.

In der nicht induzierten *E.coli*-Zelle reprimiert das Produkt des *lexA*-Gens, das LexA-Protein, die Expression von über 20 Genen, einschließlich *lexA* und *recA*, durch das Binden an ähnliche Operator-Sequenzen jedes Gens bzw. Operons (Matic et al., 2004). Die Operatorsequenzen, die durch LexA gebunden werden, werden SOS-Boxen genannt. Die Intensität der Bindung von LexA an das Operon ist von der Ähnlichkeit der LexA-Consensus-Sequenzen der jeweiligen Gene mit der DNA-Bindungsstelle des LexA-Proteins abhängig (Fernandez de Henestrosa,

2000). Die Bindungsintensität verschiedener Gene variiert, was Unterschiede im Zeitpunkt der Induktion zur Folge hat.

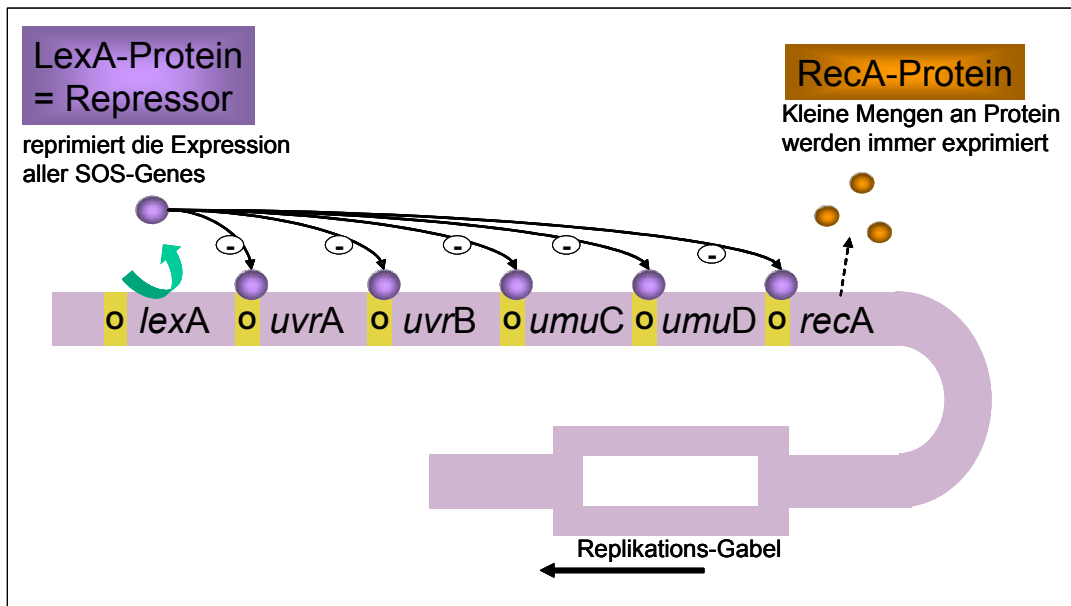
Viele dieser SOS-Gene, einschließlich *recA* und *lexA* werden in signifikanten Mengen auch in reprimiertem Zustand exprimiert. Vor allem das RecA-Protein wird mit nahezu 7200 Molekülen pro Zelle im nicht induzierten Zustand exprimiert, was offensichtlich ausreichend für seine Rolle in der homologen Rekombination ist (Friedberg et al., 1995).

Wenn das Genom einer *E.coli*-Zelle geschädigt ist oder die DNA-Replikation gehemmt ist, wird ein intrazelluläres Signal für die SOS-Induktion erzeugt (Abb. 2.8 b). Dieses Signal für die Induktion der SOS-Antwort ist einzelsträngige DNA. Es entsteht, wenn die Zelle versucht, ein geschädigtes Template zu replizieren oder wenn der normale Prozess der Replikation unterbrochen ist. Das Binden des RecA-Proteins an die einzelsträngigen DNA-Regionen in Anwesenheit eines Adenosintriphosphats (ATP) wandelt dieses reversibel in eine aktive Form um. LexA-Moleküle diffundieren zum aktivierten RecA-Protein und interagieren mit diesem Nukleoprotein-Komplex (Harmon et al., 1996). Daraus resultiert, dass LexA proteolytisch an einer spezifischen Alanin-Glycin-Bindung nahe der Mitte des Proteins gespalten wird. Die proteolytische Spaltung (Selbstverdau) von LexA wird vom aktivierten RecA erleichtert (Coprotease-Funktion).

In gespalteener Form ist LexA als Repressor inaktiv. Der LexA-Proteinspiegel verringert sich in der Zelle, so dass verschiedene Gene, *recA* eingeschlossen, in größeren Mengen exprimiert werden und daraus SOS-Antworten, die durch diese Gene vermittelt werden, resultieren. Gene mit Operatoren, die LexA relativ leicht binden, sind die ersten, die voll exprimiert werden. Andere Gene werden nur exprimiert, wenn die Schäden in der Zelle sehr groß sind (Courcelle et al., 2001). Die Menge an RecA-Protein kann sich in der Zelle bis zu 50-fach erhöhen (Kuzminov, 1999).

Wenn die Zelle beginnt, sich von dem SOS-induzierenden Schaden zu erholen, verringern sich die Bereiche einzelsträngiger DNA als Konsequenz verschiedener DNA-Reparatur-Prozesse und RecA-Moleküle wandeln sich wieder in ihren inaktiven Zustand um. Die fortlaufende Synthese von LexA-Protein führt dann zu einem Anstieg des LexA-Protein-Gehalts in der Zelle, was eine Repression der SOS-Gene und eine Umwandlung in den nicht induzierten Zustand zur Folge hat (Abb. 2.8 a).

a) Nicht induzierter Zustand.



b) Induzierter Zustand.

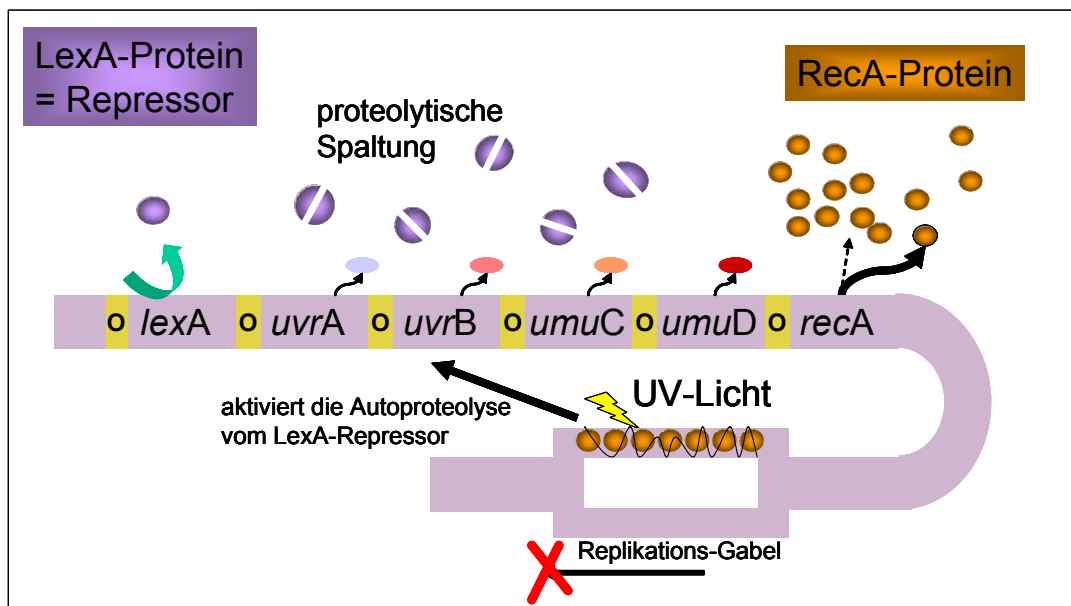


Abb. 2. 8: Die SOS-Antwort bei Bakterien. O: Operator.

2.3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Dunkelreparaturantwort von Trinkwasserbakterien und opportunistischen Bakterien auf molekularer Ebene nach Behandlung mit UV-Strahlung in Anlehnung an den deutschen Standard in der Trinkwasseraufbereitung zu untersuchen. Der Fokus der Untersuchungen lag auf dem Schlüssel-Gen *recA* und dessen Genprodukten.

Die Abbildung 2.9 zeigt das methodische Fließschema der vorliegenden Arbeit. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Parametern aufgebaut, um verschiedene Fragestellungen zu klären.

Fragestellungen:

- Welche Bakterien reagieren auf UV-Strahlung mit SOS-Antwort und gibt es Unterschiede bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien?
- Zu welchem Zeitpunkt nach der UV-Bestrahlung und bei welcher UV-Strahlungsintensität wird ein *recA*-Genprodukt induziert?
- Wie stabil sind diese *recA*-Genprodukte in den induzierten Bakterienzellen?
- Bei welcher Bakteriendichte kann das aktivierte *recA*-Gen und RecA-Protein noch induziert und nachgewiesen werden?
- Wird aktiviertes *recA*-Gen und RecA-Protein auch nach chemischer Desinfektion induziert?

Untersuchungsparameter:

- Vertreter typischer Trinkwasserbakterien: *Caulobacter crescentus* und *Aquabacterium commune* (beide Gram-negativ). Vertreter für opportunistischen Keime: *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) und *Enterococcus faecium* (Gram-positiv).
- *recA*-Untersuchungen: auf DNA-, mRNA- und Proteinebene.
- Bakteriendichten: $OD_{600} = 0,05 - 0,25$.
- UV-Strahlungsintensitäten: 400 J/m^2 (deutschen Standard), zusätzlich $100 - 600 \text{ J/m}^2$.
- Dunkelinkubation von Bakterien nach der Stressbehandlung: 2 h bzw. 2 – 27 h.
- Untersuchung der Induktion von *recA*-mRNA über: (a) Northern Blot-Analyse und (b) reverse Transkription mit anschließender Real Time-PCR. Parallel Untersuchung von „housekeeping“-Genen als Bezugsgröße der Genexpression.
- Untersuchung der Induktion von RecA-Protein über: Western Blot-Analyse.
- Chemische Desinfektion: Natriumhypochlorit.

Grundlage der gesamten Untersuchungen war die Erstellung von *recA*-spezifischen Primern und Sonden sowie die Etablierung eines RecA-spezifischen Antikörpers.

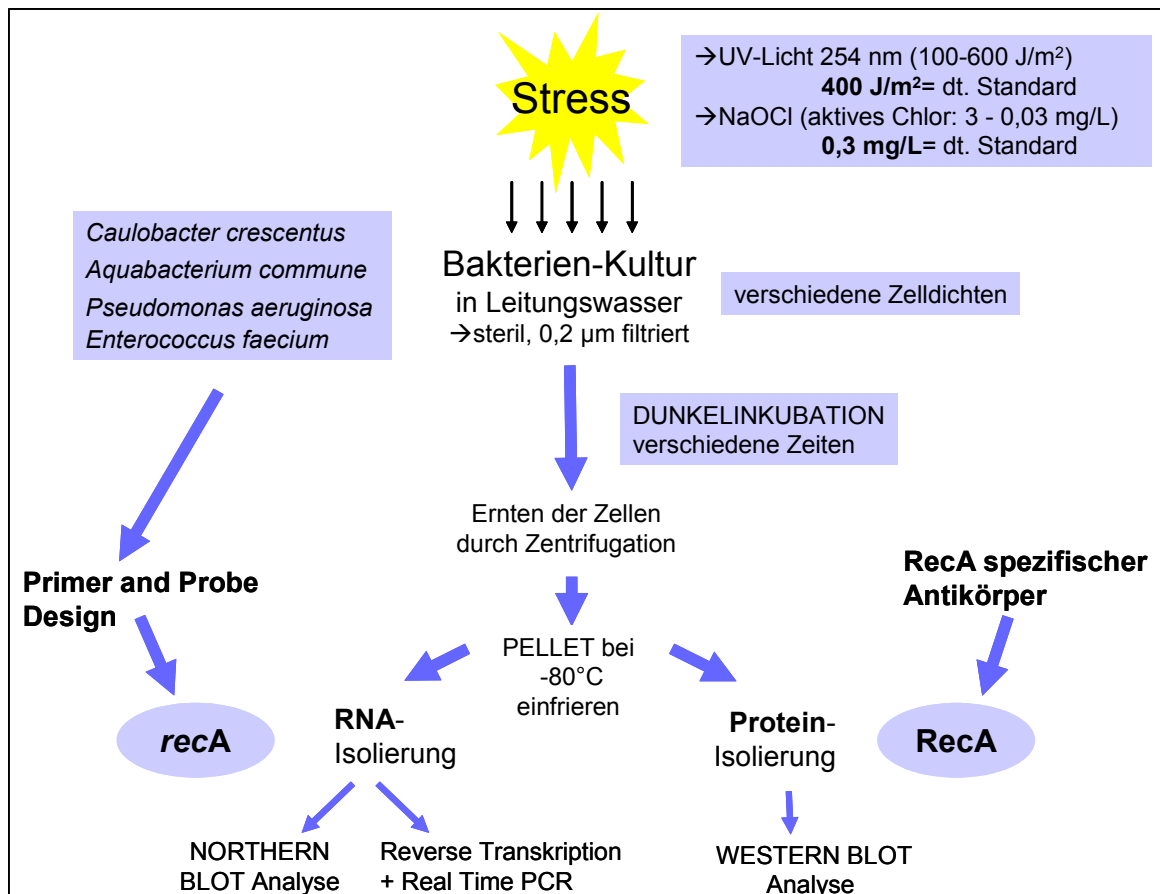


Abb. 2. 9: Methodisches Fließschema der Arbeit mit den verschiedenen Versuchsparametern.

Die ausgewählten Bakterien werden im Folgenden kurz vorgestellt:

- Das Gram-negative Bakterium *Caulobacter crescentus* wurde aus dem Leitungswasser des Forschungszentrums Karlsruhe isoliert. Es handelt sich hier um ein oligotrophes α -Proteobakterium, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde (Niermann et al., 2001). Als einfaches und hochmanipulierbares Ein-Zell-Modellsystem wurde es zur Untersuchung zellulärer Differenzierung, asymmetrischer Teilung und Koordination des Zellzyklus verwendet. Es wurden sessile-gestielte (stalked) Zellen und bewegliche Schwärmerzellen (piliated, flagellated) beschrieben. Die sessilen Zellen können unterschiedliche Biofilme (Monolayer bzw. dicht gepackte mushroom-shaped Biofilme) ausbilden (Entcheva-Dimitrov und Spormann, 2004).
- *Aquabacterium commune* wurde aus Biofilmen von Trinkwassersystemen isoliert und gilt als typisches Trinkwasserbakterium (Kalmbach et al., 1999). Es gehört zu der Gruppe der β -Proteobakterien. Der untersuchte Stamm wurde bei der DSMZ bestellt (DSM 11901).
- *Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitärer Krankheitserreger und gehört zur Gruppe der γ -Proteobakterien. Der widerstandsfähige Keim vermehrt sich in den Biofilmen der Wasserversorgungssysteme und hat eine besondere Bedeutung im Bereich von

Krankenhäusern und Schwimmbädern. *Pseudomonas aeruginosa* ist bekannt als Erreger der Cystischen Fibrose, einer Lungenerkrankung, und spielt bei Sekundärinfektionen, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, alten Menschen und Kindern, eine Rolle.

- Enterokokken sind Darmbewohner von Warmblütern. Der Nachweis von Enterokokken kann somit als Indikator für eine fäkale Verunreinigung gewertet werden. Sie sind im Gegensatz zu den anderen untersuchten Bakterien Gram-positiv. Gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmitteln sind sie widerstandsfähiger und hitzestabiler als *E. coli*. Enterokokken, wie *Enterococcus faecium*, werden als opportunistische Bakterien beschrieben, die überwiegend Sekundärinfektionen beim Menschen auslösen können.

Im folgenden Teil werden die Grundlagen der molekularbiologischen Nachweismethoden für den Nachweis der SOS-Antwort dargestellt.

2.4 Molekulare Grundlagen der angewandten Nachweismethoden

Die Expression der genetischen Information umfasst die Übersetzung der linearen Nukleotide in der DNA in eine Aminosäuresequenz, die sich zum Protein faltet (Abb. 2.10). Zuerst wird ein begrenzter Abschnitt der DNA (ein Gen) in eine komplementäre Nukleotid-Kette von mRNA (Boten-RNA) kopiert (Transkription). Die mRNA wird in einer Reaktion, die durch einen großen Multienzymkomplex, das Ribosom, katalysiert ist, in Protein übersetzt (Translation). Die für die Proteinsynthese benötigten Aminosäuren sind an tRNA-Molekülen (Transfer-RNA) gebunden. Die Sequenz der Nucleotide in der mRNA wird in Dreiergruppen (Codons), entsprechend dem universellen genetischen Code, abgelesen. Dabei entstehen alle Proteine, die für Struktur, Metabolismus und Wachstum der Zelle unerlässlich sind.

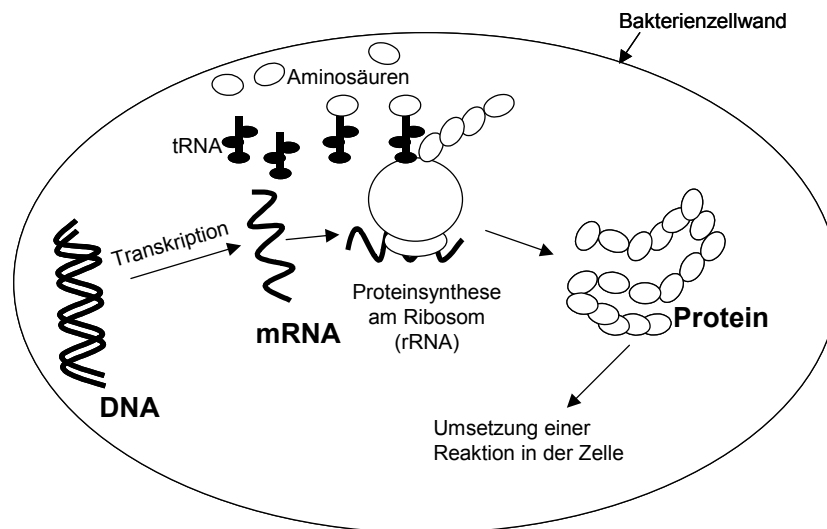


Abb. 2. 10: Schema der Proteinbiosynthese.

Die mRNA macht etwa 5% der Gesamt-RNA der Zelle aus. Sie dient als Matrize für die Proteinsynthese und hat eine kurze Lebensdauer. Die rRNA (ribosomale RNA) ist der Hauptbestandteil der Ribosomen. Sie macht den größten Teil der Gesamt-RNA in der Zelle aus (ca. 80%). Die tRNA bildet etwa 15% der Gesamt-RNA in der Zelle.

Zum Nachweis des *recA*-Gens und dessen Induktion wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewandt. *recA/RecA* wurde auf drei Ebenen nachgewiesen (Abb. 2.10):

- (1) **DNA-Ebene:** Der Nachweis des *recA*-Gens in den Bakterien war grundlegend für die nachfolgenden Expressionsanalysen. Es wurden Primer und Sonden spezifisch für ausgewählte Bakterienspezies und Bakteriengattungen entwickelt und mittels PCR an Bakterien getestet. Somit konnte das Vorhandensein des *recA*-Gens in den Bakterien

nachgewiesen werden. Zum Nachweis und zur Spezifität der *recA*-Sequenz konnten die amplifizierten *recA*-Genabschnitte sequenziert werden.

- (2) **RNA-Ebene:** Die Induktion des *recA*-Gens wurde auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurde Gesamt-RNA aus den UV-bestrahlten und Dunkel inkubierten Zellen isoliert. Nach photometrischer Messung des RNA-Gehalts wurde die gleiche Menge an Gesamt-RNA über das Northern Blot-Verfahren analysiert. Dafür wurden *recA*-spezifische, Digoxigenin-markierte Sonden erstellt. Weiterhin wurde die mRNA über eine Reverse Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend mit *recA*-spezifischen Primern und einer fluoreszenzmarkierten Sonde in eine Real Time-PCR eingesetzt. Die Induktion des *recA*-Gens konnte somit quantifiziert werden.
- (3) **Protein-Ebene:** Für die Untersuchung des RecA-Proteins wurden nach definierten Dunkelinkubationszeiten Zellextrakte erstellt. Es wurde Gesamt-Protein gemessen. Die gleiche Menge Gesamt-Protein wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe eines für das RecA-Protein spezifischen Antikörpers konnte die Proteinbildung nach Bestrahlung mit UV über das Western Blot-Verfahren nachgewiesen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterien

Folgende Referenzbakterien wurden verwendet:

- Aquabacterium commune* (DSM 11901)
- Caulobacter crescentus* (Trinkwasser-Isolat)
- Enterococcus caseliflavus* (DSM 20680)
- Enterococcus faecalis* (DSM 20478)
- Enterococcus faecium* (B7641)
- Enterococcus faecium* (DSM 20477)
- Escherichia coli* (DSM 1103)
- Legionella pneumophila* (ATTC 3315)
- Pseudomonas aeruginosa* (verschiedene Stämme: #49, #154; Umweltisolate)
- Pseudomonas alcaligenes* (DSM 50342)
- Pseudomonas fluorescence* (DSM 6147)
- Pseudomonas pseudoalcaligenes* (DSM 50188)
- Pseudomonas putida* (DSM 291)
- Pseudomonas stutzeri* (DSM 5190)
- Pseudomonas syringae* pvar. *syringae* (DSM 10604)

Alle verwendeten Bakterien lagen in Glycerinkulturen (50% Glycerin, Merck) vor. Die DNA der Referenzbakterien wurde mit dem Qiagen Genomic DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2 Wachstumsbedingungen für Bakterien zur Untersuchung der SOS-Antwort

R2A-Agar (Merck)

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar; Merck)

Luria Broth-Medium (LB-Medium, Miller; Merck)

Herz-Hirn-Bouillon (Brain Heart Infusion, BHI; Merck)

R2A-Medium: 0,5 g Hefeextrakt (Roth), 0,5 g Pepton (Merck), 0,5 g Casein (Merck), 0,5 g Glucose-Monohydrat (Merck), 0,3 g Natriumpyruvat (Merck), 0,3 g K_2HPO_4 (Merck), 0,05 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Merck), 1 mL Tween80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) auf 1L mit dH_2O auffüllen (nach Angaben der DSMZ, R2A-Medium ohne Stärke, mit 1 mL/L Tween80).

Das Bakterium *Caulobacter crescentus* wurde aus dem Leitungswasser (Forschungszentrum Karlsruhe) isoliert und wuchs auf R2A-Agar und in Luria Broth-Medium bei 23°C.

Aquabacterium commune wuchs in selbst hergestelltem, Stärke-freiem R2A-Medium, mit 0,1% Tween80 bei 23°C.

Pseudomonas aeruginosa and *Enterococcus faecium* (Umweltisolate) wuchsen auf R2A-Agar und in Herz-Hirn-Bouillon (BHI) bei 37°C. Enterokokken wurde auch auf KAA-Agar kultiviert. Agarplatten wurden im Brutschrank (23°C bzw. 37°C) inkubiert. Flüssigkulturen wurden in 50 mL-Röhrchen beimpft und auf dem Schüttler inkubiert.

3.3 Geräte und Materialien

Unter diesem Punkt sind oft verwendete Geräte und Materialien aufgeführt. Speziell für eine Methode eingesetzte Geräte und Materialien sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

Geräte:

- Autoklav Dampfsterilisator (Varioklav)*
- Lumi-Imager T1™ (Roch Diagnostics Mannheim)*
- Magnetrührer MR 3001 (Heidolph)*
- pH-Meter 776 Calimatic (Knick)*
- Analysen-Waage Laboratory LC 220 S (Satorius)*
- Waage BL 3100 (Satorius)*
- Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus)*
- Zentrifuge 5403 (Eppendorf)*
- Vortexgerät: Vortex Mixer Stuart (Bibby Sterlin)*

Materialien:

- Duran-Flaschen 250, 500, 1000 mL (Schott)*
- Nitril-Handschuhe (Ansell health care)*
- Pinzetten (VWR)*
- Research® Pipetten 10 µL, 100 µL, 1000 µL, 10 mL (Eppendorf) mit entsprechenden Pipettenspitzen (Eppendorf)*
- Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL (Eppendorf)*
- Zentrifugen-Röhrchen, 15 und 50mL (Sarstedt, Nümbrecht)*

3.4 Primer

Die hier aufgeführten Primer wurden von Veröffentlichungen oder von der Arbeitsgruppe übernommen. Die in dieser Arbeit erstellten Primer sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Tab. 3. 1: Primersequenzen für einen Abschnitt auf der 16S-rDNA.

Primer	Zielgen	Nucleotidsequenz (5'→3')	Position (<i>E. coli</i>)	Referenz
27F	16S	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	8-27	Emtiazi et al., 2004
517R		5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	534-517	

Tab. 3. 2: Primer- und Sondensequenzen („Primer/Probe“-Systeme) für die Real Time-PCR spezifisch für Abschnitte verschiedener *Quorum sensing*-Gene in *Pseudomonas aeruginosa*.

Primer	Zielgen	Nucleotidsequenz (5'→3')	Referenz
lasI-F	lasI	GCCCCTACATGCTGAAGAACA	Schwartz, Persönl. Mittelungen. nicht veröffentlicht.
lasI-R		CGAGCAAGGCGCTTCCT	
lasI-P		6-FAM-CTTCCCGGAGCTTCTGCACGGC-TAMRA	
lasR-F	lasR	TTTCTGGGAACCGTCCATCAT	Schwartz, nicht veröffentlicht
lasR-R		GCCGACGCTTTCTCGAA	
lasR-P		6-FAM-CCAGACGCGAAAGCAGCACGAG-TAMRA	
QS-F	rhIR	TGTTCCCGCTCCTGGAA	Schwartz, nicht veröffentlicht
QS-R		CGCCATAGGCGTAGTAATCGA	
QS-P		6-FAM-AGGAAGTGC GGCGCCTGGG-TAMRA	
PA4296-FP	Pa4296	CGGCAACGGCAGGTTCT	Schwartz, nicht veröffentlicht
PA4296-RP		CATGGCCTCGATCACTTCCT	
PA4296-P		6-FAM-AATCGATCATCCTCACGGGTCACGA-TAMRA	

3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Thermocycler GeneAmp® PCR-System 9700 (Applied Biosystem)

Sterilbank (Holten Lamin Air)

Elektrophoresekammer (Renner)

Elektrophoresenetzgerät (Biorad)

Sterile PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 mL, DNA-frei (Eppendorf)

10x PCR-Puffer, einschließlich 15 mM MgCl₂ (Qiagen)

dNTP Set, 100 mM Lösungen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland): je 10 mM Endkonzentration.

Vorwärts- und Rückwärts-Primer (je 10 mM; Applied Biosystems)

HotStar-Taq™ Polymerase (5 units/μL, Qiagen)

LiChroSolv PCR-Wasser (Merck)

Agarosegel: 0,4 g QA-Agarose™ Multipurose (Qbiogen) af 40 mL 1x TAE-Puffer, aufkochen. 4 μL 1% Ethidiumbromid Stammlösung (Endkonzentration im Gel 1 μg/ml, Sigma) dazu.

TAE-Puffer (100 x, 1 Liter): 484,4 g (4 M) Tris-Base (Sigma), 82,0 g (1 M) Natriumacetat (Merck) und 37,2 g (0,1 M) EDTA (Riedl-deHaen) einwiegen, 500 ml dH₂O zugeben, ca. 100 ml Eisessig (Sigma) zufügen, lösen, pH 8.0 einstellen, auf 1 L mit dH₂O auffüllen, autoklavieren.

Probenpuffer (Beschickungspuffer): 2 ml EDTA (50 mM) pH 8.0 , 0,4 g (20%) Ficoll (Sigma), 5 mg (0,25%) Bromphenolblau (Sigma), 5 mg (0,25%) Xylen-Cyanol (Sigma).

Längenstandard 100 bp-Ladder XIV (Roche)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine schnelle und effektive Technik zur *in vitro* Vermehrung (Amplifikation) von spezifischen DNA-Abschnitten. Die Amplifikation erfolgt in drei Schritten: Denaturieren der doppelsträngigen DNA durch Hitze, Anlagern (Annealing) der Primer (kurze Nukleotidsequenzen, die zu bestimmten Regionen der DNA komplementär sind) und Neusynthese des jeweiligen neuen Gegenstrangs aus Nukleotidbausteinen mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Diese drei Schritte werden 30 - 40 mal wiederholt.

Ein 50 μ L-Ansatz einer PCR-Reaktion enthält:

- 5 μ L 10x PCR-Puffer, einschließlich 15 mM $MgCl_2$
- 1 μ L dNTP-Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)
- 1,5 μ L Vorwärts- und Rückwärts-Primer (je 10 mM)
- 0,25 μ L HotStar-TaqTMPolymerase (5 units/ μ L, Qiagen)
- 1-10 μ L Template-DNA

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Gene Amp[®] PCR System 9700 mit folgendem Temperaturprofil:

	95°C	15 min	einleitenden Aktivierung der Polymerase
	94°C	1 min	Denaturierung
35 Zyklen:	60°C	2 min	Annealing
	72°C	3 min	Elongation
	72°C	7 min	abschließende Extension

Dieses Temperaturprogramm wurde für alle in der PCR verwendeten Primer eingesetzt. Ausnahme war die Amplifikation der 16S-rDNA mit der Primerkombination 27F/517R: 35 Zyklen bei 94°C für 1 min, 55°C für 1 min und 72°C für 1,5 min.

Die PCR-Produkte wurde mit Probenpuffer (10 μ L PCR-Produkt + 1 μ L Probenpuffer) auf einem Ethidiumbromid-haltigen 1%igen Agarosegel (Rezept s.o.) in 1x TAE-Puffer bei 80 Volt für 30 min elektrophoretisch aufgetrennt und am Lumi-Imager ausgewertet. Durch Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert, wurde die doppelsträngige DNA nachgewiesen.

3.6 Optische Vermessung von DNA und RNA

RNA/DNA-Photometer GeneQuant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech)

Die Konzentration von DNA und RNA in Lösung kann photometrisch mit dem „RNA/DNA-Photometer“ GeneQuant bestimmt werden. Das Gerät misst die Extinktion bei 260 nm

(Absorptionsmaximum von DNA bzw. RNA) sowie 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen).

Die Nukleinsäurenkonzentration errechnet sich aus der Extinktion bei 260 nm, der Verdünnung der Probe und einem jeweils für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor.

Eine Aussage über die Reinheit der DNA und RNA wird über das Verhältnis Extinktion bei 260 nm zu Extinktion bei 280 nm gemacht. Dieser Quotient liegt für eine reine Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2,2. Wenn der Wert unter 1,6 liegt, wird eine Aufreinigung der DNA bzw. RNA empfohlen.

3.7 Sequenzierung

UV-Tisch (Fröbel Labortechnik)

Skalpell (VWR)

Thermo mixer compact (Eppendorf)

DNA-Photometer GeneQuant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech)

Sequenzier-Kit (incl. Premix): BigDye[®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied (Biosystems)

DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen/ Hilden)

Hi-Di-Formamid (Applied Biosystems)

Polymer POP4 (Applied Biosystems)

Buffer 10x mit EDTA (Applied Biosystems)

LiChroSolvWasser (VWR)

ABI PRISM[®] Genetic Analyser 310 (Applied Biosystems)

Glaskapillare (47 cm x 50 µm; Applied Biosystem)

Software Sequencing Analysis (Applied Biosystems)

Die DNA-Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgt mit Hilfe des ABI 310 (Applied Biosystems) nach dem Sanger Prinzip. In einem PCR-ähnlichen Ansatz sind in einer Pufferlösung neben einem Primer, einer Polymerase und dNTPs auch ddNTPs (Di-Desoxyribonukleosidtriphosphate) enthalten. Die verschiedenen ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei der Extension werden zufällig ddNTPs eingebaut und die Polymerase-Reaktion bricht ab, da der DNA-Polymerase die 3'-Hydroxylgruppe für die Ausbildung der nächsten Phosphodiester-Bindung fehlt (Kettenabbruch-Reaktion). Beim Einsatz eines Primers der vorherigen PCR-Reaktion entstehen dadurch DNA-Fragmente mit 3'-terminaler Fluoreszenzmarkierung der Längen des um ein Nukleotid verlängerten Primers zur Größe des PCR-Produktes. In einer Kapillarelektrophorese am ABI Prism[®] Genetic Analyser 310 werden die Produkte unter denaturierenden Bedingungen nach Größen getrennt. Denaturierendes Agens ist hochkonzentrierter Harnstoff, der dem Polymer zur Befüllung der

Kapillare beigefügt ist. Aus einem Probengefäß wird eine Glaskapillare mit den zu trennenden DNA-Molekülen durch Anlegen einer Spannung über wenige Sekunden beladen. Die DNA wandert entlang des Spannungsfeldes durch die Kapillare. Durch Wechselwirkungen mit dem Polymer und der Kapillarwand trennen sich die DNA-Fragmente der Größe nach auf. Ihre Detektion findet an einem Laser-Fenster durch Aufnahme des Nukleotid-spezifischen Fluoreszenzsignals statt. Zur Markierung der DNA stehen vier Farbstoffe zur Verfügung. An Hand der Abfolge der Fluoreszenzfarben kann die Nukleotidsequenz ermittelt werden.

Zur Herstellung des Templates (DNA-Matritze) für die Sequenzierung wurde eine spezifische PCR durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind im Kapitel 3.5 beschrieben. Die PCR-Produkte wurden auf einem Ethidiumbromid-haltigen 1%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Auf dem UV-Tisch wurden die Banden ausgeschnitten und in 50 - 100 µL Wasser 2 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung vom Gel abgetrennt. Der DNA-Gehalt wurde mit dem Gene Quant RNA/DNA Calculator photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.6).

Die Sequenzier-Reaktionen wurden in 20 µL-Ansätze durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 4 µL Premix, 3 - 10 µg DNA-Template, 10 pmol Vorwärts- oder Rückwärts-Primer, aufgefüllt auf 20 µL Gesamtvolumen mit dH₂O.

Die Sequenzier-Reaktion erfolgte im Thermocycler mit dem folgenden Temperaturprofil:

	96°C	5 min	
	<hr/>		
	96°C	10 sec	Denaturierung
25 Zyklen:	60°C	5 sec	Annealing
	60°C	1 min	Elongation

Bis zur weiteren Verwendung wurde der Reaktionsmix auf 4°C abgekühlt.

Um überschüssige Fluoreszenzfarbstoff-markierte ddNTPs zu entfernen, wurde das Sequenzier-Produkt mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit aufgereinigt (Handbuch, Qiagen). Hierbei wurde das Produkt auf eine Gelmatrix in einem Spin-Säulchen pipettiert und mit der Tischzentrifuge Biofuge Pico bei 2800 rpm für 3 min zentrifugiert. 6 µL der aufgereinigten DNA wurden mit 9 µL Hi-Di-Formamid gemischt und in den ABI PRISM[®] Genetic Analyser 310 geladen.

Die Kapillarelektrophorese wurde mit einer 47 cm Kapillare, dem Polymer POP4 und den in Tabelle 3.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tab. 3. 3: Bedingungen für den Sequenzier-Lauf.

<i>Modul:</i>	<i>P4rapidSeqE.md4</i>
<i>Injection time</i>	<i>10 sec</i>
<i>Electrophorese voltage</i>	<i>15 kV</i>
<i>Collection time</i>	<i>20 min</i>
<i>EP voltage</i>	<i>15 kV</i>
<i>Heat plate temperature</i>	<i>50°C</i>
<i>Syringe pumping time</i>	<i>240 sec</i>

Ausgewertet wurden die Sequenzen mit Hilfe der Sequencing Analysis-Software. Über die Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurden die ausgewerteten Sequenzen mit schon bekannten Sequenzen verglichen.

3.8 Herstellung der Bakterien-Ausgangssuspension für die Bestrahlung mit UV

Photometer Aquamate (Thermo Spectronis)

Einmal-Küvetten 1,5 mL halbmikro (Brand)

Brutschränke 20°C und 37°C (Mettler)

Schüttler Unimax 2010 (Heidolph) mit Inkubatorhaube Certomat® H (Braun Biotech International)

steriles Leitungswasser: Leitungswasser wurde durch 0,2 µm-Polycarbonat-Membranfilter (25 mm Durchmesser, 0,2 µm, Costar) filtriert und anschließend autoklaviert. Filtriereinheit (Sartorius).

Die Bakterien wurden aus Glycerinkulturen auf Agarplatten ausgestrichen und im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde eine Vorkultur in entsprechendem Flüssigmedium (s. Kapitel 3.2) in einem sterilem 50 mL-Röhrchen erstellt und über Nacht auf dem Schüttler bei der geeigneten Temperatur wachsen gelassen. In einem sterilen 50 mL-Röhrchen wurden 20 mL neues Medium mit 3 mL Vorkultur angeimpft und ca. 3 h auf dem Schüttler bei geeigneter Temperatur inkubiert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (3000 g, 10 min, Zentrifuge Eppendorf 5403). Die Pellets wurden in sterilem, 0,2 µm-filtriertem Leitungswasser aufgenommen. Mit Hilfe des Photometers wurden die Bakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte von 0,05 - 0,25 bei 600 nm (OD₆₀₀) eingestellt.

3.9 UV-Bestrahlung

Petrischalen, steril (90 mm Durchmesser; Greiner, Nürtingen Deutschland)

UV-Crosslinkers (CL-1000 UV crosslinker, UVP, Cambridge, Großbritannien; mit 5 Niederdruck-Quecksilber-Röhren (Sankyo Denki G8T5, Japan))

UV-Sensor (SUV 20. 1A2Y1R, Q8 16 1, diam.160°, IL Metronic Sensortechnik GmbH, Ilmenau OT Unterporlitz, Deutschland)

Mit Hilfe des UV-Crosslinkers wurde die Bakteriensuspension bestrahlt. Der Reaktor enthielt 5 Niederdruck-Quecksilberlampen, die Licht einer nahezu monochromatischen Wellenlänge von 254 nm abgeben. Vor Gebrauch des UV-Crosslinkers wurde dieser mindestens 10 Minuten eingeschaltet, um die Lampen zu erwärmen. Die UV-Bestrahlungsintensitäten konnten unterschiedlich eingestellt werden. Verwendete Intensitäten reichten von 100 bis 600 J/m². Parallel wurde die UV-Strahlung mit einem externen Sensor überprüft, der vom Hersteller kalibriert wurde. Die Intensität der UV-Strahlung wurde durch den Sensor in W/m² gemessen. Unter Berücksichtigung der Bestrahlungszeit war es möglich, die UV-Strahlungsintensität in J/m² zu kalkulieren (siehe Formeln 1 und 2).

$$(1) \quad J \text{ (Joule)} = W \text{ (Watt)} * \text{sec (Sekunde)}$$

$$(2) \quad J/m^2 = W * \text{sec} / m^2$$

Um Abschattungseffekte zu vermeiden, wurden für die Bestrahlung mit UV 5 mL-Aliquots der hergestellten Bakterien-Ausgangssuspension in Leitungswasser in der Mitte einer Petrischale positioniert. Die Höhe des Flüssigkeitstropfens betrug maximal 2 mm.

Nach der Bestrahlung mit UV wurden jeweils 2 mL Bakteriensuspension für die RNA-Extraktion und 2 mL für die Proteinextraktion in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt und unterschiedliche Zeiten (zwischen 2 und 27 h) im Dunkeln bei der jeweiligen Wachstumstemperatur inkubiert. Nach der Dunkelinkubation wurden die Zellen zentrifugiert (10.000 g, 10 min), der Überstand verworfen und die Pellets bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

3.10 Bestimmung der Kolonien-bildende Einheiten (KBE)

Dampftopf (Varioklav)

Wasserbad SW1 (Julabo)

Petrischalen steril (90 mm Durchmesser; Greiner, Nürtingen Deutschland)

Agar (s.o.)

PBS-Puffer (1x): 8 g NaCl (Merck), 0,2 g KCl (Merck), 0, 2g KH₂PO₄ (Merck), 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, pH 7.3, auf 1 L.

Um die Bakterienzahl bei einer gewählten optischen Dichte (OD₆₀₀) und die Abtötungsrate auf die klassische mikrobiologische Weise zu bestimmen, wurden die Kolonien-bildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Parallel zur Isolierung von RNA und Proteinen wurde bei *Caulobacter crescentus*, *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa* in einigen Versuchen ein Aliquot der nicht bestrahlten Probe bzw. der mit 400 J/m² bestrahlten Bakteriensuspension für eine Verdünnungsreihe (10⁻¹ - 10⁻⁸) mit anschließendem Plattengussverfahren (KBE) verwendet. Von der jeweiligen OD₆₀₀ wurden Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ in PBS-Puffer erstellt. Von

jeder Verdünnung wurde im Doppelansatz je 1 mL in eine sterile Petrischale pipettiert. Der Agar (R2A-Agar oder KAA-Agar) wurde im Dampftopf bei 99°C geschmolzen, im Wasserbad auf ca. 50°C abgekühlt und in die Petrischalen mit der Bakteriensuspension gegossen und vermischt. Nach Aushärten bei Raumtemperatur wurden die Platten für 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Aus den Doppelansätzen wurde durch Bildung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Bakterienzahl der Ausgangssuspension berechnet.

3.11 Gesamt-RNA-Isolierung

DEPC-H₂O: 1 mL DEPC (Sigma) auf 1 L dH₂O, mind. 12 h bei 37°C inkubieren, autoklavieren.

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

TE-Puffer: 0,788 g Tris-HCL (10 mM; Sigma), 0,186 g EDTA (1 mM; Riedl-deHaen), pH 8.0 auf 500 mL.

Lysozym: Stammlösung 100 mg/mL (Sigma)

2-Mercaptoethanol (Sigma)

Ethanol (Roth)

RNase-freie DNase (Qiagen)

Vortex-Gerät

Gene Quant DNA/RNA Calculator (Pharmacia Biotech)

Tischzentrifuge Biofuge Pico

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorsicht im Hinblick auf Ribonukleasen (RNasen). Diese Enzyme kommen ubiquitär vor und bauen einzelsträngige und dadurch sehr labile RNA ab. RNasen sind sehr stabil und können beispielsweise nach dem Autoklavieren schnell wieder renaturieren. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, müssen RNase-freie Arbeitsbedingungen etabliert und RNase-freie Chemikalien verwendet werden. Die verwendeten Lösungen wurden so vor Gebrauch mit Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC wirkt effektiv als Nuklease-Inhibitor durch Alkylierung des Histidinrests der RNasen. Zusätzlich wurde bei den Versuchen ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet.

Durchführung:

Das Zellpellet (Kapitel 3.9) wurde aus der –80°C-Truhe genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Standardprotokoll des RNeasy Kits (Qiagen). 100 µL einer 3 µg/mL Lysozym-Lösung in TE-Puffer wurden zu den Bakterien pipettiert und 10 min unter mehrmaligem, starkem Schütteln (Vortex-Gerät) bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Lyse der Bakterien werden große Mengen an RNasen freigesetzt. Um diese zu inaktivieren, wurde β-Mercaptoethanol zugesetzt (350 µL RLT-Puffer (im RNeasy Kit enthalten) + 3,5 µL β-Mercaptoethanol pro Ansatz). β-Mercaptoethanol löst die stabilisierenden

Disulfid-Brücken der RNA-abbauenden Enzyme auf. Zusammen mit der denaturierenden Wirkung des Guanidiniumisothiocyanats (im Puffer des RNeasy Kit vorhanden) wird auf diese Weise die RNA vor der Degradierung geschützt.

Der RNeasy Kit basiert auf den selektiven Adsorptionseigenschaften von RNA an Silicagel-basierten Membranen. In Spin Säulen wird die mit 100% Ethanol (250 µL pro Ansatz) versetzte RNA zunächst selektiv gebunden. Um DNA aus dem RNA-Extrakt zu eliminieren, wurde RNase-freie DNase (Qiagen) eingesetzt (pro Ansatz: 10 µL DNase + 70 µL RDD-Puffer, im DNase-Kit enthalten). Nach Waschschritten mit Ethanol-haltigen Puffern (im Kit enthalten), wurde die Gesamt-RNA mit 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA wurde photometrisch mit dem GeneQuant[®] DNA/RNA Calculator über Absorption bei 260 und 280 nm gemessen (s. Kapitel 3.6). Die gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.12 Northern Blot-Hybridisierung

Vakuumpumpe (Ilmvac Typ 4000481)

Dot-Blot-Apparatur (Biorad)

Nylon-Membran (positively charged, Roche)

Biodot Filterpapier (Biorad)

Hybridisierungsofen (Biometra)

Digoxidenin-markiertes dUTP (DIG-11-dUTP, Roche Diagnostics)

DEPC-Wasser

Prospekthüllen

20x SSC: 87,7 g NaCl (Merck), 44,1 g Na₃-Citrat (Sigma), auf 500 mL mit DEPC-H₂O auffüllen, autoklavieren, pH 7.0.

30x SSC: 131,55 g NaCl, 66,15 g Na₃-Citrat, auf 500 mL mit DEPC-H₂O auffüllen, autoklavieren, pH 7.0.

10% SDS: 50 g SDS (Sigma) auf 500 mL DEPC-H₂O auffüllen.

Puffer 1: 11,6 g Maleinsäure (Sigma), 8,8 g NaCl, ad 1 L mit DEPC-H₂O, pH 7.5 (7 g NaOH, 1 M NaOH), autoklavieren.

10% Blocking-Stammlösung: 10 g Blockingreagenz (Roche) mit Puffer 1 auf 100 mL auffüllen, autoklavieren.

Puffer 2: 10 mL Blocking-Reagenz auf 100 ml mit Puffer 1 auffüllen.

Puffer 3: 15,76 g Tris/HCl (Merck), pH 9.5 (NaOH), 5,84 g NaCl, 10,17 g MgCl₂ x 6 H₂O (Merck) auf 1 L DEPC-H₂O auffüllen.

10% N-Lauroylsarcosin-Lösung: 0,1 g N-Lauroylsarcosin (Sigma) in 1 mL DEPC-H₂O lösen.

1 M Natriumphosphat-Puffer: 1 M Na₂HPO₄ (Merck), 1 M NaH₂PO₄ (Merck), beide Lösungen so mischen, dass ein pH von 7.0 erreicht wird.

High SDS-Puffer: 250 mL Formamid (100%) (Applichem, Darmstadt), 83 mL 30xSSC, 25 mL Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0, 100 mL 10% Blocking Stammlösung, 5 mL 10% N-Lauroylsarcosin, 35 g SDS, auf 500 mL mit DEPC-H₂O auffüllen.

Waschlösung 2x: 10 mL 20x SSC, 1 mL 10% SDS, auf 100 mL mit DEPC-H₂O auffüllen.

Waschlösung 0,5x: 2,5 mL 20x SSC, 1 mL 10% SDS, auf 100 mL mit DEPC-H₂O auffüllen.

Antikörperlösung: Anti-DIG-AP Fab-Fragments (Roche Diagnostics, Mannheim), 1: 10.000 mit Puffer 2 verdünnen.

Waschpuffer: 0,3 mL Tween 20 (Sigma) auf 100 mL mit Puffer 1 auffüllen.

Substratlösung: CPD-Star ready-to-use (Roche Diagnostics, Mannheim)

Sondenerstellung

Zur Herstellung spezifischer Digoxigenin-markierter Sonden können mit Hilfe von Referenzbakterien und spezifischen Primern in der PCR für die gewünschten Genabschnitte spezifische Sonden amplifiziert werden. Dafür werden neben den dNTPs auch Digoxigenin-markierte dUTPs eingesetzt. Man erhält ein spezifisches DIG-markiertes Amplikon, bei dem die Länge von den Primern vorgegeben ist. Diese spezifische Sonde wird zum Nachweis von RNA in der Northern Blot-Hybridisierung verwendet.

Der PCR-Ansatz erfolgte nach dem oben genannten Protokoll (s. Kapitel 3.5), unter Zusatz von jeweils 0,5 µL DIG-11-dUTP (1 µM) zum 50 µL-Ansatz. Die Größe des PCR-Produkts wurde auf einem Ethidiumbromid-haltigen 1%igen Agarosegel kontrolliert.

Northern Blot-Hybridisierung

Der Nachweis von spezifischer mRNA erfolgte mittels Hybridisierung auf einer Nylonmembran. Die Dot Blot-Apparatur wurde vor Gebrauch mit 0,5%-SDS in DEPC-Wasser RNase-frei gemacht. Unter Vakuum wurde eine definierte Menge an Gesamt-RNA (0,1 µg bzw. 1 µg) mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf eine Nylonmembran geblottet. Während des Blot-Vorgangs wurde ausschließlich mit DEPC-Wasser gearbeitet. Nach dem Blotten der RNA auf die Membran wurde die Blot-Apparatur nochmals mit DEPC-Wasser gefüllt und dieses unter Vakuum abgesaugt. Die Membran wurde aus der Blotapparatur genommen und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Als Positivkontrollen wurden am Rand der Membran Sonde und PCR-Produkt, das mit dem jeweiligen Nachweissystem amplifiziert wurde und vorher 10 min bei 99°C denaturiert wurde, aufgetragen. Die RNA wurde 5 min im UV-Crosslinker auf der Membran fixiert und anschließend in einem 50 mL-Röhrchen 1 h in 25 mL High SDS-Puffer prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend bis auf 3 mL verworfen. 5 µL einer spezifischen DIG-11-dUTP-markierte Gensonde (s.o.) wurde 10 min durch Hitze bei 95°C im Thermocycler denaturiert und zu den 3 mL Prähybridisierungslösung gegeben. Über Nacht (mindestens 3 h, gemäß des Protokolls des Non-Radioactive Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Membran mit der Sonde bei 51°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und es folgte ein stringentes Waschen der Membran bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen wie folgt:

→ zweimal für je 15 min mit 25 mL 2x Waschlösung

- zweimal für je 15 min mit 25 mL 0,5x Waschlösung
- 5 min in 25 mL Puffer 1
- 30 min in 25 mL Puffer 2 (Blocken der Membran)
- 30 min in 25 mL Antikörperlösung (Anti-DIG-AP Fab-Fragment 1:10.000, immunologische Hybridisierung)
- 15 min in 25 mL Waschpuffer
- zweimal 15 min in 25 mL Puffer 1
- 5 min in 25 mL Puffer 3 (äquilibrieren)

Die Membran wurde aus dem 50 mL-Röhrchen entnommen und luftblasenfrei auf eine Kunststoffolie (Prospekthülle) aufgelegt. Nach Überschichtung der Membran mit ca. 2 mL Substratlösung (CPD-Star) und 10 min Inkubation im Dunkeln entwickelte sich Chemilumineszenz durch Spaltung des Substrats Luminol. Diese konnte an der Lumi Imager Working Station via CCD-Kamera detektiert werden.

3.13 Reverse Transkription

TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems): enthält 10x TaqMan RT Puffer, 25 mM MgCl₂, desoxyNTPs Mixture, RNase Inhibitor, MultiScribe Rückwärts-Primer, 2,5 µM (jeweils spezifisch für das zu untersuchende Gen und Bakterium) Thermocycler Gene Amp[®] PCR-System 9700 (Applied Biosystems)

Die Verknüpfung von Reverser Transkriptase-Reaktion mit einer quantitativen Real Time-PCR bietet eine weitere, sensitive Möglichkeit zur Detektion und Quantifizierung der Genexpression. In einem ersten Schritt wird die einzelsträngige mRNA durch die Reverse Transkriptase und einem spezifischen Primer in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wird diese cDNA in einem Real Time-PCR Ansatz amplifiziert und quantifiziert. Da die mRNA einen komplementären Strang zum codogenen Strang der DNA darstellt und in 5'-3'-Richtung synthetisiert wird, kann die Transkription nur mit einem Primer durchgeführt werden, der in der Sequenz einem Abschnitt des codogenen Stranges entspricht. In der reversen Transkription werden somit komplementäre mRNA Kopien des Gens transkribiert. Die gebildete cDNA dient als Template für die nachfolgende Real Time-PCR. Als Polymerase zur Ausführung der reversen Transkription wurde die Multiscribe Reverse Transkriptase (Applied Biosystems) eingesetzt.

Ein 50 µL-Ansatz der Reversen Transkriptase-Reaktion enthielt:

- 5 µl 10x TaqMan RT Puffer
- 11 µl 25 mM MgCl₂
- 10 µl desoxyNTPs Mixture
- 2,5 µl Rückwärts-Primer (2,5 µM)

- 1,0 µl RNase Inhibitor
- 1,25 µl MultiScribe (Applied Biosystems)
- auf 40 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Je 50 µg Gesamt-RNA wurden in jeden Ansatz eingesetzt.

Der Temperaturverlauf der reversen Transkription im Thermocycler lautet:

30 min	48°C	reverse Transkription
5 min	95°C	Inaktivierung der Polymerase
	4°C	Herunterkühlen

Zur Quantifizierung der gebildeten cDNA wurden 10 µl Lösung aus der Reversen Transkriptase-Reaktion zur Real Time-PCR entnommen.

3.14 Real Time-PCR

Primer Express 2.0 ABI PRISM software (Applied Biosystems)

ABI Prism 7000 Sequence Detection System - TaqMan (Applied Biosystem)

Universal Master Mix (uMM): enthält dNTPs, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® UNG (Uracil-N-Glykosidase), MgCl₂ und Pufferkomponenten, fluorogener Farbstoff ROX. (Applied Biosystems)

Primer; 5 µM (Applied Biosystems)

Sonde mit Fluoreszenzfarbstoffen FAM und TAMRA („Probe“); 5 µM (Applied Biosystems)

96-Well-Platte (optical reaction plate) (Applied Biosystems)

Optische Folie (optical adhesive covers) (Applied Biosystems)

In der Real Time-PCR wird während der PCR-Zyklen die Amplifikation der Zielsequenz in „Echt-Zeit“ erfasst. Zur Durchführung solcher Assays bietet die Firma Applied Biosystems einen Thermocycler an, der mit einem Fluoreszenz-Spektrometer gekoppelt ist. Dieses Messgerät erfasst für jeden PCR-Zyklus den Konzentrationsanstieg der amplifizierten Zielsequenz. Dies wird durch eine dem PCR-Ansatz zugefügten fluorogenen Gen-Sonde („Probe“) möglich. Sie trägt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende einen Quencher (TAMRA) (Abb. 3.1 a). Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher leitet der Quencher die Energie des Reporterfarbstoffs ab. In diesem Zustand ist nur die Licht-Emission des Quenchers vom Detektor messbar. Bei einer Anlagerung der Sonde an eine spezifische Nukleotidsequenz spaltet die Taq-Polymerase durch ihre Exonuklease-Aktivität in der Extensionsphase Nucleotide vom 5'-Ende der Sonde ab und trennt dadurch Reporter und Quencher (Abb. 3.1 b). Mit jedem PCR-Zyklus steigt somit die detektierte Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs exponentiell an, während die des Quenchers sinkt. Die Gerätesoftware trägt diese Werte in einer logarithmischen Skala auf (Abb. 3.2). An Hand der Amplifikationsverläufe wird nun ein Schwellenwert (threshold)

festgelegt, bei dem die Fluoreszenzsignale des Reporterfarbstoffs deutlich über dem Hintergrundsignal liegen und die Amplifikation der Targets unter nicht limitierenden Bedingungen abläuft (linearer Bereich). Aus dem Schnittpunkt der Linie des Schwellenwertes und der Amplifikationskurve ergibt sich der Ct-Wert (threshold cycle). Er stellt ein Maß der eingesetzten Menge an Template dar. Ct-Werte von Standards mit bekannter Startkopienzahl erlauben dann eine Kalibrierung.

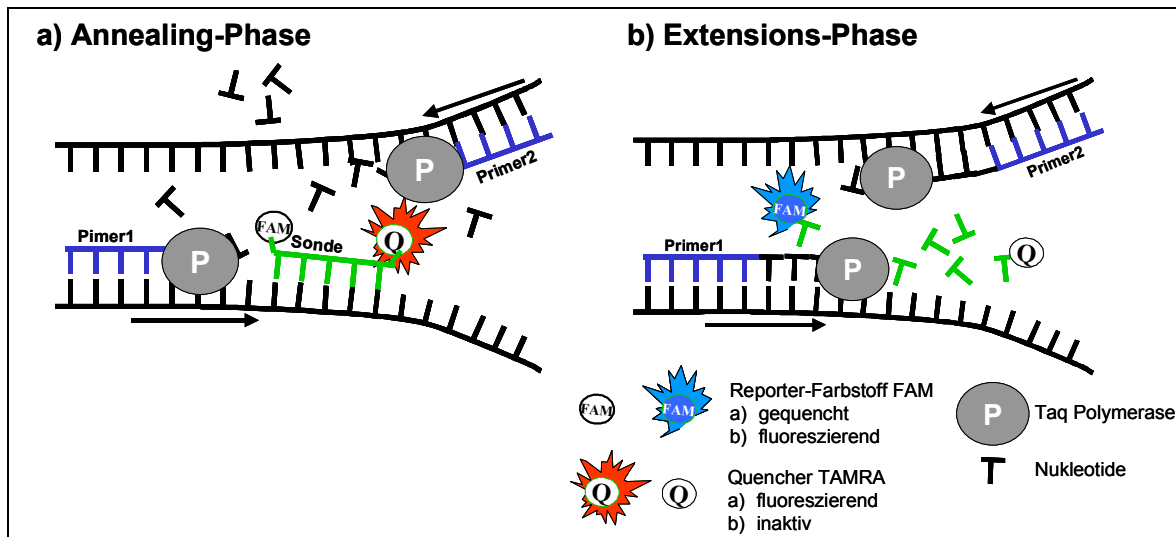


Abb. 3. 1: Prinzip des Nachweises von Zielsequenzen durch quantitative Real Time-PCR.

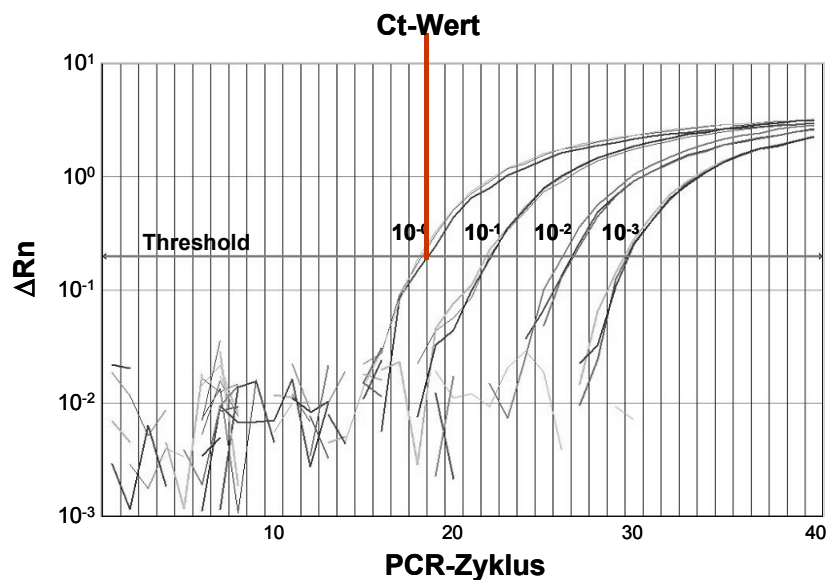


Abb. 3. 2: Amplifikationsverlauf bei der Real Time-PCR.

Je früher die Fluoreszenz-Intensität (threshold) erreicht ist, umso mehr Kopien des Ziel-Template waren in der Probe vorhanden. D.h. eine starke Expression eines Gens ergibt einen frühen Anstieg der Fluoreszenz und damit einen niedrigen Ct-Wert, während hohe Ct-Werte

eine niedrige Expression des Gens anzeigen. Durch den Vergleich verschiedener Expressions-Experimente kann ein ΔCt -Wert kalkuliert werden. Ein ΔCt -Wert von 3,3 entspricht ungefähr einer Zehnerpotenz Unterschied in der Gen-Zielsequenz. Der Gen-Induktionsfaktor wird über $2^{\Delta\text{Ct}}$ bestimmt.

Zur Auswertung der Real Time-PCR der cDNA wird eine relative Quantifizierung eingesetzt. Hier wird die Expression eines zu untersuchenden Gens in Verhältnis zu einem internen Referenzgen („housekeeping“-Gen) bestimmt.

Standardbedingungen der TaqMan-PCR:

Von der Firma Applied Biosystems wird ein für den Ansatz von quantitativen PCR-Assays optimierter Universal Master Mix (uMM) angeboten, der dNTPs, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® UNG (Uracil-N-Gykosidase), MgCl_2 und Pufferkomponenten, sowie den fluorogenen Farbstoff ROX als passive Referenz enthält.

Die quantitative PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 50 μl . Diese beinhaltet:

- 25 μl 2x uMM Buffer
- 3 μl Vorwärts-Primer (5 μM)
- 3 μl Rückwärts-Primer (5 μM)
- 2 μl Sonde (5 μM)
- 10 μl Template (cDNA aus dem RT-Ansatz)
- 7 μl Wasser.

Die Thermocyclerbedingungen während der Reaktion lauteten:

	2 min	50°C	Inkubationsschritt
	10 min	95°C	Aktivierung der Polymerase
40 Zyklen	15 sec	95°C	Denaturierung
	1 min	60°C	Annealing / Elongation
		4°C	Herunterkühlen

3.15 Proteinextraktion und –quantifizierung

Vortex Mixer Stuart (Bibby Sterlin)

PEB-Puffer: 0,788 g Tris-HCl (50 mM), 10 mL 20% SDS (2%), 20 mL 50% Glycerin (10%), pH 6.8, auf 100 mL.

Pefablock SC Plus (Roche): 0,1 M Stammlösung.

Bicinchoninsäure (BCA) – Protein Assay (Pierce)

Kupfersulfat CuSO_4 (Merck): 4% CuSO_4 -Lösung.

BSA (bovine serum albumine) (Sigma)

Multiscan MS (Labsystem)
96-Well-Mikrotiterplatten farblos (Nunc)
Research® Mehrkanalpipette 200 mL (Eppendorf)

Die Proteine wurden über SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse untersucht. Zur Herstellung eines Zellextraktes wurde das Pellet (siehe Kapitel 3.9) aus der -80°C -Truhe entnommen und nach dem Auftauen bei Raumtemperatur in 100 μL Proteinextraktionspuffer (PEB) (Booth et al, 2001) und 4 μL 0,1 M Proteasehemmer (PEFA-Block) resuspendiert, 5 sec auf dem Vortex-Gerät gemischt und 10 min im Thermomixer bei 99°C unter starkem Schütteln inkubiert. Durch die hohen Temperaturen und die mechanischen Kräfte wurden die Zellen aufgeschlossen und lagen somit als Zellextrakte vor. Das RecA-Protein ist ein cytoplasmatisches Protein und liegt frei in der Zelle vor. Das Extrakt wurde bis zur Proteinbestimmung bei 4°C bzw. über Nacht bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe von Bicinchoninsäure (BCA) und CuSO_4 . Proteine bilden mit BCA und CuSO_4 einen Komplex, der bei 562 nm photometrisch detektiert werden kann. Die Proteine wurden im Vergleich zu einem BSA (bovine serum albumine)-Standard quantifiziert.

Die BCA-Gebrauchslösung wurde unmittelbar vor dem Versuch hergestellt. Hierzu wurden 10 mL BCA-Proteinassay-Reagenz A mit 200 μL 4% Kupfersulfatlösung gemischt. In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden jeweils 10 μL des BSA-Standards (Bovine Serum Albumin) (0 – 30 μg / 10 μl) sowie 10 μL der zu messenden Proben (Doppelbestimmung) mit 200 μL Gebrauchslösung gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Extinktionsmessung am Multiskan MS340 bei 560 nm. Durch Erstellen einer Eichgerade der BSA-Standards konnte der Proteingehalt der Extrakte ermittelt werden.

3.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mini-Protean Elektrophorese-Kammer (Biorad)
Gelgießapparatur: Gelgießstand, 10er Kamm; Glasplatten mit Spacer 0,75 mm (Mini-Protean; Biorad)
Elektrophorese-Netzgerät (Biorad)

Laemmli-Probenpuffer: 50% Glycerin (Roth), 7,5% SDS, 250 mM Tris-HCl (Merck), pH 8,0, 0,5% Bromphenolblau (Sigma), 12,5% 2-Mercaptoethanol (Sigma).
1,5 M Tris pH 8,8: 181,71 g Tris-Base (Sigma) in dH_2O lösen, mit HCl 37% pH-Wert einstellen.
Mit dH_2O auf 1 L auffüllen.

1 M Tris pH 6.8: 121,14 g Tris-Base in dH_2O lösen, mit HCl 37% (Merck) pH-Wert einstellen. Mit dH_2O auf 1 L auffüllen.

12,5%-Trenngel-Gel (für 10 mL): 3,12 mL Acrylamid/Bis-Lösung. 37.5:1 (40% w/v, Serva), 3,1 mL 1,5 M Tris pH 8.8, 3,58 mL dH_2O , 62,5 μ L 20% SDS, 125 μ L 10 % APS (Amresco), 12,5 μ L TEMED (Amresco)

5%-Sammelgel (für 10 mL): 1,25 mL Acrylamid/Bis-Lösung. 37.5:1 (40%w/v), 2,5 mL 1 M Tris pH6.8, 6,2 mL dH_2O , 50 μ L 20% SDS. Für ein Gel: 2,5 mL Sammelgel-Vorrat, 25 μ L 10 % APS, 3,75 μ L TEMED.

10x Western-Puffer: 145 g Glycin (Sigma), 29 g Tris Base, auf 1 L mit dH_2O auffüllen.

10x Reservoir-Puffer: 1 L 10x Western-Puffer, 1% SDS (10 g).

PBS-Puffer (1x): 8 g NaCl (Merck), 0,2 g KCl (Merck), 0,2 g KH_2PO_4 (Merck), 1,44 g $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$, pH7.3, auf 1 L mit dH_2O auffüllen.

PBS + Tween: 1 L PBS-Puffer (1x), 3 mL Tween 20 (Sigma).

Eine definierte Menge des Gesamtproteins aus dem Zellextrakt wurde in einem 12,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt (SDS-PAGE, Abb. 3.3 a). SDS ist ein anionisches Detergenz, das sich quantitativ an Proteine bindet und diese linearisiert. SDS überdeckt die Eigenladungen von Proteinen, so dass sich Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit bilden (Abb. 3.3 b). Die SDS-Protein-Micellen tragen hohe Ladungen. Somit wird eine schnellere Trennung erreicht. Bei angelegter Spannung wandern die negativ geladenen Proteine innerhalb des Gels in Richtung Plus-Pol (Anode) und trennen sich dabei nach Größe auf.

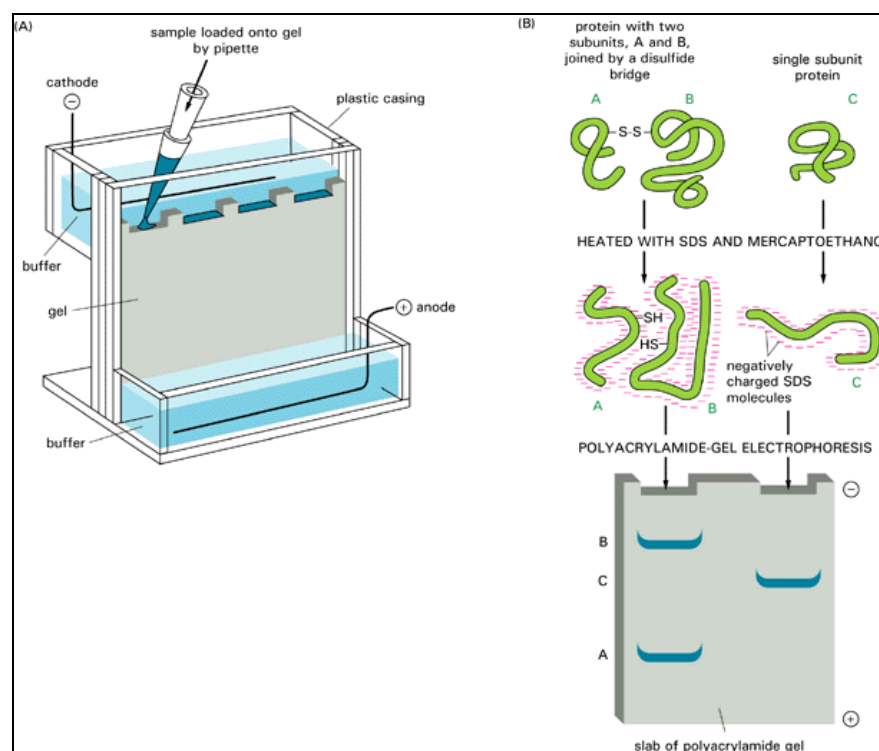


Abb. 3. 3: A: SDS-PAGE-Apparatur. B: Lauf einer SDS-PAGE Gel. (aus: Alberts et al., 1997).

SDS-Gele, bestehend aus einem Trenngel und einem Sammelgel, wurden nach Rezept (s.o.) gegossen und mindestens 30 min auspolimerisiert. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit 1x Reservoir-Puffer gefüllt wurde. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 8 µL vom Marker (Biorad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 50 min bis 1 h bei 170 V.

3.17 Western Blot-Analyse und immunologischer Nachweis

Semi-Dry-Blot-Apparatur (Biorad)

Mini-Protean Elektrophorese-Kammer (Biorad)

Schwenktisch Duomax 2030 (Heidolph)

Schweißgerät (Severin Folio)

Blotpapier, extra dick (Biorad)

PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm) (ImmobilonTM-P ; Millipore)

Erlenmeyerkolber (Schott)

PBS + Tween: 1 L PBS-Puffer, 3 mL Tween 20 (Sigma).

Methanol (Merck)

Blot Puffer: 500 mL 10x Western, 500 mL Methanol (Merck), 4 L dH₂O.

Milch-Blocker 10%: 5 g Magermilchpulver (Merck) in 500 mL PBS + Tween 20 lösen.

1. Antikörper: Mouse anti-RecA Monoclonal ab, ARM414. Stammlsg. 1 mg/mL (RDI-RECAabm-414; RDI)

2. Antikörper: ECL Anti-mouse IgG, peroxidase (HPR: horse radish peroxidase) -linked species-specific whole antibody (from Sheep) (Amersham Bioscience)

ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience)

Proteintransfer

Die SDS-Gele wurden in Blotpuffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden Blotpapiere mit Blotpuffer befeuchtet und die PVDF-Membran in Methanol äquilibriert. Die eingesetzten PVDF-Membranen sind hydrophob und besitzen daher eine stabile und hohe Bindungskapazität für die Proteine. Durch diese hydrophoben Wechselwirkungen werden die Proteine auf der Membran fixiert. Die Membran wurde vor Gebrauch in Blotpuffer und destilliertem Wasser gewaschen. Das Blotsandwich baute sich folgendermaßen auf: Blotpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Blotpapier.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte zwischen zwei horizontalen Elektrodenplatten (mit Platin beschichteter Edelstahl) von der Anode zur Kathode durch Anlegen einer Spannung. Diese Methode wird als Semi-Dry-Blotting bezeichnet. Eine Spannung von 3 mA/cm² Membran wurde für eine Stunde angelegt. Anschließend wurde die Membran 2 h mit 10% Magermilch vollständig abgesättigt (Inkubation).

Immunologischer Nachweis

Die Membran wurde dreimal je 10 min in PBS + Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem gegen das RecA-Protein gerichteten spezifischen Antikörper ARM 414 (primärer Antikörper) in 5% Magermilch über Nacht bei 4 - 8°C inkubiert (Abb. 3.4).

Die Membran wurde dreimal in PBS + Tween gewaschen. Ein zweiter Enzym-markierter Antikörper (HRP (horse radish peroxidase) -gekoppelter Antikörper), der in einer Verdünnung von 1:2.000 eingesetzt wird, bindet an den primären Antikörper (Abb. 3.4). Nach zweistündiger Inkubation bei 23°C und anschließendem dreimaligen Waschen in PBS + Tween wurde die Membran mit Substrat ECL Plus überschichtet (nach ECL Plus-Protokoll). HRP katalysiert die enzymatische Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Chemilumineszenz frei wird. Diese wurde mit Hilfe des Lumi-Imagers detektiert.

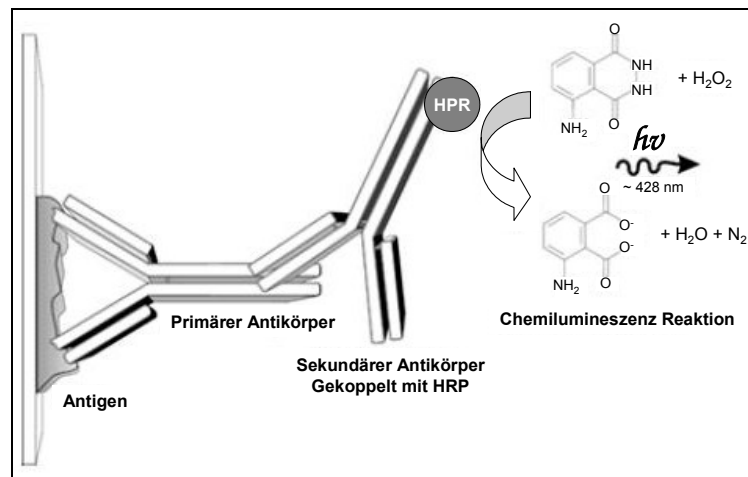


Abb. 3. 4: Immunologischer Nachweis und Chemilumineszenzreaktion mit HRP bei der Western Blot-Analyse (aus: Amersham Bioscience).

3.18 Behandlung der Bakterien mit Natriumhypochlorit als alternativer Stressfaktor

Natriumhypochlorid (NaOCl, Merck)

Zur Untersuchung der SOS-Antwort nach oxidativem Stress wurden die Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecalis* mit unterschiedlichen NaOCl-Konzentrationen versetzt. Die Konzentrationen an aktivem Chlor lagen bei 3, 0,3 und 0,03 mg/L. 0,3 mg/L entspricht dem zulässigen Konzentrationsbereich nach Abschluss der Trinkwasseraufbereitung.

5 mL einer Ausgangssuspension (Herstellung siehe Kapitel 3.8) von Bakterien mit der optischen Dichte (OD_{600}) von 0,2 wurden in einem 15-mL-Röhrchen gegeben und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumhypochlorit (NaOCl) im Dunkeln bei 37°C auf dem Schüttler

inkubiert. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 5 min und 27 h. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 2 mL Bakteriensuspension für die RNA-Extraktion und 2 mL für die Proteinextraktion in 2-mL-Reaktionsgefäße pipettiert und abzentrifugiert (10 min, 10.000 g, Biofuge Pico). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Die RNA- und Proteinuntersuchungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.19 Biofilmuntersuchungen

Herz-Hirn-Bouillon (BHI; Merck)

Petrischalen groß (9 cm Ø) und klein (5 cm Ø) (Greiner)

Zellschaber (PE Blade, PS Handle, 23 cm²; Nalgene Nunc International)

Schüttler mit Inkubationshaube

Steriles Leitungswasser

Formaldehyd (Aplichem)

Concanavalin A, FITC-markiert (FITC-ConA; Sigma)

4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI; Merck)

Mikroskop Axio Vision (Zeiss)

Biofilm-Anzucht:

Sterile Herz-Hirn-Bouillon (BHI) wurde mit *Pseudomonas aeruginosa* #154 angeimpft und bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. 500 µL dieser Vorkultur wurden mit 15 mL 1:4-verdünnter BHI vermischt und in eine große Petrischale (9 cm Ø) gegeben. Zur Biofilmanzucht wurde auf diesen Ansatz der untere Teil einer kleinen Petrischale (5 cm Ø, Aufwuchsträger) platziert (siehe Abbildung 3.5). Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer auf dem Schüttler bei 37°C und 40 U/min für 7 Tage. Am 3. und 6. Tag wurde der Aufwuchsträger jeweils in eine neue große Petrischale mit frischem Medium (15 mL 1:4 BHI) überführt.

Nach 7 Tagen wurde der Aufwuchsträger entnommen und dreimal mit sterilem Leitungswasser vorsichtig abgespült. Ein Teil der Biofilme wurde für UV-Bestrahlungsversuche verwendet, der andere Teil wurde mit DAPI und FITC-markiertem Concanavalin A gefärbt. DAPI färbt lebende Zellen, indem es in die doppelsträngige DNA interkaliert, während FITC-markiertes Concanavalin A die extrazelluläre polymere Substanz anfärbt.

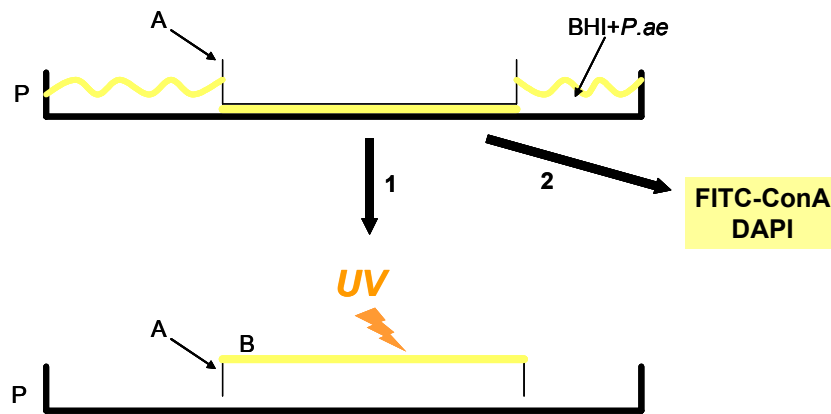


Abb. 3. 5: Schema zur Anzucht von Biofilmen auf Petrischalen-Aufwuchsträgern. A= Aufwuchsträger. B= Biofilm. P= Petrischale (9 cm Ø). BHI+P.ae.= Herz-Hirn-Bouillon mit *Pseudomonas aeruginosa*.

UV-Bestrahlungsversuche (in Abbildung 3.5., Schritt 1)

Die Aufwuchsträger wurden mit der Biofilmseite nach oben im UV-Crosslinker mit unterschiedlichen Intensitäten (200, 400 und 600 J/m²) behandelt. Zusätzlich wurden unbehandelte Biofilme untersucht. Die Aufwuchsträger wurden mit 1 mL sterilem Leitungswasser überschichtet und bei 37°C für 2 h bzw. 6 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Biofilme mit sterilen Zellschabern abgeschabt, mit 1 mL sterilem Leitungswasser nachgespült und in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (10.000 g, 10 min) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung (RNA- und Protein-Isolierung, s. 3.11 bzw. 3.15) eingefroren.

Färbung mit FITC-ConA und DAPI (in Abbildung 3.5., Schritt 2) zur mikroskopischen Untersuchung

Die Biofilme wurden mit 3% Formaldehyd für 30 min fixiert. Anschließend wurden sie zweimal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Die EPS-Färbung mit FITC-ConA [10 µg/mL] erfolgte für 30 min im Dunkeln. Die Biofilme wurden wieder zweimal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Als nächstes erfolgte die Zell-Färbung mit DAPI [4 ng/mL] für 3 min im Dunkeln. Nach dem Waschen der Biofilme (zweimal mit sterilem Leitungswasser) wurden diese mit dem Mikroskop Axio Vision ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Grundlagen zum Nachweis von Dunkelreparaturmechanismen

4.1.1 Gensondenberechnung für *recA*-Nachweissysteme in verschiedenen Bakterien

Grundlegende Arbeit für die Untersuchung der Expression des *recA*-Gens, das Schlüsselgen des Dunkelreparaturmechanismus, war die *in silico* Auswahl von *recA*-spezifischen Primern zur molekularbiologischen Detektion. Das Primer-Design resultierte aus einem Sequenzdatenvergleich (Alignment). Die meisten Datenbankeinträge stammen aus Untersuchungen von Bakterien zur Festlegung taxonomischer Zuordnung der jeweiligen Mikroorganismen auf Basis des *recA*-Gens.

Von der Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die *recA*-Nukleotidsequenzen verschiedener Proteobakterien (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -) und hygienisch relevanter Bakterien zusammengestellt und untereinander verglichen. Ziel war es, eine universelle Primerkombination für Proteobakterien inklusive hygienisch relevanter Bakterien zu finden. Im Anhang (Teil A) sind Sequenz-Alignments verschiedener *recA*-Sequenzen dargestellt. Die hohe Homologie von RecA auf Proteinebene spiegelte sich nur teilweise auf DNA-Ebene wieder. Es war jedoch nicht möglich, universelle Primersequenzen festzulegen, mit denen das *recA*-Gen eines breiten Spektrums von Bakterien erfasst werden kann. Der Einsatz von degenerierten Primern hätte eine unerwünschte Unspezifität im Genexpressionsnachweis zur Folge gehabt.

Aus diesem Grund wurden Primer für das *recA*-Gen ausgewählter Bakterienspezies und Bakteriengruppen entwickelt bzw. bereits bekannte Primersysteme genutzt. Speziell wurden Nachweissysteme für die beiden Trinkwasserbakterien *Caulobacter crescentus* und *Aquabacterium commune* und die hygienisch relevanten Bakteriengruppen *Pseudomonas* und *Enterococcus* entwickelt und für Expressionsanalysen optimiert.

Im PCR-Verfahren wurden alle ausgewählten Primersysteme auf Spezifität getestet. Die PCR-Amplifikate wurden zur Kontrolle der Fragmentgröße in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt.

Die hohe Spezifität der verschiedenen PCR-Ansätze mit der jeweiligen Primerkombination war Voraussetzung für die Nutzung der markierten PCR-Amplicons als Gensonde in nachfolgenden Expressionsstudien von *recA* nach UV-Bestrahlung.

Im Anhang (Teil A) sind die gesamten Alignments der *recA*-Gene

- verschiedener Bakterien (α -, β -, γ -, δ -Proteobakterien, Enterokokken) (A1)
- von *Caulobacter crescentus* (Anhang A2)
- von *Aquabacterium commune* (Anhang A3)
- unterschiedlicher Enterokokken (Anhang A4)

- unterschiedlicher Pseudomonaden (Anhang A5) angegeben. Die jeweiligen Primer wurden über die Sequenzen gelegt und die übereinstimmenden Sequenzen (Consensus-Sequenzen) farblich markiert.

Im Folgenden wird die Spezifität der jeweiligen Primer zu den *recA*-Sequenzen der untersuchten Bakterien im Einzelnen beschrieben.

Caulobacter crescentus

Die Primer rA2F (5'-CGGAATTCTCGGGCAAGACCACC-3', 23mer) und rA2R (5'-TAGCAAGCTTGTCTTGACCACCTT-3', 25mer) nach Yang und Yang, 2000, wurden in der PCR mit verschiedenen Trinkwasserbakterien auf *recA*-Spezifität getestet. Dazu wurden Bakterien aus Trinkwasser auf R2A-Agar isoliert und mit den Primern auf positive *recA*-Produkte überprüft. Das PCR-Produkt eines Isolats wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit den Primern rA2F und rA2R sequenziert. Die Vergleiche der Sequenzierungen mit der NCBI-Datenbank ergaben größte Homologie zu *Caulobacter crescentus* CB15, mit dem Vorwärtsprimer rA2F 94% und mit dem Rückwärtsprimer rA2R 93%. Die nächst häufigsten Homologien zu anderen Bakterien wie *Brevundimonas* lagen deutlich unter 90%.

Zur Absicherung der Identität des Isolats wurde eine PCR mit den 16S-spezifischen ribosomalen Primern 27F und 517R (Tab. 3.1) durchgeführt. Die Sequenzierung und anschließenden Datenbankvergleiche der Sequenz dieses PCR-Produkts ergaben zu 99 bzw. 98% Homologien zu dem Trinkwasserbakterium *Caulobacter sp.*, und 98% Homologie zu *Caulobacter crescentus*. Vergleichbare Homologien bestanden auch zu einem unkultivierbaren Eubacterium und zu *Brevundimonas diminuta*. Die Anzahl der verglichenen Sequenzen aus der Datenbank war jedoch für *Caulobacter sp.* und *Caulobacter crescentus* deutlich höher.

Das Trinkwasser-Isolat konnte so auf der *recA*-Ebene und auf der 16S-rDNA-Ebene, als *Caulobacter crescentus* identifiziert werden. *Caulobacter crescentus* ist den α -Proteobakterien zugeordnet.

Die Primerkombination rA2F und rA2R wurde mit verschiedenen Referenzbakterien in der PCR getestet. Das Ergebnis dieser PCR ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die PCR-Produkte sind auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mit *Caulobacter crescentus* als Referenzbakterium (Template) konnte ein deutliches, *recA*-spezifisches PCR-Produkt mit einer erwarteten Länge von 560 Basenpaaren amplifiziert werden (Spur 5). Andere Bakterienspezies aus der Enterokokkengruppe, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* und *Aquabacterium commune* zeigten kein bzw. ein nur sehr schwach erkennbares PCR-Amplicon

(Spur 6, 7 und 8). Im Hinblick auf das Alignment der rA2-Primer mit *recA*-Sequenzen verschiedener Bakterien (Abb. 4.2) besteht weder für den Vorwärtsprimer noch für den Rückwärtsprimer bei keiner *recA*-Sequenz eine 100%ige Homologie. Im Falle von *Caulobacter crescentus* (gelb unterlegt) sind ebenfalls einige Fehlpaarungen der Primer mit der veröffentlichten Sequenz zu erkennen. Beim Vorwärtsprimer rA2F sind diese Fehlpaarungen an den Positionen 6 und 7 gelegen, beim Rückwärtsprimer rA2R zeigt die Abbildung diese an den Positionen 19, 21, 24 und 25. Sie waren jedoch für die Spezifität und Effizienz der PCR-Reaktion nicht limitierend.



Abb. 4. 1: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rA2F und rA2R und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. 1: *Pseudomonas aeruginosa*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: *Escherichia coli*, 4: *Aquabacterium commune*, 5: *Caulobacter crescentus*, 6: *Enterococcus faecium* (B), 7: *E. faecium* (DSM), 8: *E. faecalis*, 9: *E. casseliflavus*, 10: Negativ-Kontrolle. M: 100 bp-Marker.

A) Vorwärtsprimer rA2F (Position 197-219)

rA2F	----- CGGAATTCTCGGGCAAGACCACC -----	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCGTCGAGATCTACGGTCCGGAATCCTCGGGCAAGACCACCCTGACCCT	227
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCGTCGAGATCTACGGCCCGGAATCGTCCGGTAAAACCACGCTGACCCT	227
<i>Burkholderia cepacia</i>	GTGGTCGAGATCTACGGGCCCGGAATCGTCCGGCAAGACCACGCTCAGCCT	450
<i>Caulobacter crescentus</i>	ATCGTCGAGGTCTATGGTCC GGAAAGCTCGGGCAAGACCACC CTGGCCCT	263
<i>Escherichia coli</i>	ATCGTCGAAATCTACGGACCGGAATCTTCCGGTAAAACCACGCTGACGCT	233
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCATCGAAGTATATGGACCTGAAAGTTCAGGTAAAAACAACAGTTGCACT	227
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATTATTGAAGTATATGGTCTGAGAGTTCAGGTAAAAACAACAGTTTCTTT	227
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATTATAGAAATTTATGGACCTGAAAGTTCAGGTAAAACCACTCTAACTTT	227
<i>Legionella pneumophila</i>	ATTGTTGAAATTTATGGCCCTGAGTCTTCTGGTAAAACCACGCTCACTCT	388
	* *	

B) Rückwärtsprimer rA2R (Position 790 bzw. 788-766)

rA2R	---- AAGGTGGTCAAGAACAAGCTTGCTA -----	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GCGTCAAGGTGGTGAAGAACAAGGTTTCCCGCCGTTCCGCCAGGCCGAG	774
<i>Pseudomonas putida</i>	GCGTCAAGATCGTCAAGAACAAGGTTTCCGCCACCGTTCCGTCAGGCCGAG	774
<i>Burkholderia cepacia</i>	GCGTGAAGGTCTGCAAGAACAAGGTGTCCGCCCGGTTCCGCGAAGCGATC	997
<i>Caulobacter crescentus</i>	GCGTGAAGGTGGTCAAGAACAAGT GGC CCCGCCGTTCCGCGAGGTCGAG	810
<i>Escherichia coli</i>	GCGTGAAGGTGGTGAAGAACAACAATCGCTGCCCGGTTTAAACAGGCTGAA	780
<i>Enterococcus faecium</i>	AGATCAAAGTCTGTAATAAACAAGTAGCACCTCCTTTCAAATCGCTGAA	774
<i>Enterococcus faecalis</i>	AAATTAAGTCTGTTAAATAAACAAGTGGCGCCACCATTAAAGTGGCAGAA	774
<i>Campylobacter jejuni</i>	AAGTAAAGTAGTTAAATAAACAAGTTGCTCCTCCATTAGACAAGCTGAA	777
<i>Legionella pneumophila</i>	GAGTTAAAGTAGTTAAATAAACAAGTAGCGCCACCGTTTAAATGACTGAG	935
	* *	

Abb. 4. 2: Alignment der Primer rA2F und rA2R mit Ausschnitten aus *recA*-Sequenzen unterschiedlicher Bakterien. Die Primer sind fett gedruckt und gelb unterlegt. Die Consensus-Sequenzen der verschiedenen Bakterien zu den Primern sind grau bzw. bei *Caulobacter crescentus* gelb unterlegt. (*) markiert bei allen Sequenzen die übereinstimmenden Nukleotide (Consensus).

Um die Präsenz des *recA*-Gens in der Umwelt nachzuweisen, wurden die Primer rA2F und rA2R an verschiedenen Umweltproben und Trinkwasserbiofilmen aus Wasserwerken getestet. Abbildung 4.3 zeigt bei allen Proben ein distinktes PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 560 bp. Die deutlichste Bande zeigte eine Mischkultur, bei der Bakterien aus einem Liter Leitungswasser über einen 0,2 µm-Polycarbonatfilter aufkonzentriert wurden (Spuren: Mi). Auch bei den unterschiedlichen Biofilmproben sind deutliche PCR-Produkte zu sehen (Spuren: GAC, Des, B, P). Dieser Versuchsansatz unterstreicht die Präsenz der *recA*-Gene in Umwelt- und Trinkwasserproben, ohne dass die Spezifität des PCR-Ansatzes darunter leidet.

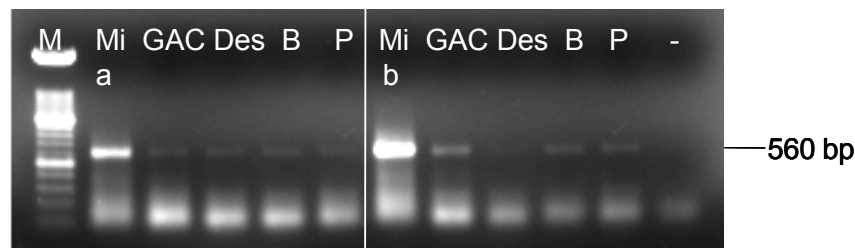


Abb. 4. 3: PCR-Produkte mit den Primern rA2F und rA2R von verschiedenen Umweltproben und Proben aus einem Wasserwerk, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Mi: Mischkultur, GAC: Biofilm nach Aktivkohlefilter, vor der UV-Desinfektion, Des: Biofilm nach der UV-Desinfektion, B: DNA des Biofilms aus der Labor-Modellanlage (Leitungswasser-Biofilm), P: Biofilm aus der Labor-Modellanlage, (-): Negativkontrolle. M: 100 bp-Marker. a: 10 µL und b: 15 µL Template wurden in die PCR eingesetzt.

Aquabacterium commune

Die beiden degenerierten Primer rAbF (5'-GACACCGGCGARCAGGC-3', R= A oder G; 17mer) und rAbR (5'-TCYTTGCCCTGGCCGAT-3', Y= C oder T; 17mer) wurden für β -Proteobakterien anhand verschiedener *recA*-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank errechnet. Die meisten *recA*-Sequenzen von β -Proteobakterien in den Datenbanken stammen nicht von typischen Trinkwasserbakterien, sondern von pathogenen Bakterien. Ziel war es jedoch, eine spezifische Primerkombination generell für Vertreter der β -Proteobakterien zu finden. Weiterhin sollten mit einer solchen Primerkombination unbekannte *recA*-Sequenzen von Trinkwasserbakterien gefunden werden.

Jeder der erstellten Primer besitzt einen Nukleotidaustausch (Wobble), der Primer rAbF an Position 12 in 5'→3'-Richtung und Primer rAbR an Position 3 in 5'→3'-Richtung.

Diese Primer wurden in der PCR mit dem Referenzbakterium *Aquabacterium commune*, aber auch mit anderen Referenzbakterien, mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (50 und 55°C) getestet.

Die PCR-Produkte mit den Primern rAbF und rAbR und drei verschiedenen Bakterienspezies als Templates sind in Abbildung 4.4 gezeigt. Es sind jeweils mehrere Banden pro PCR-Produkt zu erkennen, d.h. die Primer binden nicht spezifisch an nur eine Stelle im Genom, sondern haben mehrere Möglichkeiten. Die Banden bei ca. 565 bp stellen die Größe dar, die man mit dieser Primerkombination für das *recA*-Amplifikat erwartet. Diese Bande wurde bei *Aquabacterium commune* ausgeschnitten und das doppelsträngige DNA-Fragment von beiden Seiten sequenziert. Die daraus erhaltenen Sequenzen, die jeweils in einer Länge von etwa 300 Nukleotiden gelesen werden konnten, wurden mit Hilfe der BLAST-Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mit Gen-Datenbanken verglichen. Die *recA*-Sequenz von *Aquabacterium commune* liegt in den Datenbanken jedoch noch nicht vor. Anhand der Homologien zu unterschiedlichen *recA*-Sequenzen anderer Bakterien der Datenbanken, hauptsächlich *recA*-Sequenzen von β -Proteobakterien, aber auch von α - und γ -Proteobakterien, lässt sich folgern, dass die erhaltene Nukleotidsequenz einen Teil des *recA*-Gens von *Aquabacterium commune* darstellt. Die Sequenz hat 94% Homologie zu *recA* von *Caulobacter crescentus* und bis zu 87% zu *recA*-Genen von anderer α - und β -Proteobakterien. Die vollständige Nukleotidabfolge ist in Abb. 4.5 dargestellt.

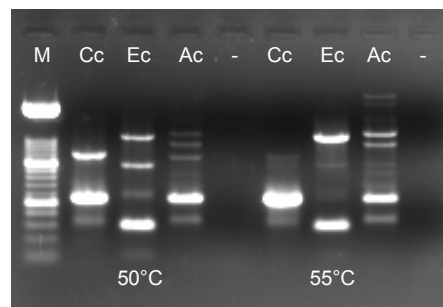


Abb. 4. 4: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAbF und rAbR, Annealing-Temperaturen von 50 und 55°C und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. M: 100 bp-Marker. Cc: *Caulobacter crescentus*; Ec: *Escherichia coli*; Ac: *Aquabacterium commune*; (-) : Negativkontrolle.

Sequenzausschnitt des *recA*-Gens von *Aquabacterium commune*:

```

ACGCCCAAGGCCGAACTCGAAGGTGAAATGGGCGACGCGCTGCCCGGCTGCAGGCCCGC 60
CTGATGAGCCAGGCCTTGCGCAAGCTGACGGCCAACATCAAGAAGACGAACTGCACCGTC 120
ATCTTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCGTGATGTTCCGGCAGCCCCGAAACCACC 180
ACCGGTGGCAACGCGCTGAAGTTCTACGCGTCTGTGCGCCTGGACATCCGCCGCACCGGT 240
TCCATCAAGCGCGGCGAAGAGATCGTGGCAACGAAACCAAGGTCAAGGTCGTCAAGAAC 300
AAGGTGGCGCCCCCTCAAGACCGCTGAATTCGACATCCTGTACGGCGAGGGCATCAGC 360
CGCGAAGGCGAGGTCATCGACCTGGGTGTACCGCCAAA 399

```

Abb. 4. 5: Sequenzausschnitt des *recA*-Gens von *Aquabacterium commune* aus der Sequenzierung mit der Primern rAbF und rAbR. Die neu erstellten Primer, rAcomF (Position 8-29, 22mer) und rAcomR (Position 338-316, 23mer), spezifisch für das *recA*-Gen von *Aquabacterium commune*, sind gelb unterlegt.

Basierend auf diesen Sequenz-Daten wurde eine spezifische Primer-Kombination für das *recA*-Gen von *Aquabacterium commune* entwickelt, der Vorwärts-Primer rAcomF (5'-AGGCCGAACTCGAAGGTGAAAT-3', 22mer) und der Rückwärtsprimer rAcomR (5'-ATGTCTGAATTCAGCGGTCTTGAA-3', 23mer). In Abbildung 4.5 sind die Positionen dieser Primer gelb unterlegt. Die Primerkombination ist sehr spezifisch für das *recA*-Gen von *Aquabacterium commune*. Das wird in Abbildung 4.6 deutlich, in der die PCR mit unterschiedlichen Bakterienspezies und rAcomF/R getestet wurden. Ausschließlich *Aquabacterium commune* zeigt ein spezifisches PCR-Produkt.



Abb. 4. 6: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAcomF und rAcomR und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. 1: *Pseudomonas aeruginosa*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: *Escherichia coli*, 4: *Aquabacterium commune*, 5: *Caulobacter crescentus*, 6: *Enterococcus faecium* (B), 7: *E. faecium* (DSM), 8: *E. faecalis*, 9: *E. casseliflavus*. M: 100 bp-Marker.

***Enterococcus* spp.**

Das Primerpaar rAEntF (5'-TACACGCTATTGCAGAAGTACAA-3', 23mer) und rAEntR (5'-TTTACGCAATGCTTGAGACAT-3', 21mer) wurde erstellt, um einen Abschnitt des *recA*-Gens von Enterokokken zu amplifizieren. Dazu wurden 18 *recA*-Sequenzen unterschiedlicher Enterokokken-Spezies aus der NCBI-Datenbank miteinander verglichen. Bei der Auswahl der Primersequenzen wurde gezielt auf Homologie mit *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* geachtet. Abbildung 4.7 zeigt Ausschnitte aus diesen Alignments. Die Primer rAEntF und rAEntR sind gelb unterlegt. Homologien zu diesen Primern sind mit grau bzw. bei *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* mit pink markiert. Der Vorwärtsprimer rAEntF (Position 227-249, *Enterococcus faecium*) und der Rückwärtsprimer rAEntR (Position 528-508, *Enterococcus faecium*) umfassen ein Fragment von 301 bp.

A) Vorwärtsprimer rAEntF (Position 227-249)		
rAEntF	----- TACACGCTATTGCAGAAGTACAA -----	23
faecalis	GAGTTCAGGTA AAAACA AACTGTTTCTTTACACGCAATTGCAGAAGTGC AAC	250
faecium	AAGTTCAGGTA AAAACA AACTGTTTCTTTACACGCTATTGCAGAAGTACAAA	250
malodoratus	AAGTTCTGGTAAAAACGACGGTGGCATTGCATGCAATCGCAGAAGTGCAAA	250
raffinosis	AAGTTCTGGTAAAAACAACGGTGGCATTACATGCCATCGCGAAGTCCAAA	250
avium	AAGTTCTGGTAAAAACAACGGTGGCATTGCATGCGATTGCAGAAGTTCAAA	250
pseudoavium	AAGTTCAGGTA AAAACA AACCCTTGCCTTGCACGCAATCGCAGAAGTTCAAA	250
pallens	AAGCTCTGGTAAGACA AACTGTAGCGTTACATGCGATTGCTGAAGTGCAAA	250
mundtii	AAGTTCAGGTA AAAACA AACCCTTGCCTTGCATGCAATCGCAGAAGTTCAAA	250
durans	AAGTTCAGGTA AAAACA AACCCTTGCCTTGCATGCAATCGCAGAAGTTCAAA	250
hirae	AAGTTCAGGTA AAAACA AACCCTTGCCTTGCATGCAATCGCAGAAGTTCAAA	250
villorum	AAGTTCAGGTA AAAACA AACCCTTGCCTTGCATGCAATCGCAGAAGTTCAAA	250
ratti	AAGTTCCGGGAAAAACTACCGTTGCTTTACATGCAATGCTGAAGTACAAA	250
gallinarum	AAGTTCTGGTAAAAACGACAGTTGCTTTACACGCAATCGCTGAAGTTCAAA	250
saccharolyticus	AAGTTCTGGTAAAAACAACGGTGGCATTGCATGCTGTTGCAGAAGTTCAAA	250
solitarius	AAGTTCCGGGAAAAACTACCGTTGCTTTACATGCAATGCTGAAGTACAAA	250
columbae	AAGCTCTGGTAAAAACGACAGTTGCTTTACACGCAATCGCTGAAGTTCAAA	250
sulfureus	AAGTTCTGGTAAAAACAACAGTTGCATTACATGCTATAGCTGAAGTTCAAA	250
cecorum	AAGTTCTGGTAAAAACGACGGTTGCTTTACATGCGATTGCCGAAGTTCAAA	250
	* * * * *	
B) Rückwärtsprimer rAEntR (Position 528-508)		
rAEntR	----- ATGTCTCAAGCATTGCGTAAA -----	21
faecalis	TCGACTAATGTCTCAAGCATTACGTA AATTATCAGGCTCAATTAATAAGA	550
faecium	ACGTTTGATGTCTCAAGCATTGCGTAAA AACTCTCTGGTTCGATCAACA AAAA	550
malodoratus	TCGTTTGATGTCTCAAGCGTTGCGTAAATTATCTGGTTCGATCAATAAAA	550
raffinosis	ACGTTTGATGTCTCAAGCGTTACGTAAGTTGTCTGGTTCGATTAACA AAAA	550
avium	TCGTTTGATGTCAACAAGCATTGCGCAAGCTGTCAGGCTCTATCAACA AAAA	550
pseudoavium	CCGTTTAATGTCAACAAGCTTTGCGTAAAGTTATCTGGTTCATCAATAAAA	550
pallens	GCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAATTATCTGGTTCGATTAATAAGA	550
mundtii	TCGTTTGATGTCTCAAGCCTTACGTA AACTCTCAGGATCGATCAACA AAAA	550
durans	TCGTCTAATGTCTCAAGCATTACGTA AATTGTCAGGATCGATCAATAAAA	550
hirae	TCGATTAATGTCAACAAGCATTGCGTAAACTATCTGGTTCGATCAATAAAA	550
villorum	TCGACTAATGTCAACAGCATTGCGTAAATTATCTGGCTCAATCAACA AAAA	550
ratti	ACGTTTGATGTCAACAAGCGTTGCGTAAATTATCTGGTTCGATTAATAAAA	550
gallinarum	CCGTTTGATGTCTCAAGCATTGCGTAAATTATCTGGATCAATCAACAAGA	550
saccharolyticus	ACGTTTGATGTCTCAAGCATTACGTA AACTTTCAGGAACAATCAACA AAAA	550
solitarius	GCGTTTGATGTCAACAAGCGTTACGTA AATTATCTGGTTCGATTAATAAAA	550
columbae	ACGTTTGATGTGCAAGCTTTGCGTAAAGTTATCTGGTTCATTAATAAGA	550
sulfureus	ACGTTTGATGTCTCAAGCTTACGTA AACTTTCAGGATCAATCAATAAAA	550
cecorum	CCGTTTAATGTCTCAAGCCTTACGTA AATTATCTGGTACGATTAATAAGA	550
	* * * * *	

Abb. 4. 7: Alignment der Primer rAEntF und rAEntR mit Ausschnitten aus *recA*-Sequenzen verschiedener Enterokokken. Die Primer sind fett gedruckt und gelb unterlegt. Die Consensus-Sequenzen der Enterokokken sind grau bzw. von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* pink unterlegt. (*) markiert bei allen Sequenzen die übereinstimmende Nukleotide (Consensus).

In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse der PCR mit den Primern rAEntF und rAEntR und verschiedenen Bakterien als Referenzen dargestellt. Nur mit *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* als Template konnten bei einer Annealing-Temperatur von 60°C Amplifikate von ca. 300 bp Länge erzielt werden. Mit den anderen getesteten Bakterien wurde kein Amplifikat erzielt, d.h. die Primer sind sehr spezifisch für *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*. Diese Spezifität wird auch aus den Alignments der Primer mit *recA*-Sequenzen von Bakterien außerhalb der Enterokokkengruppe deutlich (Abb. 4.9). Die distinkten Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und sequenziert. Vergleiche mit den Datenbanken ergaben 99 und 100% Ähnlichkeit zum *recA*-Gen von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die neu dargestellten Primer spezifisch für das *recA*-Gen dieser Bakterien sind.

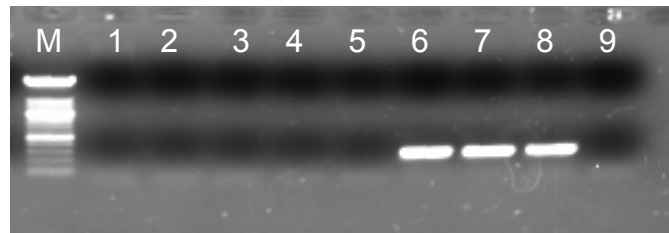


Abb. 4. 8: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAEntF und rAEntR und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. 1: *Pseudomonas aeruginosa*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: *Escherichia coli*, 4: *Aquabacterium commune*, 5: *Caulobacter crescentus*, 6: *Enterococcus faecium* (B), 7: *E. faecium* (DSM), 8: *E. faecalis*, 9: *E. casseliflavus*. M: 100 bp-Marker.

RAentF	TACACGCTATTGCAGAAGTACAA -----	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TCTCGGTGATCGCCGAGGCCAGAAAAACGGCGCCACCTGTGCCTTCGTCG	277
<i>Pseudomonas putida</i>	TGTCGGTCATCGCCGAAGCCAGAAAAACGGCGCCACCTGCGCCTTCGTCG	277
<i>Burkholderia cepacia</i>	TGCAGGTCATTGCCGAGCTGCAGAAGCTGGCGGGCACCCGGCGCTTCATCG	500
<i>Caulobacter crescentus</i>	TGCACGTCGTGGCCGAGGTCAGAAAGCCGGCGGCACCCGCCCTTCGTCG	313
<i>Escherichia coli</i>	TGCAGGTGATCGCCGACGCGCAGCGTGAAGGTAAAAACCTGTGCGTTTATCG	283
<i>Enterococcus faecium</i>	TACACGCTATTGCAGAAGTACAAAAAATGGCGGAACGGCCGCTTTCATTG	277
<i>Enterococcus faecalis</i>	TACACGCAATTGCAGAAGTGCAA CGAAATGGTGGAACAGCCGCTTTATCG	277
<i>Campylobacter jejuni</i>	TACATATTATCGCAGAATGCCAAAAAGCAGGTGGAGTTTGTGCTTTTATCG	277
<i>Legionella pneumophila</i>	TTCAAGTGATCGCTGAATGTCAAAAAATGGGTGGTACACGACGATTTATCG	438
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
rAentR	----- ATGTCTCAAGCATTGCGTAA	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GACGCCACGTCGGCCTGCAGGCACGCCTGATGTCCAGGGCGTGCGCAAG	528
<i>Pseudomonas putida</i>	GACATGCACGTGGGCTGCAGGCTCGCCTGATGTCCAGGGCGTGCGCAAA	528
<i>Burkholderia cepacia</i>	GATTCGCTGCCGGGCTGCAGGCGCGCTGATGTGCGAGGCGCTGCGCAAG	751
<i>Caulobacter crescentus</i>	GACAGCCTGCCGGTCTTCAGGCCGCTGATGAGCCAGGCGTGCGCAAG	564
<i>Escherichia coli</i>	GACTCTCACATGGGCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCGATGCGTAA	534
<i>Enterococcus faecium</i>	GACTCACATGTCGGTTACAAGCACGTTT GATGTCTCAAGCATTGCGTAA	528
<i>Enterococcus faecalis</i>	GCGAGCCATGTCGGCTTACAAGCTCGACTA ATGTCTCAAGCACTACGTAA	528
<i>Campylobacter jejuni</i>	GATCAACATGTAGGACTTCAAGCAAGACTTATGTCTCAAGCTCTAAGAAAA	528
<i>Legionella pneumophila</i>	GATTCATGTTGGTTTACAGGCAAGATTGATGTGCAAGCCCTGCGTAA	689
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Abb. 4. 9: Alignment der Primer rAEntF und rAEntR mit Ausschnitten aus *recA*-Sequenzen verschiedener Bakterien. Die Primer sind fett gedruckt und gelb unterlegt. Die Consensus-Sequenzen der Bakteriensequenzen zu den Primern sind grau bzw. bei *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* pink unterlegt. (*) markiert bei allen Sequenzen die übereinstimmenden Nukleotide (Consensus).

Pseudomonas spp.

Für die Suche geeigneter Primer für das *recA*-Gen von Pseudomonaden wurden 13 *recA*-Sequenzen unterschiedlicher Pseudomonaden aus der NCBI-Datenbank übereinander gelegt und geeignete Positionen auf der Nukleotidsequenz ausgewählt (Abb. 4.10). Die Primerkombination rAPsF (5'-CTGGAAATCACCGACATG-3'; 18mer) und rAPsR (5'-CRCCGGTGGTGGTTTC-3'; 16mer) befinden sich an den Positionen 143-160 und 401-386. Der Rückwärtsprimer rAPsR besitzt einen Nucleotidaustausch (wobble) an der Position 2 in 5'→3'-Richtung bzw. an Position 15 in Abbildung 4.10. Mit diesen Primern konnte das *recA*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescence*, *P. syringae*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri* und *P. alcaligenes* mit einer Länge von ca. 260 bp amplifiziert werden (Abb. 4.11).

A) Vorwärtsprimer rAPsF (Position 143-160)		
rAPsF	-----CTGGAAATCACCGACATG-----	18
PST	TACCGGTGAGCAGGCGCTGGAAATCACCGATATGCTGGTGCCTCCAATG	176
PFL	TACTGGCGAACAGGCACTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAATG	176
PTO	CACCGGTGAGCAAGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
PMA	CACCGGTGAGCAAGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
PCH	CACCGGTGAGCAGGCACTGGAAATCACCGACATGTTGGTGCCTCCAATG	176
PAU	CACCGCGAACAGGCGCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAATG	176
PSY	CACCGGTGAGCAGGCGCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAATG	176
PCI	CACCGGTGAGCAGGCGCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAATG	176
PAG	CACCGCGAGCAGGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
PPU	CACCGCGAACAGGCGCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
PME	CACCGGTGAGCAGGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
PAE	CACCGCGAGCAGGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
PRE	TACCGCGAACAGGCGCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACG	176
	* *	
B) Rückwärtsprimer rAPsR (Position 401-386)		
rAPsR	-----GAAACCACCACCGGC----- ^T	16
PST	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGGCGTAATGCGCTGAAGTTCTACGCATC	426
PFL	GGTAGCCCGGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCTTC	426
PTO	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCTTC	426
PMA	GGTAGCCCGGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCTTC	426
PCH	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCTTC	426
PAU	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGCGTAACGCCCTGAAATTCTACGCCTC	426
PSY	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCTTC	426
PCI	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCCTC	426
PAG	GGCAGCCCGGAAACCACCTACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCTTC	426
PPU	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTGTAACGCCCTGAAATTCTACGCCTC	426
PME	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGGCGTAACGCACTGAAATTCTACTCCTC	426
PAE	GGCAACCCGAAACCACCACCGGCGTAACGCACTGAAATTCTACGCCTC	426
PRE	GGCAACCCCGGAAACCACCACCGGCGTAATGCCCTGAAATTCTACGCCTC	426
	* *	

Abb. 4. 10: Alignment der Primer rAPsF und rAPsR mit Ausschnitten aus *recA*-Sequenzen verschiedener Pseudomonaden. Die Primer sind fett gedruckt und gelb unterlegt. Die Consensus-Sequenzen der Pseudomonaden sind grau bzw. von *Pseudomonas aeruginosa* grün unterlegt. (*) markiert die bei allen Sequenzen übereinstimmenden Nukleotide.

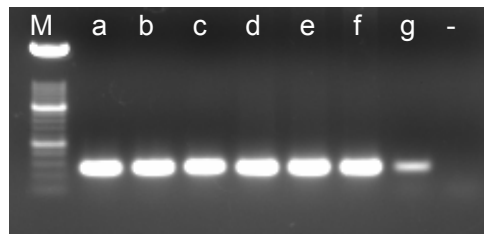


Abb. 4. 11: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAPsF und rAPsR und verschiedenen Pseudomonaden als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. a: *Pseudomonas putida*, b: *P. fluorescens*, c: *P. syringae*, d: *P. pseudoalcaligenas*, e: *P. stutzeri*, f: *P. alcaligenas*, g: *P. aeruginosa*, (-): Negativ-Kontrolle.

Es zeigten sich jedoch Kreuzreaktionen mit Bakterien außerhalb der Pseudomonadengruppe und hier vor allem bei Enterokokken.

In Abbildung 4.12 ist das Alignment der *recA*-Gene verschiedener Bakterien mit den Primern rAPsF und rAPsR dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Pseudomonaden eine 100%ige Homologie zu den Primern aufweisen, während für anderen Bakterien, darunter auch die Enterokokken, zwar Fehlpaarungen vorliegen, die jedoch eine Amplifikation nicht verhinderten.

Es war nicht möglich, durch veränderte PCR-Bedingungen die Spezifität des Primerpaares für Pseudomonaden zu erhöhen.

rAPSF	---CTGGAAATCACCGACATG-----	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACGCGGTTCGACGTGATCATCGTCCG	427
<i>Pseudomonas putida</i>	GGCCCTGGAAATCACCGACATGCTGGTGCCTCCAACGCGGTTCGACGTGATCATCGTCCG	427
<i>Burkholderia cepacia</i>	GGCGCTCGAAATCACCGACGCGCTGGTGCCTCGGGCTCGATCGACATGATCGTCCG	650
<i>Caulobacter crescentus</i>	GGCCCTGGAGATCACCGACACCCTGGTGCCTCGGGCGCGCTCGACATCGTGGTCCG	463
<i>Escherichia coli</i>	GGCACTGGAAATCTGTGACGCCCTGGCGGCTTCGGCGCAGTAGACGTTATCGTGGT	433
<i>Enterococcus faecium</i>	AGGTCTAGAGATCGTGTGATGCTTTAGTATCAAGTGGGGCTGTAGATATCGTAGTAGTC	427
<i>Enterococcus faecalis</i>	AGGCTTAGAGATTGCCGATGCCTTAGTTTCAAGTGGTGCATTGACATCGTTGTCATCG	427
<i>Campylobacter jejuni</i>	AGCCTTAGAAATTTAGTAACTATAGCAAGAAGTGGCGCAGTAGATCTTATCGTAGTAG	427
<i>Legionella pneumophila</i>	AGCTCTGGAAATTAAGTATGCTGGTGCCTTCGACGAGTTGATGTGTAATAATTG	588
	* * ** ** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
rAPSR	-----T -GAAACCACCACCGGCG-----	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GGAAACCACCACCGGCGGTAACGCACTGAAATTCTACGCCTCGGTCCGCCTGGACATCCG	674
<i>Pseudomonas putida</i>	GGAAACCACCACCGGCGGTAACGCCCTGAAATTCTACGCCTCGGTCCGCCTGGACATCCG	674
<i>Burkholderia cepacia</i>	GGAAACCACGACGGGCGCAACGCGCTGAAATTCTATTGTCGGTCCGCTCGACATCCG	897
<i>Caulobacter crescentus</i>	CGAAACGACACGGGCGCAACGCGCTGAAATTCTACGCCTTCAGTGCCGCTGGATATCCG	710
<i>Escherichia coli</i>	GGAAACCACTACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTACGCCTCTGTTGCTCGACATCCG	680
<i>Enterococcus faecium</i>	AGAAATCACTCCTGGAGGACGCGCATTGAAATTCTACGCAACGATCCGTTTGGAAGTACG	674
<i>Enterococcus faecalis</i>	TGAAACAACCTCTGGTGGACGTGACATTGAAATTCTACGCAACGTTCCGTTAGAGTCCG	674
<i>Campylobacter jejuni</i>	TGAAACTACAACAGTGGAAATGCATTAATAAATCTATGCTTCTGTGCGTTTAGATGTTAG	677
<i>Legionella pneumophila</i>	TGAAACTACTACAGGGGCAATGCTTTGAAAGTTTATGCTTTCAGTTTCGTTTGGATATCCG	835
	**** *	

Abb. 4. 12: Alignment der Primer rAPsF und rAPsR mit Ausschnitten aus *recA*-Sequenzen verschiedener Bakterien. Die Primer sind fett gedruckt und gelb unterlegt. Die Consensus-Sequenzen der Pseudomonaden sind grün unterlegt, die der anderen Bakterien sind grau unterlegt. (*) markiert bei allen Sequenzen die übereinstimmenden Nukleotide (Consensus).

Zusätzlich zu Reinkulturen ausgewählter Bakterienspezies wurden auch Proben aus Filterausläufen und Trinkwasserbiofilmen aus einem Wasserwerk im PCR-Verfahren untersucht. Die PCR-Produkte dieses Versuchansatzes sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Die Templates haben die für das *recA*-Amplifikat erwartete Größe von 260 bp. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das *recA*-Genfragment mit Hilfe der Primer rAPsF und rAPsR amplifiziert werden kann, da die entsprechenden bakteriellen Genträger in diesen natürlichen Populationen präsent sind.

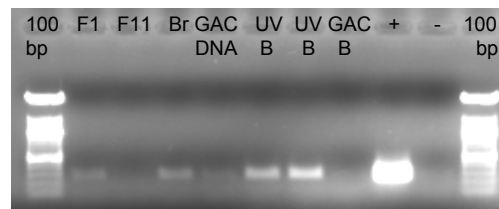


Abb. 4. 13: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAPsF und rAPsR und verschiedenen Umweltproben und Proben aus einem Wasserwerk als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. F1: Kiesfilter-Auslauf, F11: Aktivkohlefilter-Auslauf, Br4: Wasser Brunnen 4, GAC DNA: DNA aus Biofilmen auf Aktivkohlefilter, UV B: Biofilm nach UV-Desinfektion, GAC Biof: Biofilm nach Aktivkohlefilter, (+): *Pseudomonas aeruginosa*, (-): Negativ-Kontrolle, 100-bp-Marker.

Diese PCR-Spezifität und –Effizienz war grundlegend für die Erstellung von Digoxigenin-markierten Oligonucleotiden (Sonden), die für die Untersuchung der Gen-Expression im Northern Blot-Hybridisierungsverfahren verwendet wurden (siehe Kap. 4.1.2).

4.1.2 Prinzip des Nachweises der *recA*-mRNA mit markierten *recA*-Oligonukleotiden

Alle neu entwickelten und *recA*-spezifischen Primer sind in Tab. 4.1 zusammengestellt. Anwendung finden die Primer, nicht nur beim spezifischen Nachweis von *recA*-DNA in einer Probe, sondern auch zur Herstellung spezifischer *recA*-Gensonden.

Tab. 4. 1: Primer zur Amplifikation von *recA*-Fragmenten.

Primer	Nucleotidsequenz (5'→3')	Amplikonlänge (bp)	Referenz
rA2F	CGGAATTCTCGGGCAAGACCACC	~560	Für <i>Caulobacter crescentus</i> . Aus: Yang and Yang, 2000.
rA2R	TAGCAAGCTTGTTCTTGACCACCTT		
rAcomF	AGGCCGAAGCTCGAAGGTGAAAT	~330	Für <i>Aquabacterium commune</i> . Diese Arbeit.
rAcomR	ATGTCGAATTCAGCGGTCTTGAA		
rAPsF	CTGGAAATCACCGACATG	~259	Für Pseudomonaden. Diese Arbeit.
rAPsR	CRCCGGTGGTGGTTTC		
rAEntF	TACACGCTATTGCAGAAGTACAA	~301	Für <i>Enterococcus faecium</i> und <i>Enterococcus faecalis</i> . Diese Arbeit.
rAEntR	TTTACGCAATGCTTGAGACAT		

R= G oder A.

Zur Erstellung solcher *recA*-spezifischen Sonden wurde eine PCR mit den Primern und den entsprechenden Referenzbakterien durchgeführt, in der zusätzlich zu den dNTPs auch DIG-11-dUTPs zugegeben werden. In die entstehenden PCR-Produkte werden also anstelle von Thymin-Basen Digoxigenin-markierte Uridin-Basen statistisch verteilt eingebaut. Das doppelsträngige PCR-Produkt wird durch Hitzedenaturierung zur einzelsträngigen Sonde, die komplementär zur *recA*-mRNA des Bakteriums ist. Die zu untersuchende einzelsträngige RNA wird auf eine Nylonmembran geblottet und mit UV-Licht fixiert. Nach Zugabe von einzelsträngiger Sonde kann diese mit komplementären Sequenzen hybridisieren. Über einen Anti-DIG-Antikörper und anschließender Zugabe eines Substrats wird die hybridisierte Sonde über Chemilumineszenz detektiert. In Abbildung 4.14 ist beispielhaft eine Northern Blot-Analyse dargestellt. Auf eine Nylon-Membran wurde jeweils die gleiche Konzentration von Gesamt-RNA unterschiedlicher Proben aufgetragen, fixiert und mit einer *recA*-Sonde hybridisiert. Je stärker das Signal ist, umso mehr *recA*-spezifische Sonde konnte an die komplementäre RNA ankoppeln (hybridisieren) und umso mehr *recA*-mRNA ist in der Probe vorhanden. Je

schwächer das Signal ist (Spur 1 oder 6), umso weniger Anteil an *recA*-mRNA ist in der Gesamt-RNA vorhanden.

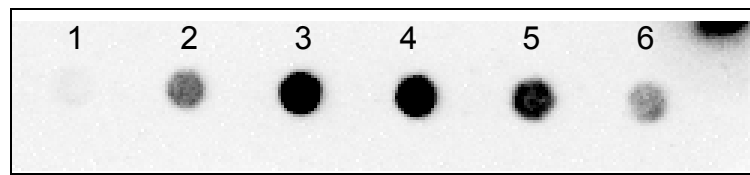


Abb. 4. 14: Northern Blot-Analyse verschiedener Gesamt-RNA-Proben. Auf der Nylon-Membran ist bei jedem Dot die gleiche Menge an Gesamt-RNA aufgetragen. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet nur an komplementäre RNA-Sequenzen und kann über Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Spur 1: Proteine unbehandelter Bakterien. Spur 2-6: Proteine von Bakterien nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten.

4.1.3 Quantifizierung der Genexpression von *recA* über reverse Transkription

Zum quantitativen Nachweis der Genexpression von *recA* wurde deren mRNA spezifisch mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese anschließend in der Real Time-PCR mit spezifischen „Primer/Probe“-Systemen (Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer und Sonde) amplifiziert. Diese „Primer/Probe“-Systeme wurden mit Hilfe der Software Primer Express (Applied Biosystems) neu errechnet und zur Spezifität auf DNA- und RNA-Ebene getestet. Anhand von NCBI-Datenbankvergleichen wurde vorher die Spezifität der errechneten Primer und Sonden kontrolliert. Primersequenzen aus der Northern Blot-Analyse konnten in diesem Verfahren nicht eingesetzt werden, da sie den Anforderungen der Real Time-PCR nicht entsprachen. Die Tabelle 4.2 zeigt die in dieser Arbeit errechneten „Primer/Probe“-Systeme spezifisch für die *recA*-Gene von *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium*. Im Anhang (Teil A) sind diese Sequenzen jeweils in den Alignments mit den Sequenzen aus den Datenbanken aufgeführt.

Tab. 4. 2: „Primer/Probe“-Systeme zum quantitativen Nachweis von *recA*-mRNA mittels Real Time-PCR.

Primer	Nukleotidsequenz (5'→3')	Referenz
TQrecA-F	CAAGCTGACCGCCTCGAT	Real Time-PCR System entwickelt für <i>Caulobacter crescentus</i> . Diese Arbeit.
TQrecA-R	CCGTACATCACSCCGATCT	
TQrecA-P	FAM-ACAAGGCCAACACCATCGTCATCTTCATC-TAMRA	
TQrAPs-F	GCGCTGCGCAAGATCAC	Real Time-PCR System entwickelt für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Diese Arbeit.
TQrAPs-R	TGCGGATCTGGTTGATGAAG	
TQrAPs-P	FAM-CAATATCAAGAACGCCAACTGCCTGGTC-TAMRA	
TQrAEntF	CGCTATTGCAGAAGTACAAAAAATG	Real Time-PCR System entwickelt für <i>Enterococcus faecium</i> . Diese Arbeit.
TQrAEntR	TGCGGATCTAACGCATGCT	
TQrAEntP	FAM-CGGAACGGCCGCTTTCATTGA-TAMRA	

Das „Primer/Probe“-System EUB338 (Tab. 4.3) ist komplementär zu einer Region der 16S ribosomalen DNA. In Genexpressionsanalysen wurde dieses Testsystem als Bezugsgröße gewählt und parallel zu den spezifischen *recA*-Nachweisen mitgeführt. Ribosomale Gene sind einerseits hoch konserviert und werden andererseits konstitutiv exprimiert. Demzufolge eignet sich das 16S-ribosomale Gen als universelles Nachweissystem für *Eubacteria* und als sogenanntes „housekeeping“-Gen.

Tab. 4. 3: Eubakterielles „Primer/Probe“-System zur quantitativen PCR-Amplifikation von 16S-rDNA-Fragmenten mit dem TaqMan-System.

Primer	Nucleotidsequenz (5'→3')	Referenz
Eub338-F	GATCAGCCACACTGGGACTGA	Real Time-PCR System für Eubakterien. Schwartz, unveröffentlicht.
Eub338-R	TCAGGCTTGCGCCATT	
Eub338-P	FAM-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-TAMRA	

„housekeeping“-Gene sind Gene, die unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden. In der Regel kodieren sie Produkte, die der Aufrechterhaltung des Grundstoffwechsels dienen, wie z.B. die ribosomale RNA. Vielen Untersuchungen belegen allerdings, dass Gene unter verschiedenen Bedingungen reguliert werden können (Savli et al., 2003, Vandesompele et al., 2002). Bei der Quantifizierung der mRNA-Expression ist es daher

notwendig, ein für die spezifischen experimentellen Bedingungen geeignetes Kontrollgen zu finden.

Als „*housekeeping*“-Gen für *Pseudomonas aeruginosa* wurde, wie oben beschrieben, ein Genabschnitt auf der 16S-rDNA verwendet (EUB338).

Für *Caulobacter crescentus* wurde ein Abschnitt auf dem Elongationsfaktor (EFtu) ausgewählt. Das *EF-Tu*-Gen ist als Einzelkopie auf dem Genom vorhanden. Der Elongationsfaktor wird in der Literatur als hochkonserviert beschrieben und wird auch für phylogenetische Untersuchungen eingesetzt (Ludwig et al., 1993). Er spielt eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese, indem er die aminoacylierten tRNAs zur Akzeptor-Bindestelle im Ribosom unter GTP-Verbrauch führt (Vaitilingom et al., 1998). Die Nukleotidsequenzen der Primer EF-Tu-F (16-mer) und EF-Tu-R (24-mer) sind in Tabelle 4.4 mit ihren Positionen im *EF-Tu*-Gen von *Caulobacter crescentus* aufgeführt.

Tab. 4. 4: Primer-Sequenzen, spezifisch für das Gen des Elongationsfaktors *EF-Tu* von *Caulobacter crescentus*.

Primer	Nucleotidsequenz (3'→5')	Position (in <i>Caulobacter crescentus</i>)	Amplikon- länge (bp)	Referenz
EF-Tu-F	TTCCCGGGCGACGACA	487-502	521	diese Arbeit
EF-Tu-R	CTACCGTCCGCAGTTCTACTTCCG	1007-984		

* Aus NCBI: >gi|13424876:c1332-142 *Caulobacter crescentus* CB15 section 310 of 359 of the complete genome. Gen des Translations-Elongationsfaktors *EF-Tu*.

4.1.4 Etablierung des RecA-Protein-Nachweises über Antikörper

Parallel zu den Untersuchungen des *recA*-Gens auf DNA- und RNA-Ebene wurde die RecA-Proteinbildung über Western Blot-Hybridisierung nachgewiesen. Für den Nachweis wurden anfänglich verschiedene Antikörper der Firma RID getestet (ARM231, ARM191, ARM414). Da nur ein Antikörper, ARM414, von drei getesteten Antikörpern ein spezifisches RecA-Protein-Signal zeigte, wurde nur noch dieser für alle Versuche verwendet.

Es wird beschrieben, dass der Antikörper ARM414 das RecA-Protein von *E. coli* erkennt. Bei Verwendung eines *E.coli*-Proteinextrakts lag die RecA-Bande ungefähr bei einer Größe von 40 kDa. Der Antikörper erkennt die Aminosäure-Abfolge Glu233-Lys256 (clone ARM 414) von proteolytischen Fragmenten der RecA-Polypeptide.

Eingesetzt wurde der Antikörper in einer Konzentration von 1:1000. Beim Nachweis von RecA-Protein bei *Enterococcus faecium* war eine Konzentration von 1:750 optimal.

Die Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über den Nachweis des RecA-Proteins verschiedener Bakterien mit ARM414 und die Spezifität des Antikörpers.

Tab. 4. 5: Untersuchte Bakterien mit detektierter Größe der RecA-Proteine im Western Blot-Verfahren.

Bakterium	Antikörper-Nachweis	Proteingröße
<i>Caulobacter crescentus</i>	+	37 kDa
<i>Aquabacterium commune</i>	+	37 kDa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	~40 kDa
<i>Enterococcus faecium</i>	+	~40 kDa
<i>Escherichia coli</i>	+	39 kDa
<i>Legionella pneumophila</i>	+	37 kDa

In Abbildung 4.15 ist beispielhaft eine Western Blot-Analyse gezeigt. Hier wurde bei jeder Probe die gleiche Menge RecA-Protein eingesetzt. Das zuvor auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennte Gesamt-Protein wurde auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Antikörper ARM414 bindet spezifisch an das RecA-Protein. Mit einem zweiten Antikörper kann die RecA-spezifische Bindung über Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Je stärker das Signal ist, umso mehr Anteil an RecA ist in der Gesamt-Protein-Probe vorhanden.

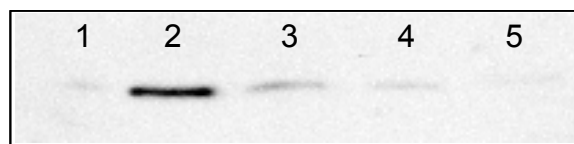


Abb. 4. 15: Western Blot-Analyse verschiedener Gesamt-Protein-Proben. Jede Probe beinhaltet die gleiche Menge an Gesamt-Protein. Der Antikörper ARM414 bindet nur spezifisch an RecA-Protein. Spur 1: unbehandelte Probe. Spur 2: Proteine aus mit UV bestrahlten Bakterien. Spur 3-5: abnehmende UV-Strahlungsintensitäten bei der Bestrahlung von Bakterien.

4.2 Induktion des *recA*-Gens und RecA-Proteins bei den Trinkwasserbakterien *Caulobacter crescentus* und *Aquabacterium commune*

4.2.1 UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in *Caulobacter crescentus*

Northern Blot-Hybridisierung

Bakterien unterschiedlicher Zelldichte (OD_{600} von 0,05; 0,1; 0,2 und 0,25) wurden mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten behandelt (unbehandelt und behandelt mit 100 - 600 J/m^2). Nach einer zweistündigen Dunkelinkubation wurde Gesamt-RNA isoliert, die mit dem Gene Quant RNA/DNA Calculator photometrisch quantifiziert wurde. Die Mittelwerte des RNA-Gehalts mit Standardabweichung der gemessenen Werte und Reinheit der RNA sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Je nach Bakteriendichte wurden unterschiedliche RNA-Mengen isoliert. Bei

einer OD_{600} von 0,05 wurden zwischen 37 und 47 $\mu\text{g/mL}$ isoliert, bei OD_{600} von 0,1 zwischen 71 und 94 $\mu\text{g/mL}$, und bei OD_{600} von 0,2 und höher wurden über 300, bis teilweise 500 $\mu\text{g/mL}$ RNA isoliert. Man kann erkennen, dass es keine deutlichen Konzentrationsunterschiede der Gesamt-RNA im Vergleich von unbehandelter oder mit unterschiedlichen UV-Intensitäten behandelter Probe vorhanden sind. Das Verhältnis von 260 nm und 280 nm liegt bei allen Proben zwischen 1,8 und 2,0, d.h. die Reinheit der RNA ist sehr hoch.

Tab. 4. 6: RNA-Konzentrationen aus Kulturen von *Caulobacter crescentus*, isoliert aus verschiedenen Zelldichten (OD_{600}) nach Bestrahlung mit verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100 - 600 J/m^2) und 2 h Dunkelinkubation. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind angegeben. Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben.

UV [J/m^2]	Verd.	MW RNA [$\mu\text{g/mL}$]	SD	260/280 nm
$OD_{600} = 0,05$				
0	-	42,567(3)	0,231	1,981
100		47,000(3)	0,173	1,885
200		40,733(3)	0,208	1,946
300		37,567(3)	0,153	1,975
400		42,467(3)	0,252	1,897
500		40,567(3)	0,208	2,024
600		39,300(3)	0,100	1,944
$OD_{600} = 0,1$				
0	-	72,967(3)	0,351	1,951
100		93,367(6)	1,030	1,812
200		74,100(4)	0,294	1,998
300		80,633(3)	0,635	2,002
400		71,900(3)	0,200	2,027
500		74,467(3)	0,351	2,015
600		82,800(3)	0,265	2,000
$OD_{600} = 0,2$				
0	1:10	36,567(3)	0,351	1,945
100		33,233(3)	0,153	1,908
200		37,975(4)	0,512	1,880
300		30,133(3)	0,306	1,899
400		37,533(3)	0,379	1,879
500		34,867(3)	0,252	1,896
600		35,000(5)	0,927	1,937
$OD_{600} = 0,25$				
0	1:10	36,433(3)	0,153	1,842
100		44,933(3)	0,115	1,962
200		42,900(3)	0,361	1,938
300		49,067(3)	0,208	1,915
400		34,333(3)	0,153	2,005
500		42,567(3)	0,379	1,945
600		39,460(5)	0,411	1,881

Für die Northern Blot-Analyse wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA auf die Nylon-Membran geblottet. Mit der *recA*-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde wurde spezifisch *recA*-mRNA nachgewiesen. Abbildung 4.16 zeigt die Ergebnisse der Northern Blot-Hybridisierung. Von links nach rechts sind die Zelldichten in steigender Reihe von OD₆₀₀ 0,05 bis 0,25 gezeigt, von oben nach unten die Bestrahlungsintensität von 0 bis 600 J/m². Die Dunkelinkubation in diesem Experiment betrug 2 h. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mRNA-Anteile in der Gesamt-RNA nach UV-Bestrahlung mit steigender Zellzahl zunehmen. Bei den unbestrahlten Proben war die *recA*-Expression vergleichbar niedrig. Weiterhin ist bei hohen Zelldichten das *recA*-Gen auch bei höherer UV-Bestrahlung noch deutlich induziert. Dies spiegelt sich in einem erhöhten spezifischen mRNA-Signal wieder. Eine deutliche Induktion ist bei allen Proben, die mit 100 und 200 J/m² behandelt wurden, zu erkennen. Bei den optischen Dichten von 0,1 und 0,2 sieht man diese Induktion bis einschließlich 600 J/m².

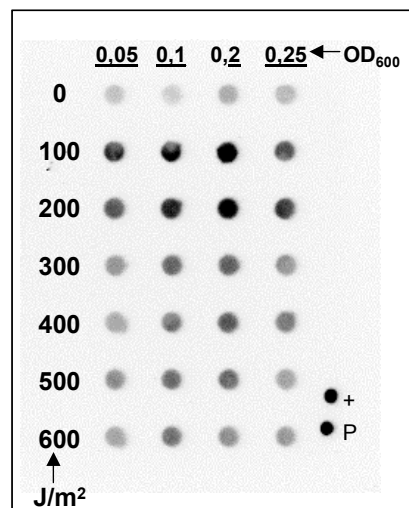


Abb. 4. 16: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Caulobacter crescentus*. Nach Behandlung mit unterschiedlichen UV-Strahlungsintensitäten (0 und 100 – 600 J/m²) und unterschiedlichen Zelldichten (OD₆₀₀ = 0,05 - 0,25). *recA* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *recA*-Sonde (rA2) detektiert. (+):denaturiertes *recA*-PCR Produkt, P = Sonde (probe).

Zusätzlich zu den Untersuchungen der *recA*-spezifischen Expression wurde bei *Caulobacter crescentus* das *EF-Tu*-Gen untersucht, das für den Elongationsfaktor codiert und als „housekeeping“-Gen ausgewählt wurde (siehe Kapitel 3.1.3). Anhand der Primer EF-Tu-F und EF-Tu-R (Tabelle 4.4) konnte eine DIG-markierte Sonde erstellt werden, die parallel zum *recA*-mRNA-Nachweis im Northern Blot-Verfahren eingesetzt wurde. Die Abbildung 4.17 zeigt das Ergebnis einer Northern Blot-Analyse mit der spezifischen *recA*-Sonde (links) und der EF-Tu-Sonde (rechts). Wiederholt wurden verschiedene Bakteriendichten (OD₆₀₀ von links nach rechts ansteigend) und verschiedene UV-Bestrahlungsintensitäten (in J/m², von oben nach unten ansteigend) nach 2 h Dunkelinkubation mit der Northern Blot-Hybridisierung untersucht. *recA*-

mRNA wurde mit einer schwachen Grundexpression bei OD_{600} von 0,05, 0,1 und 0,2 in unbehandelten Proben detektiert. Bei einer OD_{600} von 0,25 war diese Grundexpression bei gleicher Menge an aufgetragener Gesamt-RNA stärker. Nach UV-Bestrahlung war wieder deutlich zu erkennen, dass die mRNA-Anteile in der Gesamt-RNA mit steigender Zellzahl zunahm.

Im Gegensatz zu der *recA*-mRNA war die *EF-Tu*-mRNA mit einem viel geringeren Anteil in der Gesamt-RNA-Probe vorhanden. Es wurden nur schwache Signale detektiert, die nach fast allen Behandlungen (Ausnahmen z.B. bei OD_{600} von 0,2 nach 100 J/m^2) relativ gleich, d.h. konstitutiv, exprimiert waren.

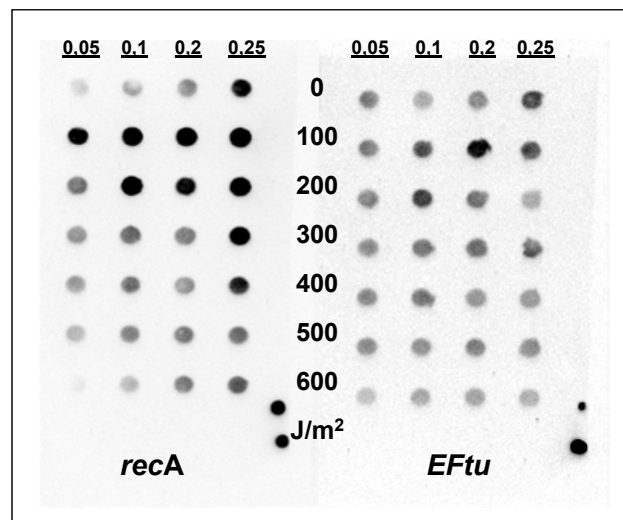


Abb. 4. 17: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Caulobacter crescentus*. Nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UV-Intensitäten (0 und 100 - 600 J/m^2) und unterschiedlichen Zelldichten ($OD_{600} = 0,05 - 0,25$). Links: Nachweis mit *recA*-Sonde r2A. Rechts: Nachweis mit 16S rRNA-Sonde EF-Tu.

Im Gegensatz zum *EF-Tu*-Gen wurde das 16S-„housekeeping“-Gen stärker exprimiert. In Abbildung 4.18 ist die Northern Blot-Hybridisierung von 1 μg Gesamt-RNA von *Caulobacter crescentus* nach UV-Behandlung und 2-stündiger Dunkelinkubation gezeigt. Bestrahlt wurde eine Bakteriensuspension mit der optische Dichte (OD_{600}) von ca. 0,05 mit einer UV-Intensität von ca. 260 bis 310 J/m^2 von links nach rechts ansteigend. Die obere Membran wurde mit der *recA*-Sonde hybridisiert, die untere mit einer 16S rDNA-spezifischen Sonde (Primer siehe Tab. 3.1). Hier wird deutlich, dass das *recA*-mRNA-Signal in der unbehandelten Probe sehr schwach ist, während die Expression von *recA* nach UV-Bestrahlung deutlich ansteigt. Im Gegensatz dazu ist die ribosomale RNA in allen untersuchten Proben sehr stabil vorhanden. Höhere UV-Bestrahlungsintensitäten verstärken die Signale sogar noch. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Zelle bei den hohen Bestrahlungswerten keine mRNA mehr bildet und die vorhandene mRNA abgebaut wird. Somit ist der Anteil der 16S rRNA in der untersuchten Gesamt-RNA-

Menge größer als vorher und man erhält ein stärkeres Signal. Die rRNA ist stabiler als die mRNA.

In weiteren Versuchen wurde das 16S-Gen als „housekeeping“-Gen verwendet, da dieses in höheren Anteilen in der Gesamt-RNA vorliegt als der EF-Tu-Elongationsfaktor und somit besser detektiert werden kann.

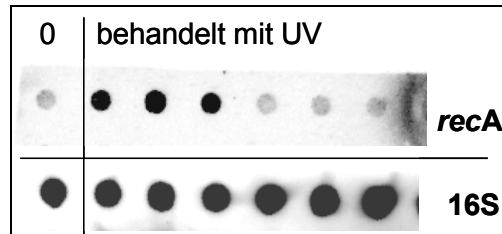


Abb. 4. 18: Northern Blot-Analyse von *Caulobacter crescentus* mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 260 - 310 J/m², von links nach rechts ansteigend) und einer Bakteriendichte (OD₆₀₀) von ca. 0,05. Oben: Nachweis mit *recA*-Sonde rA2. Unten: Nachweis mit 16S-Sonde.

Genexpressionsanalysen mittels reverser Transkription (RT) und Real Time-PCR

Mit der Genexpressionsanalyse durch reverse Transkription und Real Time-PCR wurde ein alternatives, RNA-bezogenes Verfahren zur Quantifizierung von Genexpression neben der Northern Blot-Hybridisierung etabliert, um die Ergebnisse der Geninduktion abzusichern.

Zur quantitativen Bestimmung der exprimierten *recA*-mRNA bei *Caulobacter crescentus* wurden 50 ng Gesamt-RNA der unterschiedlichen Bestrahlungsansätze mit Hilfe des Rückwärtsprimers rA2R (Tab. 4.1) und der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die *recA*-Sequenz von *Caulobacter crescentus* wurde ein spezifisches „Primer/Probe“-System für die TaqMan-PCR errechnet (TaqrecA F/R/P, Tab. 4.3).

Tabelle 4.7 zeigt die Ergebnisse der Real Time-PCR von *Caulobacter crescentus*. Untersucht wurde die Expression des *recA*-Gens über die mRNA nach UV-Bestrahlung in unterschiedlichen Bakteriendichten (OD₆₀₀ von 0,05 (oberer Tabellenteil) und 0,2 (unten)). Die UV-Intensitäten sind jeweils von oben nach unten ansteigend angegeben (100-600 J/m²). Die Negativkontrolle stellt die NTC (no template control) dar, die regulär anzeigte, dass keine Verunreinigungen im Experiment vorlagen. Bei beiden Bakteriendichten ist eine deutliche Abnahme der Ct-Werte nach UV-Bestrahlung zu beobachten, was einer Zunahme der *recA*-Zielsequenz als Amplifikat entspricht. Je niedriger der Ct-Wert (cycle of threshold) ist, umso höher ist die Konzentration der Zielsequenz in der Probe. Erneut zeigte sich die Abhängigkeit der Expression von der Zelldichte nach UV-Bestrahlung. Die Δ Ct-Werte stellen die Differenz der bestrahlten Probe zur unbehandelten Probe dar. Anhand des Δ Ct-Wertes lässt sich auch der Induktionsfaktor (IF) ableiten, der sich aus dem exponentiellen Verlauf der PCR-Amplifikation mit $2^{\Delta Ct}$ ableitet. Nach einer Bestrahlung mit 100 J/m² zeigt sich bei beiden Ansätzen der größte

Induktionsfaktor. Bei einer OD_{600} von 0,05 liegt der Induktionsfaktor bei 7,06 und bei OD_{600} von 0,2 liegt der Induktionsfaktor deutlich höher, bei 19,56. Bei der höheren Zelldichte ist das *recA*-Gen auch noch bis zu 300 J/m^2 mit einem Induktionsfaktor von 2,77 induziert. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der geringeren Bakteriendichte und bei der Bestrahlung von 200 J/m^2 ein Induktionsfaktor von 2,01.

Tab. 4. 7: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TaqrecA F/R/P spezifisch für das *recA*-Gen von *Caulobacter crescentus*. Die Zelldichten (OD_{600}) 0,05 und 0,2 wurden bei unterschiedlicher UV-Bestrahlung (0, 100-600 J/m^2) untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung. NTC: Negativ-Kontrolle. n.d.: nicht detektiert.

UV [J/m^2]	Ct		MW Ct	Δ Ct	IF	SD
$OD_{600} = 0,05$						
0	22,38	22,53	22,46			0,107
100	19,81	19,47	19,64	2,82	7,06	0,241
200	21,46	21,25	21,45	1,01	2,01	0,149
300	22,84	22,56	22,7	-	-	0,2
400	24,43	24,38	24,41	-	-	0,034
500	25,51	25,11	25,31	-	-	0,28
600	26,13	25,80	25,97	-	-	0,231
$OD_{600} = 0,2$						
0	26,67	23,42	23,55			0,175
100	19,15	19,36	19,26	4,29	19,56	0,135
200	21,26	21,26	21,26	2,285	4,87	0,004
300	22,18	21,97	22,08	1,47	2,77	0,142
400	23,93	23,78	23,86	-	-	0,109
500	24,6	24,5	24,55	-	-	0,065
600	25,35	25,15	25,25	-	-	0,145
NTC						
	n.d.	n.d.	----			----

Bei der Northern Blot-Analyse konnten erhöhte *recA*-Expressionen bei höheren Zelldichten bis zu 600 J/m^2 detektiert werden, im Real Time-Verfahren konnte diese Induktion nur bis 300 J/m^2 nachgewiesen werden.

Western Blot-Analyse

Parallel zu den Untersuchungen des *recA*-Gens auf RNA-Ebene wurde die Bildung des RecA-Proteins nach Behandlung mit UV-Strahlung über Western Blot-Hybridisierung nachgewiesen.

In Tabelle 4.8 ist der Proteingehalt eines Versuchsansatzes mit *Caulobacter crescentus* aufgeführt. Unterschiedliche optische Zelldichten wurden vor der Protein-Isolierung und – Messung mit unterschiedlichen UV-Strahlungsintensitäten behandelt und 2 h im Dunkeln inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte der gemessenen Absorption bei der Proteinbestimmung mit der jeweiligen Standardabweichung. Mit Hilfe einer Protein-Eichgerade aus BSA, deren Formel in der Tabellen-Legende angegeben ist, konnte die Gesamt-Proteinkonzentration errechnet werden. Je nach optischer Dichte der Bakterien wurden unterschiedliche Proteinmengen isoliert und gemessen. Die geringste OD₆₀₀ von 0,05 ergab Proteingehalte zwischen 115 und 134 µg/mL, bei einer OD₆₀₀ von 0,1 wurde zwischen 200 und

Tab. 4. 8: Protein-Gehalt der Extrakte aus *Caulobacter crescentus*-Kulturen mit verschiedenen Bakteriendichten (OD₆₀₀). Die Kulturen wurden mit verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m²) bestrahlt und 2 h im Dunkeln inkubiert. Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und Proteingehalt sind angegeben. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,046x + 0,1259$, $R^2 = 0,9951$).

UV [J/m ²]	MW Abs.	SD	Proteingehalt [µg/mL]
OD₆₀₀=0,05			
0	0,1875	0,002	133,91
100	0,179	0,003	115,43
200	0,1815	0,004	120,87
300	0,1845	0,001	127,39
400	0,181	0,004	119,78
500	0,179	0,008	115,43
600	0,183	0,004	124,13
OD₆₀₀=0,1			
0	0,2505	0,005	270,87
100	0,234	0,003	235,00
200	0,235	0,003	237,17
300	0,218	0,006	200,22
400	0,246	0,003	261,09
500	0,234	0,010	235,00
600	0,22	0,004	204,57
OD₆₀₀=0,2			
0	0,373	0,013	537,17
100	0,3515	0,002	490,43
200	0,3245	0,016	431,74
300	0,3315	0,002	446,96
400	0,339	0,001	463,26
500	0,325	0,008	432,83
600	0,321	0,021	424,13
OD₆₀₀=0,25			
0	0,393	0,035	580,65
100	0,383	0,018	558,91
200	0,373	0,014	537,17
300	0,379	0,018	550,22
400	0,3725	0,026	536,09
500	0,378	0,003	548,04
600	0,3915	0,011	577,39

271 $\mu\text{g/mL}$, und über einer OD_{600} von 0,2 zwischen 536 und 581 $\mu\text{g/mL}$ Gesamtprotein gemessen. Bei vergleichbaren Versuchsansätzen lagen die Werte z.T. viel höher (Siehe Tab. P1 im Anhang). Was aber in allen Versuchen deutlich zu erkennen war, ist dass die Proteinwerte bei den unbehandelten Proben sowie den unterschiedlich mit UV-bestrahlten Proben nicht stark variierten.

Das Ergebnis der Western Blot-Analyse mit Proteinen aufgelistet in Tabelle 4.8 ist in Abbildung 4.19 gezeigt. Die Zelldichten (OD_{600}) der untersuchten Bakteriensuspensionen sind auf der rechten Seite, von oben nach unten ansteigend, dargestellt. Es wurden 2,5 μg (Ansatz OD_{600} von 0,05), 5 μg (Ansatz OD_{600} von 0,1) und 10 μg (Ansatz OD_{600} von 0,2 und 0,25) Gesamtprotein in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Von links nach rechts sind jeweils die UV-Intensitäten von 0 bis 600 J/m^2 angegeben. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Gesamt-Protein-Probe von *Caulobacter crescentus* verwendet, die aus Vorversuchen mit UV-Bestrahlung stammt und bei der ein deutliches RecA-Protein-Signal mit dem Antikörper ARM414 aufweist.

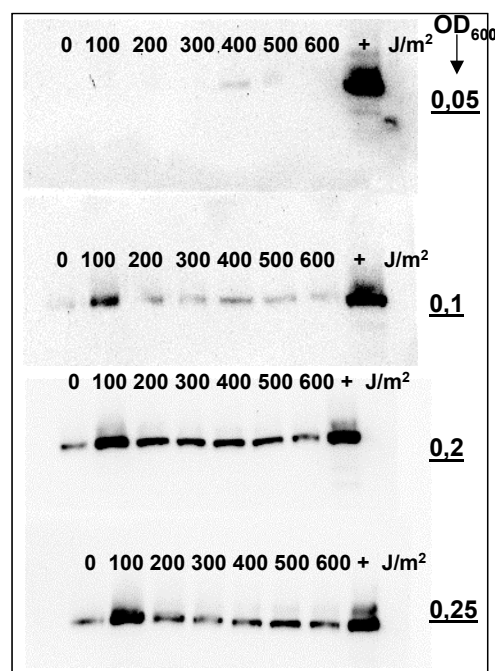


Abb. 4. 19: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Caulobacter crescentus*. RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. Unterschiedliche UV-Strahlungsintensitäten (0 und 100-600 J/m^2) und unterschiedliche Zelldichten (OD_{600} = 0,1 bis 0,25). (+): RecA-Protein von stark induzierten *Caulobacter crescentus*-Kulturen.

Bei den optischen Dichten (OD_{600}) von 0,1, 0,2 und 0,25 ist ein deutliches RecA-Protein-Signal zu erkennen. Die unbehandelte Probe zeigt vergleichsweise ein schwaches Signal, d.h. wenig Anteil an RecA-Protein im Gesamtprotein. Vergleicht man die Signale der UV-behandelten

Proben mit der unbehandelten Probe, so ist auch nach höheren UV-Strahlungsintensitäten eine größere Menge von RecA-Protein erkennbar. Auffallend ist ein stärkeres RecA-Signal bei 400 J/m² bei der Bakteriendichte 0,05 und 0,1. Auch bei einer OD₆₀₀ von 0,25 scheint ein deutlich stärkeres Signal bei 500 J/m² vorhanden zu sein. Dieses Phänomen wurde in einer Wiederholung des Versuches reproduzierbar beobachtet (nicht gezeigt). Hier wurden bei Ansätzen mit optischen Bakteriendichten von 0,05, 0,1 und 0,2 nach 500 J/m² und in einigen Versuchen 600 J/m² UV-Bestrahlung deutlich stärkere RecA-Signale detektiert, als bei niedrigeren Bestrahlungsintensitäten.

Wie auch auf mRNA-Ebene schon mittels Northern Blot-Hybridisierung (Abb. 4.16) und reverser Transkription mit anschließender Real Time-PCR (Tab. 4.7) gezeigt werden konnte, stand auch auf Proteinebene die Induktion von RecA nach UV-Bestrahlung mit der Dichte der Bakterien in Zusammenhang. Die Anteile an RecA-Protein im Gesamtprotein-Extrakt nahmen nach UV-Bestrahlung mit Anstieg der Zelldichte zu (Abb. 4.19).

4.2.2 UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in *Aquabacterium commune*

Northern Blot-Hybridisierung

Bei dem Trinkwasserbakterium *Aquabacterium commune* wurden ähnlich wie bei *Caulobacter crescentus* Genexpressionsanalysen durchgeführt. Wie in Kapitel 4.1.1. beschrieben, konnte mit den Primern rAcomF und rAcomR (Tab. 4.1) eine spezifische Sonde für den *recA*-Genabschnitt von *Aquabacterium commune* erstellt werden. Tabelle 4.9 zeigt den Gehalt der isolierten Gesamt-RNA nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungen (unbehandelt und 100 bis 600 J/m²) verschiedener Bakteriendichten (OD₆₀₀ = 0,08 bzw. 0,14), die nach der Behandlung 2 h im Dunkeln inkubiert wurden. *Aquabacterium commune* wächst sehr langsam und ist schwierig zu kultivieren. Es konnten nur geringere Zelldichten im Vergleich zu den anderen untersuchten Bakterien eingesetzt werden, die Ausbeute der Gesamt-RNA war auch dementsprechend geringer. Die Mengen an isolierter RNA schwankten zum Teil sehr stark, vor allem bei der Bakteriendichte von 0,14. Bei OD₆₀₀ von 0,08 lagen die Werte zwischen 40 und 72 µg/mL.

Das Ergebnis der Northern Blot-Analyse von *Aquabacterium commune* ist in Abbildung 4.20 gezeigt. Oben ist für jede der beiden Spalten die Zelldichte angegeben. Auf der linken Seite sind die UV-Intensitäten, von oben nach unten ansteigend (0-100 J/m²), gezeigt. Von jeder Probe wurden 100 ng Gesamt-RNA aufgetragen. Bei beiden Ansätzen wird eine deutliche Expression von *recA*-mRNA bei 100 J/m² detektiert. Die unbehandelte Probe zeigt bei gleicher Menge an Gesamt-RNA kein detektierbares Signal. Bei einer OD₆₀₀ von 0,14 kann man

zusätzlich ein *recA*-Signal bei 400 und 500 J/m² erkennen, wenn auch deutlich schwächer (Pfeile).

Tab. 4. 9: RNA-Konzentration aus Kulturen von *Aquabacterium commune* mit verschiedenen Zelldichten (OD₆₀₀). Die Kulturen wurden mit verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m²) bestrahlt und 2 h im Dunkeln inkubiert. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind angegeben. Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben.

UV [J/m ²]	MW RNA [µg/mL]	SD	260/280 nm
OD₆₀₀=0,08			
0	72,467(3)	0,907	2,014
100	59,767(3)	0,404	1,976
200	51,933(3)	0,231	1,943
300	39,667(3)	2,146	1,988
400	40,500(3)	0,721	1,921
500	45,067(3)	1,401	1,879
600	43,667(3)	0,643	1,843
OD₆₀₀=0,14			
0	54,033(3)	1,762	1,983
100	72,600(3)	3,020	2,034
200	109,400(3)	0,900	2,057
300	68,100(3)	1,609	1,946
400	28,567(3)	0,503	1,929
500	5,767(3)	0,451	2,000
600	32,967(3)	1,274	1,791

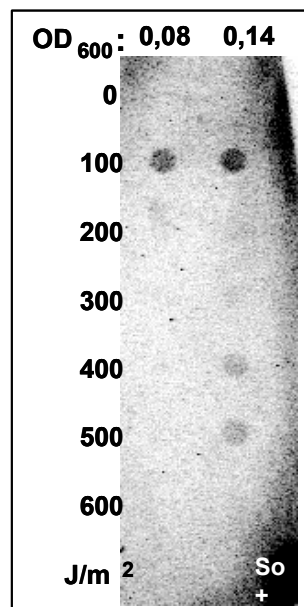


Abb. 4. 20: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Aquabacterium commune*. *recA* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *recA*-Sonde (rAcom) detektiert. Unterschiedliche UV-Strahlungsintensitäten (0 und 100 – 600 J/m²) und unterschiedliche Zelldichten (OD₆₀₀ = 0,08 und 0,14). (+): denaturiertes *recA*-PCR Produkt, So: Sonde.

Auch bei *Aquabacterium commune* wurde parallel zur Expression von *recA*-mRNA das 16S-ribosomale Gen als „housekeeping“-Gen untersucht. Der Versuchsansatz, dessen Ergebnis in Abbildung 4.21 gezeigt ist, ist ähnlich dem von *Caulobacter crescentus*. Es wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA von *Aquabacterium commune*, die nach unterschiedlicher UV-Bestrahlung und einer 2-stündigen Dunkelinkubation isoliert wurden, auf eine Membran geblottet. Die Zelldichte (OD_{600}) in diesem Versuch betrug ca. 0,06. Bestrahlt wurde mit UV-Intensitäten zwischen ca. 260 bis 310 J/m^2 von links nach rechts ansteigend. Die obere Membran wurde mit der *recA*-Sonde behandelt, die untere mit einer 16S rDNA-spezifischen Sonde (EUB338). Die ribosomale RNA ist in allen untersuchten Proben sehr stabil vorhanden. Beim Nachweis der *recA*-mRNA war bei der unbehandelten Probe kein Signal vorhanden, während die Expression nach ca. 260 J/m^2 deutlich induziert wurde. Deutlich wird hier, dass der 16S ribosomale Genabschnitt konstitutiv exprimiert wird, während das *recA*-Gen eine Induktion nach Bestrahlung mit UV zeigt.

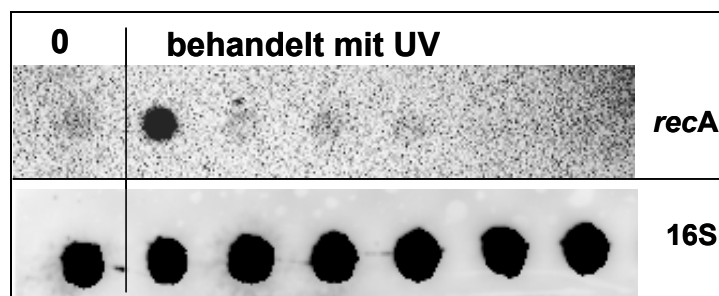


Abb. 4. 21: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Aquabacterium commune* mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 260 - 310 J/m^2 , von links nach rechts ansteigend) und einer Bakteriendichte (OD_{600}) von ca. 0,06. Oben: Nachweis mit *recA*-Sonde rAcom. Unten: Nachweis mit 16S-Sonde.

Western Blot-Analyse

Auch bei *Aquabacterium commune* wurde die Bildung von RecA-Protein nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungen untersucht. Tabelle 4.10 zeigt den Gesamt-Proteingehalt, der bei OD_{600} von 0,08 und 0,14 nach unterschiedlichen Bestrahlungen mit UV (0 – 600 J/m^2) isoliert werden konnte. Er lag bei einer OD_{600} von 0,08 zwischen 246 und 327 $\mu g/mL$ und bei einer OD_{600} von 0,14 zwischen 421 und 512 $\mu g/mL$. Der Proteingehalt von unbehandelten Bakterien und den unterschiedlich mit UV bestrahlten Proben ist vergleichbar.

Tab. 4. 10: Protein-Gehalt der Extrakte aus *Aquabacterium commune*-Kulturen mit unterschiedlichen Bakteriendichten (OD_{600}). Die Kulturen wurden mit verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100 - 600 J/m^2) bestrahlt und 2 h im Dunkeln inkubiert. Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und Proteingehalt sind angegeben. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0458x + 0,1302$, $R^2 = 0,9949$).

UV [J/m^2]	MW Abs.	SD	Proteingehalt [$\mu g/mL$]
$OD_{600} = 0,08$			
0	0,278	0,000	322,71
100	0,28	0,007	327,07
200	0,254	0,001	270,31
300	0,2645	0,006	293,23
400	0,243	0,003	246,29
500	0,2515	0,006	264,85
600	0,251	0,003	263,76
$OD_{600} = 0,14$			
0	0,3595	0,039	500,66
100	0,3645	0,046	511,57
200	0,356	0,006	493,01
300	0,323	0,014	420,96
400	0,3335	0,019	443,89
500	0,3045	0,008	380,57
600	0,3315	0,028	439,52

In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse von *Aquabacterium commune* dargestellt. Für jeden Blot ist auf der rechten Seite die Zelldichte angegeben. Von links nach rechts sind jeweils die unbehandelte Probe (0) und die UV-Bestrahlungsintensitäten der behandelten Proben (100 – 600 J/m^2) gezeigt. Bei allen Proben wurden 5 μg Gesamt-Protein eingesetzt. Die Positivkontrolle (+) ist eine Gesamt-Proteinprobe von *Caulobacter crescentus*, bei der ein sehr starkes Signal von RecA-Protein detektiert werden kann. Die beiden Bakteriendichten von *Aquabacterium commune* zeigten sehr ähnliche Ergebnisse. Die Grundexpression von RecA in der unbehandelten Probe war sehr gering. Nach 100 J/m^2 war ein deutliches RecA-Protein-Signal sichtbar. Bei höheren Bestrahlungsintensitäten waren nur noch geringere RecA-Protein-Anteile in der Gesamt-Proteinprobe vorhanden, teilweise war das Signal etwas stärker als die unbehandelte Probe.

Die Größe des RecA-Proteins von *Aquabacterium commune* entspricht der von *Caulobacter crescentus* (Positivkontrolle) und liegt bei 37 kDa.

Die Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen der mRNA-Untersuchungen über das Northern Blot-Verfahren (Abb. 4.20).

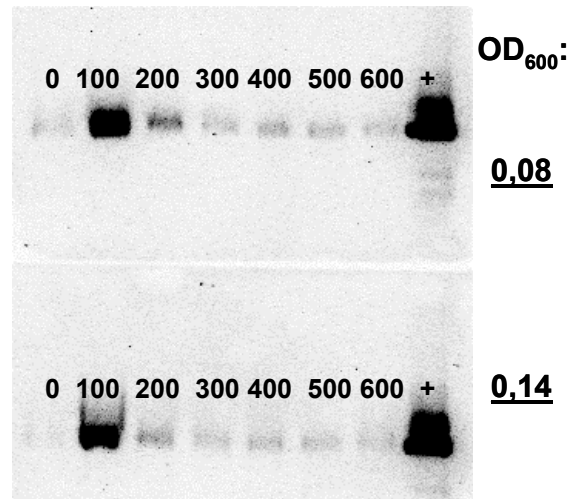


Abb. 4. 22: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Aquabacterium commune*. RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. Unterschiedliche UV-Intensitäten (0 und 100 - 600 J/m²) und unterschiedliche Zelldichten (OD₆₀₀ = 0,08 und 0,14) (+): RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

Bereits nach diesen Untersuchungen zeigte sich, dass sich die Expression der Reparatursysteme bei Bakterien, wie *Caulobacter crescentus* und *Aquabacterium commune*, nach UV-Bestrahlung in ihrer Aktivität deutlich unterscheiden können.

4.3 Induktion des *recA*-Gens und RecA-Proteins bei den opportunistischen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium*

4.3.1 UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in *Pseudomonas aeruginosa*

Northern Blot-Hybridisierung

Für die Genexpressionsanalyse von *Pseudomonas aeruginosa* wurde mit dem Pseudomonaden-spezifischen Primerpaar rAPsF und rAPsR (Tab. 4.1) in der PCR eine Digoxigenin-markierte Sonde erstellt. Mit dieser Sonde konnte die Expression der *recA*-mRNA spezifisch mittels Northern Blot-Hybridisierung untersucht werden.

Untersuchungen zur Expression von *recA*-mRNA wurde mit *Pseudomonas aeruginosa* (Umweltstamm #154) durchgeführt. Tabelle 4.11 zeigt die isolierte Gesamt-RNA-Menge aus einem UV-Bestrahlungsversuch mit *Pseudomonas aeruginosa* (#154), der mit einer Zelldichte (OD₆₀₀) von 0,2 durchgeführt wurde. Hier wurde die Zelldichte konstant gehalten, aber die Dunkelinkubationszeit zwischen UV-Bestrahlung und RNA-Isolierung variiert. Inkubiert wurden nicht nur 2 h, sondern auch 3 h, 5 h, 20 h und 27 h. Bei längerer Dauer der Dunkelinkubationszeit nimmt die Menge an Gesamt-RNA ab. Pro Dunkelinkubationsansatz

kann man keine signifikanten Unterschiede oder Zusammenhänge zwischen unbehandelten und unterschiedlich mit UV bestrahlten Proben erkennen.

Tab. 4. 11: RNA-Konzentrationen, 1:10 verdünnt, aus *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2. Die Kulturen wurden mit verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100 - 600 J/m^2) bestrahlt und unterschiedlich lang im Dunkeln inkubiert. (2 – 27 h). Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind angegeben. Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben.

UV [J/m^2]	MW [$\mu g/mL$]	SD
2h		
0	15,100(5)	0,339
100	16,933(3)	0,058
200	20,300(3)	0,265
400	22,700(3)	0,200
600	18,667(3)	0,208
3h		
0	15,900(3)	0,100
100	10,867(3)	0,058
200	18,367(3)	0,153
400	22,033(3)	0,208
600	25,433(3)	0,208
5h		
0	13,540(6)	1,193
100	14,267(3)	0,058
200	18,467(3)	0,153
400	18,967(3)	0,252
600	22,133(3)	0,252
20h		
0	12,667(3)	0,153
100	8,767(3)	0,153
200	5,667(3)	0,493
400	5,500(3)	0,265
600	5,067(3)	0,321
27h		
0	8,700(3)	0,200
100	7,900(3)	0,361
200	10,467(3)	0,321
400	3,933(3)	0,289
600	7,425(4)	0,377

In Abbildung 4.23 sind die zu Tabelle 4.11 dazugehörigen Ergebnisse der Northern Blot-Hybridisierung von *Pseudomonas aeruginosa* (#154) mit einer OD_{600} von 0,2 gezeigt. Jeweils 1 μg Gesamt-RNA wurde auf eine Membran geblottet. Der *recA*-Nachweis erfolgte mit der Sonde rAPs. Von links nach rechts ist die Dauer der Dunkelinkubation von 2 – 27 h gezeigt, von oben nach unten werden die UV-Bestrahlungsintensitäten von 0 bis 600 J/m^2 aufgeführt. Die Proben

wurden doppelt aufgetragen, d.h. die linke und rechte Bildhälfte beinhalten jeweils die gleichen Proben. Die Grundexpression des *recA*-Gens bei den unbehandelten Proben wird nur mit einem schwachen Signal detektiert, d.h. die *recA*-mRNA macht nur einen kleinen Anteil der Gesamt-RNA aus. Eine deutliche Induktion der *recA*-Expression ist nach 2 und 3 h Dunkelinkubation bis 400 J/m² bzw. 600 J/m² zu erkennen. Auch nach 5 h Dunkelinkubation ist die detektierbare *recA*-mRNA-Menge noch deutlicher vorhanden als in der unbehandelten Probe. Diese Unterschiede sind gemessen an den vorher genannten Ergebnissen weniger auffällig. Nach 20 und 27 h Dunkelinkubation ist eine Induktion von *recA*-mRNA nicht mehr erkennbar. Dieses Ergebnis konnte durch Wiederholungen des Experimentes mehrfach reproduziert werden.

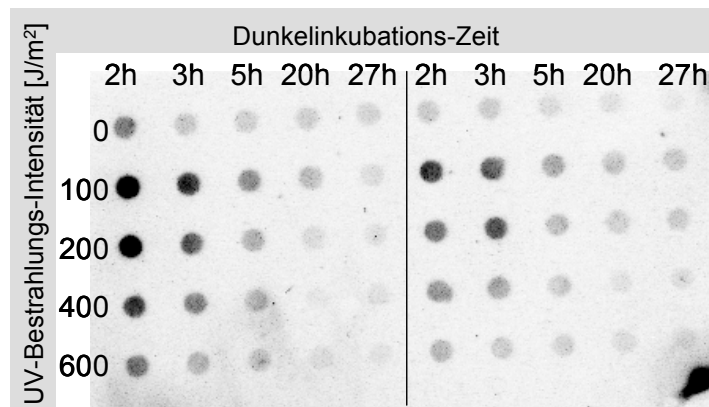


Abb. 4. 23: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Die Proben sind doppelt aufgetragen. *recA*-mRNA wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *recA*-Sonde (rAPs) detektiert. Unterschiedliche UV-Bestrahlungen (0 und 100 – 600 J/m²) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h).

Weitere Versuche wurden mit unterschiedlichen Zelldichten von zwei *Pseudomonas aeruginosa*-Umweltisolaten (Stamm #49 und Stamm #154, eigene Nummerierung) durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von *recA*-mRNA bei verschiedenen Bakteriendichten (OD_{600} von 0,08, 0,15 und 0,16) nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 – 600 J/m²). Nach zweistündiger Inkubation im Dunkeln wurde Gesamt-RNA isoliert. Die Menge der isolierten Gesamt-RNA ist in Tabelle R1 im Anhang aufgeführt. Wieder war keine deutliche Änderung der Gesamt-RNA-Menge zwischen der unbehandelten und den bestrahlten Proben zu erkennen.

Bei den Expressionsuntersuchungen mit jeweils 1 µg Gesamt-RNA mit der Northern Blot-Hybridisierung wurden deutliche *recA*-mRNA-Signale nach Bestrahlung mit UV sichtbar. Auch hier beeinflusste offenbar die Dichte der Bakterien die *recA*-Induktion. Bei einer OD_{600} von 0,08 wurde nur eine schwache Induktion von *recA*-mRNA detektiert. Bei optischen Dichten über 0,1

wurde die *recA*-Induktion sehr deutlich sichtbar im Gegensatz zur unbehandelten Probe, sogar nach UV-Bestrahlungen von 500 und 600 J/m² (nicht gezeigt).

Genexpressionsanalysen mittels reverser Transkription und TaqMan-PCR

Zum quantitativen Nachweis der *recA*-mRNA wurden Untersuchungen der cDNA, die durch reverse Transkription der *recA*-mRNA von *Pseudomonas aeruginosa* entstand, über Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TQrAPs F/R/P (Tabelle 4.3) durchgeführt. Untersucht wurden *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer optischen Dichte von 0,2 und unterschiedlichen UV-Behandlungen mit Bestrahlungsintensitäten von 0 bis 600 J/m². Zusätzlich wurden verschiedene Dunkelinkubationszeiten von 2 – 27 h angewandt. Tabelle 4.12 zeigt die Ergebnisse des Versuchs. Aufgeführt sind für jede Dunkelinkubationszeit die gemessenen Ct-Werte mit Mittelwert und Standardabweichung und die daraus abgeleiteten Δ Ct-Werte und Induktionsfaktoren (IF). Die Negativ-Kontrolle (NTC) lag bei den ersten drei Dunkelinkubationszeiten deutlich über 40 Zyklen und war regulär. Bei den höheren Dunkelinkubationszeiten von 20 h und 27 h waren die Kontroll-Ct-Werte etwas kleiner als der Ct von 40, was jedoch keine Auswirkung hinsichtlich der *recA*-Analyse besitzt. Anhand der Δ Ct-Werte, die die Differenzen der Ct-Werte der bestrahlten Proben zur unbehandelten Probe darstellen, kann man bei *Pseudomonas aeruginosa* einen deutlichen Anstieg der *recA*-Expression nach UV-Bestrahlung erkennen. Bei 100 J/m² hatte der Induktionsfaktor nach 2 h Dunkelinkubation einen Wert von 10,85, nach 3 h einen Wert von 12,65 und nach 5 h einen Wert von 9,25. Mit ansteigender UV-Intensität nahm der Induktionsfaktor ab. Nach 2 und 3h Dunkelinkubation wurde die Expression des *recA*-Gens einschließlich bis zu 600 J/m² mit Induktionsfaktoren von noch 2,44 und 1,14 induziert. Nach 5 h war diese Induktion bis zu 400 J/m² mit einem Induktionsfaktor von 2,11 sichtbar. Nach 20 h konnte man nur noch bei 100 J/m² eine Induktion mit Induktionsfaktor 5,098 erkennen, nach 27 h war keine Induktion mehr zu sehen. Das *recA*-Gen wurde also zwischen 2 und 5 h nach UV-Bestrahlungen bis 400 J/m² und höher exprimiert, bei Dunkelinkubation über 20 h wurde das *recA*-Gen nur noch nach einer UV-Bestrahlung von 100 J/m² bzw. nicht exprimiert. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Befunden der Northern Blot-Analyse der mRNA (Abbildung 4.23).

Parallel zum *recA*-Gen wurde das „housekeeping“-Gen untersucht, das für einen Genabschnitt auf der 16S ribosomalen DNA spezifisch ist. Das 16S-rDNA-spezifische „Primer/Probe“-System EUB338 ist in Tab. 4.3 aufgeführt. Untersucht wurden Gesamt-RNA-Extrakte, die bereits für den *recA*-Nachweis eingesetzt wurden. In Tabelle 4.13 sind wieder für jede Dunkelinkubationszeit die gemessenen Ct-Werte mit Mittelwerten und Standardabweichungen aufgeführt. Man kann an den Ct-Werten erkennen, dass das 16S rDNA-Gen konstitutiv exprimiert wird. Die Ct-Werte sind in jedem Ansatz untereinander weitgehend gleich und ändern

Tab. 4. 13: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System EUB338 spezifisch für die 16S-cDNA nach reverser Transkription. Untersucht wurde *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlung (0 und 100 - 600 J/m^2) und unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten (2 h - 27 h). Ct: threshold cycle. MW: Mittelwert. SD: Standardabweichung. NTC: Negativ-Kontrolle. n.d.: nicht durchgeführt.

UV [J/m^2]	2h			3h			5h			20h			27h		
	CT	SD	MW Ct	CT	SD	MW Ct	Ct	SD	MW Ct	CT	SD	MW Ct	CT	SD	MW Ct
0	18,35	0,135	18,233	18,04	0,027	18,067	18,06	0,206	18,160	14,97	0,182	14,763	14,37	0,121	14,24
	18,27			18,02			14,7			14,21					
	18,08			18,09			14,14			14,62					
100	18,21	0,066	18,153	17,93	0,052	17,990	18	0,012	17,987	14,25	0,082	14,177	14,91	0,186	14,75
	18,17			18			14,19			14,79					
	18,08			17,97			14,09			14,55					
200	18,1	0,139	17,987	17,74	0,074	17,757	17,83	0,05	17,890	17,61	0,144	17,45	15,24	0,112	15,117
	18,03			17,69			17,92			17,42					
	17,83			17,84			17,92			17,32					
400	18,01	0,075	17,950	17,78	0,043	17,747	17,59	0,04	17,640	14,82	0,135	14,74	n.d.		
	17,97			17,76			17,67			14,82					
	17,87			17,7			17,66			14,58					
600	18,09	0,114	17,957	17,71	0,062	17,723	17,88	0,04	17,887	14,41	0,147	14,243	15,81	0,089	15,88
	17,91			17,79			17,85			14,14					
	17,87			17,67			17,93			14,18					
NTC	39,26	0,35	39,010							37,12	0,552	36,527			
	39,16			36,44											
	38,61			36,02											

Quantifizierung der *recA*-mRNA in der Gesamt-RNA-Extraktion

Zusätzlich zur Quantifizierung der Induktion konnte auch die Menge an *recA*-mRNA in den Proben quantifiziert werden. Dazu wurde das *recA*-Gen aus *Pseudomonas aeruginosa* in der PCR mit der Primerkombination TQrAPsF und TQrAPsR amplifiziert. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Qiagen PCR Purification Kit wurde der DNA-Gehalt der PCR-Produkte photometrisch bestimmt. Verschiedene *recA*-DNA-Konzentrationen wurden in die Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TQrAPs F/R/P eingesetzt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.14 dargestellt. Wie erwartet, lag bei einer zehnfachen Verdünnung der Δ Ct-Wert zwischen 3,02 und 3,93 vor. Einige Verdünnungen wurden in weiterführenden UV-Bestrahlungsversuchen in den TaqMan-Läufen mitgeführt (in Tab. 4.14 farbig unterlegt).

Tab. 4. 14: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TQrAPs F/R/P. Auswahl von Proben der Verdünnungsreihe des *recA*-PCR-Produktes von *Pseudomonas aeruginosa*. Ct: threshold cycle. MW: Mittelwert. SD: Standardabweichung. NTC: Negativ-Kontrolle.

Probe	Konzentration des PCR-Produktes	CT	MW Ct	SD CT	Δ Ct
NTC	-	38,51	38,94	0,607	
		39,37			
17	1 ng/mL	17,51	17,45	0,085	3,015
		17,39			
18	100 pg/mL	20,53	20,465	0,097	3,93
		20,4			
19	10 pg/mL	24,27	24,395	0,175	3,805
		24,52			
20	1 pg/ml	27,95	28,2	0,353	3,435
		28,45			
21	100 fg/mL	31,76	31,635	0,179	
		31,51			

Vergleicht man die Ct-Werte der verschiedenen *recA*-PCR-Produkte aus Tabelle 4.14 mit den Ct-Werten der cDNA aus Tabelle 4.12, so korreliert der Ct-Wert der Grundexpression der unbestrahlten Proben, der einen Ct-Wert zwischen 24,38 und 25,47 besitzt, etwa mit dem Ct-Wert der Verdünnung 19, der bei 24,395 liegt und einer *recA*-PCR-Produkt-Konzentration von 10 pg/mL entspricht. Der niedrigste Ct-Wert, der der größten cDNA-Menge entspricht, liegt bei 20,94 nach einer UV-Bestrahlung von 100 J/m² und 2 h Dunkelinkubation. Dieser Wert korreliert mit dem Ct-Wert der Verdünnung 18 bei 20,465, die 100 pg/mL *recA*-PCR-Produkt enthielt.

Western Blot-Analysen

Auf Proteinebene konnte mit dem RecA-spezifischen Antikörper ARM414 das RecA-Protein von *Pseudomonas aeruginosa* detektiert werden (siehe Tab. 4.5).

Gemäß den vorangegangenen Versuchsanordnungen wurden *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer OD_{600} von 0,2 mit unterschiedlichen UV-Intensitäten bestrahlt und die Inkubation im Dunkeln zwischen 2 h und 27 h variiert. Der Gesamt-Protein-Gehalt einer Versuchsreihe ist in Tabelle 4.15 angegeben. Die Gesamt-Protein-Gehalte lagen zwischen 370 und 610 $\mu\text{g/mL}$. Es ist keine deutliche Abhängigkeit zwischen Behandlung der Bakterien und Proteingehalt zu erkennen. Auch nehmen die Protein-Mengen bei Verlängerung der Dunkelinkubation nicht ab.

Tab. 4. 15: Protein-Gehalt aus Extrakten von *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2. Die Kulturen wurden mit verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m^2) bestrahlt und unterschiedlich lang im Dunkeln inkubiert (2 – 27 h). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (3er-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und Proteingehalt sind angegeben. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0499x + 0,1203$, $R^2 = 0,9964$).

UV [J/m^2]	MW Abs.	SD	Proteingehalt [$\mu\text{g/mL}$]
2h			
0	0,402	0,003	564,53
100	0,3415	0,006	443,29
200	0,32	0,001	400,20
400	0,3425	0,002	445,29
600	0,3425	0,004	445,29
3h			
0	0,381	0,004	522,44
100	0,318	0,000	396,19
200	0,34	0,006	440,28
400	0,3375	0,006	435,27
600	0,4	0,014	560,52
5h			
0	0,316	0,001	392,18
100	0,3285	0,006	417,23
200	0,3155	0,005	391,18
400	0,3225	0,009	405,21
600	0,305	0,003	370,14
20h			
0	0,4175	0,012	595,59
100	0,3635	0,008	487,37
200	0,349	0,004	458,32
400	0,327	0,003	414,23
600	0,3195	0,005	399,20
27h			
0	0,425	0,014	610,62
100	0,3535	0,009	467,33
200	0,353	0,016	466,33
400	0,3455	0,006	451,30
600	0,335	0,011	430,26

In Abbildung 4.24 wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein in die SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse eingesetzt. Von oben nach unten sind die unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten von 2 bis 27 h aufgetragen. Von links nach rechts sind jeweils die ansteigenden UV-Intensitäten gezeigt. Nach 2 h, 3 h und 6 h Dunkelinkubation zeigte die unbehandelte Probe jeweils eine Grundexpression von RecA. Es wird deutlich, dass nach Bestrahlung mit UV die *recA*-Bildung induziert wurde und mehr Anteil an RecA-Protein im Gesamt-Protein detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis korrelierte mit dem Ergebnis der Northern Blot-Analyse der RNA und der Real Time-PCR der cDNA (s.o.). Nach 20 und 27 h zeigte die unbehandelte Probe ein deutlich stärkeres RecA-Signal. Im Gegensatz zur unbehandelten Probe wurde nach Behandlung mit hohen UV-Bestrahlungsintensitäten kein RecA-Protein mehr induziert. Das Signal nahm sogar in der Intensität ab.

Dieser Befund deutet auf eine erhöhte Stabilität des RecA-Proteins im Vergleich zu Restproteinen im Gesamtextrakt hin. Während der Gehalt anderer Proteine bei besonders langen Dunkelphasen in Leitungswasser möglicherweise abnimmt, erhöhen sich dadurch die Anteile stabiler exprimierter RecA-Proteine in der aufgetragenen Gesamtmenge von 5 µg Protein der unbehandelten Probe.

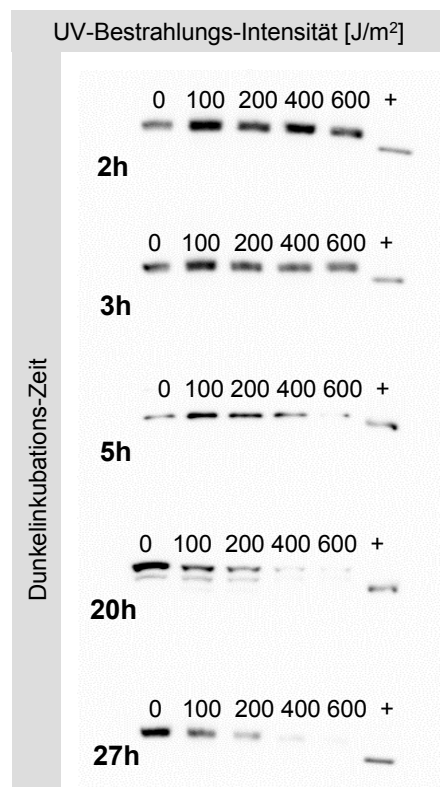


Abb. 4. 24: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Pseudomonas aeruginosa*. Untersucht wurde die Zelldichte (OD₆₀₀) 0,2 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungen (0 und 100 - 600 J/m²) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h). RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. (+): RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

Es ist anzumerken, dass nach 20 h und 27 h eine „obere“ Bande (bei ca. 47 kDa) bei der unbehandelten Probe deutlich zu sehen ist. Die „untere“ Bande (bei ca. 40 kDa), die nach 2, 3 und 6 h Dunkelinkubation detektiert wurde, ist nach 20 h noch schwach zu erkennen, nach 27h kann sie nicht mehr detektiert werden. Der Antikörper, der für das RecA-Protein spezifisch ist, erkennt bei *Pseudomonas aeruginosa* zwei Banden auf unterschiedlicher Höhe, ein Phänomen, das in der Literatur beschrieben ist (Miller und Kokjohn, 1988, Kriufov et al., 1990, Sano und Kageyama, 1987, Booth et al., 2001 a).

Untersucht wurden auch unterschiedliche Zelldichten bei OD₆₀₀ von 0,05, 0,1 und 0,2 von *Pseudomonas aeruginosa*. Nach unterschiedlicher UV-Bestrahlung (unbehandelt und behandelt mit 100 bis 600 J/m²) und nach zweistündiger Inkubation im Dunkeln wurden Zellextrakte erstellt und Gesamt-Protein gemessen. Der Gehalt an Gesamt-Protein (siehe Anhang Tab. P2) war in Abhängigkeit der optischen Dichte der Bakterien unterschiedlich hoch, änderte sich aber im Hinblick auf die unterschiedlichen Behandlungen der Proben (unbehandelt oder mit UV bestrahlt) nicht signifikant.

Die Western Blot-Analyse ist in Abbildung 4.25 A gezeigt. Auf der linken Seite sind von oben nach unten die Zelldichten (OD₆₀₀) angegeben. Die Bestrahlungsintensitäten nehmen von links nach rechts zu. Bei einer OD₆₀₀ von 0,05 waren nur sehr schwache RecA-spezifische Banden zu erkennen, während bei einer OD₆₀₀ von 0,1 eine deutliche Bande bei 500 J/m² zu erkennen war. Bei einer optischen Dichte von 0,2 wurde nach allen Bestrahlungen eine deutliche Induktion von RecA-Protein detektiert, während die unbehandelte Probe nur ein schwaches Signal zeigte. Hier wurden auch jeweils zwei Banden unterschiedlicher Größe detektiert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die RecA-Induktion von der Bakteriendichte abhängig ist.

Eine zusätzliche Untersuchung wurde zur Akklimatisierung von Bakterien an Leitungswasser vor der UV-Bestrahlung gemacht. Nach der Überführung der *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen (exponentielle Phase) in steriles Leitungswasser wurden diese nicht sofort weiter behandelt, sondern vor der UV-Bestrahlung 18 h im Leitungswasser inkubiert, so dass sie sich an dieses Habitat akklimatisieren konnten. Nach 18 h in Leitungswasser wurde eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und die Bakterien mit UV-Licht unterschiedlicher Intensität bestrahlt. Nach 2 h Inkubation im Dunkeln wurde ein Gesamt-Zellextrakt erstellt und die Menge an Gesamtprotein gemessen (Tab. P2, Anhang). Bei allen Proben, unbehandelt oder behandelt mit UV-Strahlung, lag der Gesamt-Proteingehalt zwischen 405 und 440 µg/mL und änderte sich nicht deutlich zwischen den unterschiedlichen Behandlungen. 5 µg Gesamt-Protein wurde in die SDS-PAGE eingesetzt und über das Western Blot-Verfahren mit dem Antikörper ARM414 untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.25 B gezeigt. Hier wurden deutliche RecA-Protein-Signale bei 400,

500 und 600 J/m² detektiert, die unbehandelte Probe und die Proben bei 100 und 200 J/m² zeigten kein RecA-Protein-Signal.

Diese zusätzlichen Experimente belegten, dass die hier üblicherweise eingesetzten Rahmenbedingungen vor der eigentlichen UV-Bestrahlung und nachfolgenden Dunkelinkubation keinen Einfluss auf die Genexpression zeigten.

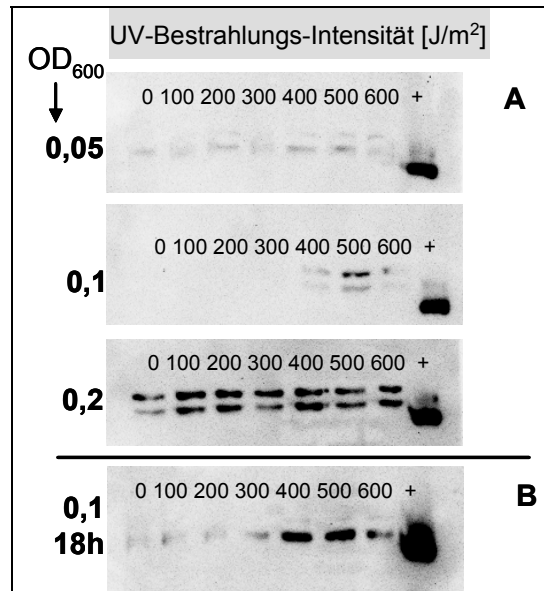


Abb. 4. 25: Western Blot-Analyse von Gesamtprotein von *Pseudomonas aeruginosa*. Untersucht wurden die Zelldichten (OD₆₀₀) 0,05, 0,1 und 0,2. Nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 100 - 600 J/m²) und einer Dunkelinkubationszeit von 2 h. A: Bestrahlung der Bakterien nach Überführung in steriles Leitungswasser. B: Bestrahlung nach 18 h Inkubation in sterilem Leitungswasser. RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. (+): RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

4.3.2 UV-Bestrahlung und spezifische Genexpression in *Enterococcus faecium*

Northern Blot-Hybridisierung

Mit den Primern rAEntF und rAEntR (siehe Tab. 4.1), die für das *recA*-Gen von Enterokokken spezifisch sind, konnte eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt werden, mit der *recA*-mRNA über das Northern Blot-Verfahren detektiert werden konnte.

Nach UV-Bestrahlung von *Enterococcus faecium* mit einer Zelldichte von OD₆₀₀=0,2 und unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten von 2 – 27 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und photometrisch gemessen. Die Werte eines solchen Versuchs sind in der Tabelle 4.16 angegeben. Insgesamt wurden hier zwischen 130 und 240 µg/mL Gesamt-RNA isoliert. Das Verhältnis von 260 und 280 nm ergab Werte zwischen 1,8 und 1,9, was eine hohe Reinheit der isolierten RNA widerspiegelt. Zwischen unterschiedlicher Behandlung der Proben und isolierter RNA-Menge steht kein direkter Zusammenhang.

Tab. 4. 16: RNA-Konzentration aus *Enterococcus faecium* mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2. Die Kulturen wurden mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 100 - 600 J/m^2) bestrahlt und unterschiedlich lang im Dunkeln inkubiert (2 – 27 h). Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind angegeben. Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben. n.g. = nicht gemessen.

UV [J/m^2]	MW [$\mu g/mL$]	SD	260/280 nm
2h			
0	21,925 (4)	0,171	1,839
100	17,433 (3)	0,115	1,752
200	10,100 (3)	0,173	1,814
400	13,333 (3)	0,289	1,878
600	16,467 (3)	0,153	1,848
3h			
0	17,967 (6)	0,137	1,867
100	15,767 (3)	0,153	1,841
200	17,167 (3)	0,153	1,871
400	16,467 (3)	0,153	n.g.
600	16,233 (3)	0,252	n.g.
5h			
0	19,740 (5)	0,365	1,857
100	18,467 (3)	0,153	1,863
200	12,900 (3)	0,400	1,841
400	16,675 (4)	0,287	1,883
600	18,800 (3)	0,173	1,858
20h			
0	21,600 (3)	0,100	1,895
100	24,800 (3)	0,100	1,891
200	19,500 (3)	0,173	1,899
400	20,350 (4)	0,289	1,897
600	24,933 (3)	0,153	n.g.
27h			
0	13,875 (4)	0,250	1,891
100	16,367 (3)	0,231	1,899
200	18,267 (3)	0,153	1,862
400	15,867 (3)	0,231	1,887
600	16,133 (3)	0,306	1,829

Für die Northern Blot-Hybridisierung wurden jeweils 1 μg Gesamt-RNA aus *Enterococcus faecium* eingesetzt. In Abbildung 4.26 sind die Ergebnisse von zwei Versuchsreihen gezeigt. Von links nach rechts sind jeweils die Dunkelinkubationszeiten angegeben, von oben nach unten wurden die unbehandelte Probe und die mit UV-bestrahlten Proben von 100 bis 600 J/m^2 aufgetragen. Bei diesen Versuchen wurde *recA*-mRNA auf dem Blot mit der spezifischen DIG-markierten *recA*-Sonde sowohl bei der unbehandelten Probe als auch bei den mit UV-Strahlung behandelten Proben detektiert. Teilweise wurden stärkere *recA*-mRNA-Signale detektiert, dennoch wurde die Expression des *recA*-Gens nicht deutlich induziert. Diese Versuche wurden mehrere Male wiederholt, es konnte jedoch kein deutliches Expressions- bzw. Induktionsmuster für *recA*-mRNA erkannt werden.

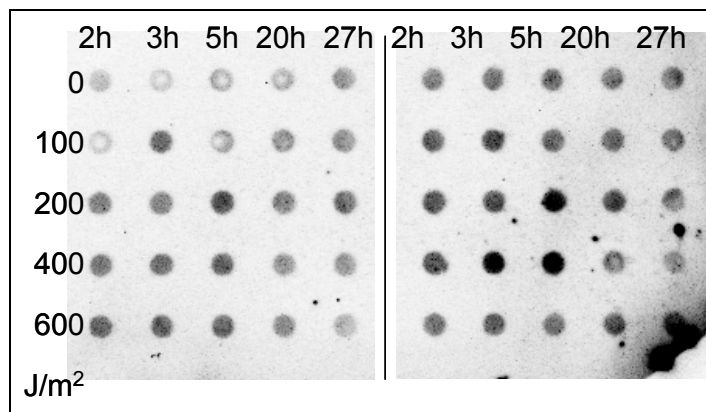


Abb. 4. 26: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Enterococcus faecium* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Die Proben sind doppelt aufgetragen. *recA*-mRNA wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *recA*-Sonde (rAEnt) detektiert. Unterschiedliche UV-Bestrahlungen (0 und 100 – 600 J/m^2) und Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h).

Genexpressionsanalysen mittels reverser Transkription und TaqMan-PCR

Mit Hilfe der reversen Transkription und der Real Time-PCR wurde ein anderes Verfahren zur Analyse der *recA*-mRNA nach UV-Bestrahlung von *Enterococcus faecium* angewandt.

Nach Umschreiben der mRNA in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase und dem Rückwärtsprimer rAEntR (Tab. 4.1) konnte quantitativ die Genexpression von *recA*-cDNA von *Enterococcus faecium* mittels Real Time-PCR bestimmt werden. Das für *Enterococcus faecium* in silico entwickelte „Primer/ Probe“-System TQrAEnt F/R/P (Tab. 4.2) war spezifisch für *recA*-cDNA und geeignet für die TaqMan-Versuche. Eine *Enterococcus faecium*-Kultur mit einer OD_{600} von 0,2 wurde mit unterschiedlichen UV-Intensitäten behandelt und vor der RNA-Extraktion unterschiedlich lange (2 h - 27 h) im Dunkeln inkubiert. Die Ergebnisse eines TaqMan-Laufes sind in Tabelle 4.17 dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte mit Standardabweichung (SD), Mittelwert (MW) und die daraus resultierenden ΔCt -Werte. Es wurde gezeigt, dass sich nach allen Dunkelinkubationszeiten die Ct-Werte nicht deutlich änderten. Die Ct-Werte lagen nach 2 h, 3 h und 5 h bei ungefähr 27. Nach 20 h und 27 h lagen die Ct-Werte bei ca. 30. Es konnte keine spezifische Induktion nach keiner UV-Bestrahlung detektiert werden. Jedoch wurde eine Grundexpression nach allen UV-Bestrahlungen gezeigt. Diese Ergebnisse korrelierten teilweise mit den Ergebnissen der Northern Blot-Analyse, bei denen mRNA direkt untersucht wurde.

Western Blot-Analysen

Die Proteinausbeute in den Gesamt-Extrakten von *Enterococcus faecium* sind in Tabelle P3-P4 im Anhang dargestellt. Bei einer OD_{600} von 0,2 wurden abhängig von der Versuchsreihe 500 bis 800 $\mu\text{g/ml}$ Protein isoliert, bzw. 230 bis 600 $\mu\text{g/mL}$. Es besteht kein deutlicher Zusammenhang zwischen UV-Bestrahlungsintensität, Inkubationsdauer und Proteingehalt der Probe. Zwei Versuchsreihen zeigen einen leichten Rückgang des Proteingehalts mit der Inkubationszeit.

Die Abbildung 4.27 zeigt das Western Blot-Ergebnis einer Versuchsreihe mit *Enterococcus faecium* mit einer OD_{600} von 0,2. Nach Überführen der Bakterien in steriles Leitungswasser und anschließender UV-Bestrahlung wurden die Proben unterschiedlich lange (2 – 27 h) bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Aus dem Zellextrakt wurden 10 μg Gesamt-Protein in die SDS-PAGE eingesetzt. Das RecA-Protein konnte über das Western Blot-Verfahren mit dem Antikörper ARM414 nachgewiesen werden. Von oben nach unten in der Abbildung angegeben sind die Dunkelinkubationszeiten, von links nach rechts die ansteigenden Bestrahlungsintensitäten von 0 bis 600 J/m^2 . Als Positivkontrolle wurde Gesamt-Protein von *Caulobacter crescentus* verwendet, das einen hohen Anteil an RecA-Protein besaß. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Bakterien wurde das RecA-Protein bei *Enterococcus faecium* zeitverzögert detektiert. Nach 2 h und 3 h Dunkelinkubation wurde trotz einer *recA*-spezifischen mRNA-Grundexpression noch kein RecA-spezifisches Signal detektiert. Frühestens nach 6 h Dunkelinkubation wurde eine Erhöhung des RecA-Proteins verzeichnet. Nach 20 h und 27 h wurden die stärksten RecA-Signale detektiert. Eine Grundexpression von RecA-Protein war nach 20 h und 27 h in der unbehandelten Probe zu detektieren. Man erkennt nach UV-Behandlung deutliche Induktionen der RecA-Proteine, vor allem bei 400 und 600 J/m^2 . Hier ist der Anteil an RecA-Protein in der Menge an eingesetztem Gesamt-Protein höher.

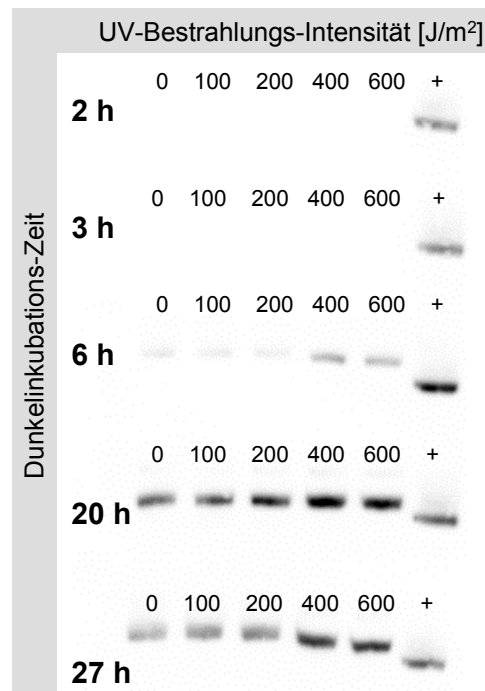


Abb. 4. 27: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Enterococcus faecium*. Untersucht wurde die Zelldichte (OD_{600}) 0,2 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 100 - 600 J/m^2) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h). RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. (+) = RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

Erhöhung der Dunkelinkubationszeit auf 44 h parallel zu Kultivierungsexperimenten

Die Dunkelinkubationszeit wurde in einem weiteren Versuch mit *Enterococcus faecium* auf 44 h verlängert. Wieder wurden Bakterien einer OD_{600} von 0,2 untersucht. Zum einen wurde *Enterococcus faecium* unbehandelt untersucht, zum anderen wurde die Kultur mit 400 J/m^2 bestrahlt. Parallel zu einer Verdünnungsreihe im Plattengussverfahren mit anschließender Auszählung der KBE (Tab. 4.18) wurden RNA und Proteine extrahiert.

In Tabelle 4.18 sind die Ergebnisse der KBE-Untersuchungen dargestellt. Es wurden Verdünnungen von 10^{-1} - 10^{-8} von einer unbehandelten und einer UV-bestrahlten (400 J/m^2) Bakterien-Kultur erstellt. Jeweils 1 mL der Verdünnungen wurde im Plattengussverfahren mit KAA-Agar untersucht. In der Tabelle sind die Verdünnungen (V: 10^{-1} - 10^{-8}) von oben nach unten aufgetragen. Von links nach rechts sind die Dunkelinkubationszeiten mit den jeweiligen Doppelbestimmungen (nach 44 h: Einfachbestimmung) der unbestrahlten Probe (0) und der mit 400 J/m^2 bestrahlten Probe (400) angegeben. Aus der Tabelle 4.18 wird deutlich, dass die Kolonienbildenden Einheiten (KBE) bei Verlängerung der Dunkelinkubationszeit sowohl bei unbehandelten als auch bei bestrahlten Kulturen abnehmen. Nach 22 h, 27 h und 44 h blieben die Zellzahlen in unbehandeltem Zustand relativ konstant. Bei den mit 400 J/m^2 bestrahlten Proben wuchsen nach 22 h Dunkelinkubation zunächst keine Kolonien mehr. Nach verlängerten

Dunkelinkubationszeiten von 27 h und 44 h wurden jedoch wieder Enterokokken-Kolonien trotz UV-Bestrahlung nachgewiesen.

Tab. 4. 18: KBE-Bestimmung von *Enterococcus faecium*. Untersucht wurde eine Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2, einmal unbehandelt (0) und einmal UV-bestrahlt mit 400 J/m^2 (400). Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen $10^{-1} - 10^{-8}$ (-1 bis -8).

V	2h				22h				27h				44h	
	0		400		0		400		0		400		0	400
-1	∞	∞	116	118	>1000	>1000	-	-	>1000	>1000	13	8	>1000	4
-2	∞	∞	14	6	389	365	-	-	352	306	1	-	258	1
-3	∞	∞	1	-	30	43	-	-	41	35	-	-	23	-
-4	>1000	>1000	-	-	5	-	-	-	2	6	-	-	3	-
-5	249	220	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
-6	22	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Diese Kultivierungsexperimente unterstreichen zunächst die effektive UV-Inaktivierung von *Enterococcus faecium*, zeigen aber gleichzeitig, dass sich bei ausreichend langer Dunkelinkubation *Enterococcus faecium* regenerieren kann und damit wieder kultivierbar wird.

Parallel zu den KBE-Untersuchungen wurde in dieser Versuchsreihe auch das RecA-Protein untersucht. Nach den jeweiligen Dunkelinkubationszeiten wurden Zellextrakte erstellt und der Gesamt-Gehalt der Proteine bestimmt. Die Proteingehalte lagen zwischen 570 und $270 \mu\text{g/mL}$ (Tabelle P5 im Anhang).

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abbildung 4.28 gezeigt. Aufgetragen wurden jeweils $5 \mu\text{g}$ Gesamtprotein der unbestrahlten (0) und der mit 400 J/m^2 UV-bestrahlten (400) Probe (in Abb. 4.28 unten angegeben) mit den zunehmenden Dunkelinkubationszeiten von links nach rechts. Nach 22 h, 27 h und 44 h wurden deutliche RecA-Signale detektiert, sowohl bei der unbehandelten, als auch bei der mit 400 J/m^2 behandelten Probe. Das Signal der mit UV-Licht behandelte Probe (400) scheint bei 27 und 44 h etwas stärker zu sein als die unbehandelte Probe (0). Bei der Bestimmung der KBE konnten nach 22 h keine Kolonien mehr nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich auf Proteinebene eine deutliche RecA-Bande. Bei verlängerter Dunkelinkubation von 27 h und 44 h wurden einerseits Enterokokken-Kolonien wieder nachgewiesen und andererseits deutliche RecA-Proteinkonzentrationen detektiert.

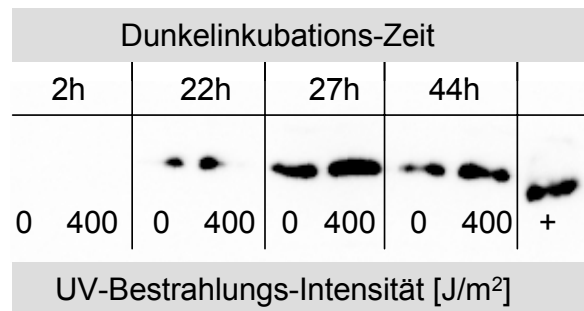


Abb. 4. 28: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Enterococcus faecium* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Untersucht wurden unbehandelte Proben (0) und Proben nach 400 J/m^2 UV-Bestrahlung nach unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h). Es wurden 5 μg Gesamt-Protein untersucht. RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. (+) = RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

4.4 UV-Bestrahlung und *Quorum sensing*-regulierte Gene in *Pseudomonas aeruginosa*

Zusätzlich zum *recA*-Gen und dem 16S rDNA - „housekeeping“-Gen (EUB338) wurde bei *Pseudomonas aeruginosa* die Expression von Genen untersucht, die beim *Quorum sensing* (QS) eine wichtige Rolle spielen. QS ist ein Begriff für bakterielle Zell-Zell-Kommunikationssysteme, die die Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte koordinieren. Durch diffusionsfähige Signalmoleküle (Autoinducer), wie z.B. N-Acetyl-Homoserin-Lactone, werden diese QS-Gene reguliert. Da QS besonders für die Biofilmbildung von Bedeutung ist, wurden Genexpressionsanalysen bei dem Biofilmbildner *Pseudomonas aeruginosa* untersucht.

Ziel war es, den Einfluss der UV-Bestrahlung und der nachfolgenden Induktion des SOS-Systems auf die Biofilmbildung und das QS-System zu untersuchen. Analysiert wurden die verschiedene QS-Gene (*lasI*, *lasR* und *vsmR*) und das Gen PA4296, das Teil des *Pseudomonas aeruginosa* spezifischen „Two component regulation system“ (2CS) ist. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Im folgenden Versuch wurde die Gesamt-RNA einer *Pseudomonas aeruginosa*-Kultur mit der OD_{600} von 0,16 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungen (0 – 600 J/m^2) und einer Dunkelinkubationszeit von 2 h untersucht.

In Tabelle 4.19 sind die Ergebnisse der Real Time-PCR der cDNA von *Pseudomonas aeruginosa* mit den Systemen *lasI* und PA4296 parallel zu *recA* und EUB338 gezeigt. 50 ng Gesamt-RNA wurde mit der reversen Transkription und dem für das jeweilige Gen passenden Rückwärtsprimer in cDNA umgeschrieben. Für jedes Gen sind die Ct-Werte mit Standardabweichung und Mittelwert angegeben. Für das *recA*-Gen wurde zusätzlich der ΔCt -Wert und der Induktionsfaktor (IF) aufgeführt.

Für *recA* (TQrAPs-System) wurde eine deutliche Induktion nach Bestrahlung mit UV bis zu 600 J/m² detektiert. Die unbehandelte Probe zeigte einen Ct-Wert von 22,16. Nach Behandlung mit 100 J/m² ergab sich die größte Induktion mit einem Ct-Wert von 19,58 und einem Induktionsfaktor von 5,96. Bis zu 600 J/m² konnte eine Induktion der *recA*-Expression detektiert werden.

Beim EUB338-System war die Genexpression nach unterschiedlichen Bestrahlungen mit UV gleichbleibend, wie es bei dem „*housekeeping*“-Gen erwartet wurde. Die Ct-Werte lagen in einem Bereich von 15. Der Anteil an 16S-Genprodukt war also in der eingesetzten Gesamt-RNA mehr vorhanden als das *recA*-Genprodukt.

Sowohl bei dem QS-Gen *lasI* als auch bei dem 2CS-Gen PA4296 wurde keine Induktion nach Behandlung mit UV detektiert. Die Ct-Werte der unbehandelten Proben lagen bei 24,6 und 24,2, d.h. im Vergleich zu *recA* waren diese beiden Gene weniger stark exprimiert. Mit erhöhter UV-Intensität ging deren Expression zurück. Bei 600 J/m² lagen diese Ct-Werte bei 26,4 und 26,3. Zusätzlich wurden die QS-Gene *lasR* und *vsmR* untersucht (nicht gezeigt). Aber auch bei diesen Genen waren keine Induktionen nach Behandlung mit UV nachzuweisen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass das QS-Regulon durch die UV-Bestrahlung bzw. durch die *recA*-abhängige Regulation in Bakterienzellen von *Pseudomonas aeruginosa* nicht beeinflusst wird.

Tab. 4. 19: Real Time-PCR von cDNA von *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,16 und mit verschiedenen QS-TaqMan-Systemen (*lasI*, PA4296) und den Systemen EUB338 (16S) und TQrAPs (*recA*). Unterschiedliche UV-Behandlung (0 und 100 - 600 J/m^2) nach 2 h Dunkelinkubation. MW: Mittelwert. SD: Standardabweichung. NTC: Negativ-Kontrolle. IF: Induktionsfaktor. n.d.: nicht detektiert.

UV [J/m^2]	EUB338			LasI			PA4296			TQrAPs								
	CT	MW Ct	Δ Ct	SD	CT	MW Ct	Δ Ct	SD	CT	MW Ct	Δ Ct	SD	CT	MW Ct	Δ Ct	IF	SD	
0	15,28	15,28	-	0,002	24,62	24,655	-	0,052	24,12	24,165	-	0,065	22,29	22,155				0,189
	15,28				24,69				24,21				22,02					
100	14,91	14,93	-	0,032	24,97	25,035	-	0,091	25,98	25,775	-	0,286	19,64	19,58	2,575	5,96	0,09	0,09
	14,95				25,1				25,57				19,52					
200	15,13	15,085	-	0,058	25,67	25,81	-	0,199	25,86	25,87	-	0,018	19,85	19,81	2,345	5,08	0,055	0,055
	15,04				25,95				25,88				19,77					
300	14,74	14,765	-	0,03	26,2	26,305	-	0,145	25,99	26,01	-	0,024	20,2	19,96	2,195	4,58	0,342	0,342
	14,79				26,41				26,03				19,72					
400	15,13	14,97	-	0,225	26,11	26,125	-	0,023	25,98	26,03	-	0,066	20,5	20,57	1,585	3,00	0,1	0,1
	14,81				26,14				26,08				20,64					
500	15,03	15,045	-	0,021	26,37	26,425	-	0,075	26,19	26,22	-	0,042	21,28	21,23	0,925	1,90	0,07	0,07
	15,06				26,48				26,25				21,18					
600	15,25	15,26	-	0,012	26,25	26,39	-	0,204	26,31	26,25	-	0,085	22,06	21,805	0,35	1,27	0,361	0,361
	15,27				26,53				26,19				21,55					
NTC	36,94	36,76	-	0,259	n.d.		-		n.d.	-	-		37,39	37,275	-		0,163	0,163
	36,58				n.d.				n.d.				37,16					

4.5 Chemische Desinfektion und deren Einfluß auf *recA*-gesteuerte Reparatursysteme

Das Verhalten der *recA*-Genexpression bei Bakterien nach Behandlung mit dem in der Trinkwasseraufbereitung verwendeten chemischen Desinfektionsmittel Natriumhypochlorit (NaOCl) wurde untersucht. In der Trinkwasserverordnung ist vorgeschrieben, dass freies Chlor nach Abschluss der Aufbereitung in einem Konzentrationsbereich von 0,3 bis 0,1 mg/L vorhanden sein soll. Für die Versuche im Labor wurden den Bakterienkulturen NaOCl mit Chlor-Konzentrationen von 3, 0,3 und 0,03 mg/L zugesetzt. Gesamt-RNA und Gesamt-Protein wurden nach verschiedenen Dunkelinkubationszeiten isoliert, deren Gehalt gemessen und anhand der spezifischen *recA*-Nachweissysteme getestet.

Untersucht wurden die hygienisch relevanten Keime *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium*.

4.5.1 NaOCl-Behandlung und spezifische Genexpression in *Pseudomonas aeruginosa*

Northern Blot-Hybridisierung

Eine *Pseudomonas aeruginosa*-Kultur mit der OD₆₀₀ von 0,2 wurde mit den genannten NaOCl-Konzentrationen (3, 0,3 und 0,03 mg/L) behandelt und vor der Extraktion der RNA unterschiedlich lange im Dunkeln inkubiert (5 min bis 22 h). Die Gesamt-RNA-Gehalte sind in Tabelle 4.20 aufgeführt. Bei der höchsten Konzentration an eingesetztem Chlor, 3 mg/L (III), wurde die größte Menge an Gesamt-RNA isoliert. Die Standardabweichungen der gemessenen Proben waren z.T. sehr hoch. Die Reinheit der RNA, gegeben durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm, war hoch.

Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde auf eine Nylon-Membran geblottet. Mit der *Pseudomonas aeruginosa* spezifischen *recA*-Sonde, die aus den Primern rAPsF und rAPsR (Tab. 4.1) hergestellt wurde, wurde *recA*-mRNA nachgewiesen. Abbildung 4.29 zeigt die Northern Blot-Analyse der Gesamt-RNA von *Pseudomonas aeruginosa*. Im Teil A der Abbildung sind die mit NaOCl behandelten Proben nach 5 min, 15 min und 30 min Dunkelinkubation jeweils doppelt aufgetragen. Hier wurde mit den Chlor-Konzentrationen von 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und bei 30 min auch mit 0,03 mg/mL (III) behandelt. *recA*-mRNA wurde bei allen Proben gleichmäßig detektiert, eine Induktion nach Behandlung mit NaOCl konnte nicht nachgewiesen werden. Im Teil B der Abbildung sind die Dunkelinkubationszeiten (1 h – 22 h) von links nach rechts aufgetragen, die unbehandelte Probe und die NaOCl-behandelten Proben (I, II, III) sind von oben nach unten gezeigt. In der linken und der rechten Bildhälfte sind identische Proben

aufgetragen. Nach 1h Dunkelinkubation trat eine leichte Induktion bei den Chlor-Konzentrationen von 3 µg/L (I) und 0,3 µg/L (II) auf. Die übrigen Signale überstiegen jedoch nicht die Intensität der unbehandelten Probe, hatten also nicht mehr *recAmRNA*-Anteil in der Gesamt-RNA als die *recA*-Grundexpression der unbehandelten Probe.

Tab. 4. 20: RNA-Gehalt (1:10-Verdünnungen) aus *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2 nach verschiedenen NaOCL-Behandlungen (3 – 0,03 mg/L) und Dunkelinkubationszeiten (A: 5 min – 30 min; B: 1 h – 27 h). Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind angegeben. Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben.

A:

Konzentration aktives Chlor	MW [µg/mL]	SD	260/280nm
0	34,90(3)	0,100	1,864
5 min			
3 mg/L (I)	40,27(3)	0,231	1,826
0,3 mg/L (II)	30,93(3)	0,321	1,827
15 min			
3 mg/L (I)	31,57(3)	1,589	1,841
0,3 mg/L (II)	21,60(3)	0,000	1,837
30 min			
3 mg/L (I)	36,20(3)	0,265	1,843
0,3 mg/L (II)	25,03(3)	0,208	1,869
0,03 mg/L (III)	21,30(3)		1,831

B:

Konzentration aktives Chlor	MW (µg/ml)	SD	260/280 nm
0	9,43(4)	0,822	1,718
1h			
3 mg/L (I)	26,23(3)	0,153	1,847
0,3 mg/L (II)	8,16(5)	0,472	1,925
0,03 mg/L (III)	17,18(4)	0,525	1,888
2h			
3 mg/L (I)	18,13(3)	0,058	1,738
0,3 mg/L (II)	12,56(4)	0,580	1,843
0,03 mg/L (III)	12,63(3)	0,153	1,826
3,5h			
3 mg/L (I)	27,04(5)	1,560	1,872
0,3 mg/L (II)	9,57(3)	0,208	1,968
0,03 mg/L (III)	8,7(3)	0,100	2,057
27h			
3 mg/L (I)	27,2(3)	0,100	1,873
0,3 mg/L (II)	18,8(3)	0,300	1,966
0,03 mg/L (III)	16,87(3)	0,416	1,693

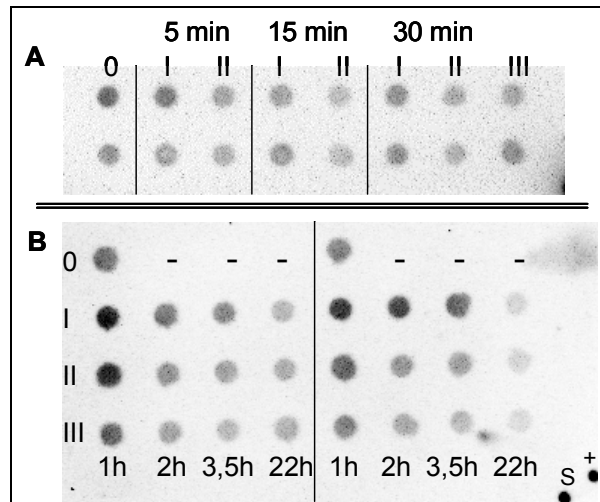


Abb. 4. 29: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Je 1 μ g wurde geblottet. *recA*-mRNA wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *recA*-Sonde (rAPs) detektiert. Unterschiedliche Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (5 min – 22 h). Die Proben sind doppelt aufgetragen. (+): denaturiertes *recA*-PCR Produkt, S: Sonde.

Western Blot-Analysen

Nach Behandlung mit verschiedenen NaOCl-Konzentrationen und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten wurde auch Gesamt-Protein isoliert und gemessen. In der Tabelle 4.21 sind die Werte des Gesamt-Proteingehalts von diesen Experimenten dargestellt. Die gemessenen Proteinkonzentrationen lagen bei Werten zwischen 305 und 622 μ g/mL. Es war kein deutlicher Zusammenhang zwischen Proteingehalt, NaOCl-Behandlung und Dunkelinkubationszeit erkennbar.

Die Ergebnisse einer Western Blot-Analyse der Proteine von *Pseudomonas aeruginosa* nach unterschiedlicher Behandlung mit NaOCl sind in Abbildung 4.30 gezeigt. Jeweils 5 μ g Gesamt-Protein wurde untersucht. In Teil A der Abbildung sind die Proben nach 5 min, 15 min und 30 min Dunkelinkubation aufgetragen. Im Gegensatz zur unbehandelten Probe (0) war keine Induktion von RecA-Protein nach Behandlung mit NaOCl zu erkennen. Teil B zeigt die Proben zwischen 1 h und 22 h Dunkelinkubation nach den unterschiedlichen NaOCl-Behandlungen (I, II, III). Hier zeigte die unbehandelte Probe ein stärkeres Signal als die unbehandelte Probe im oberen Bildabschnitt A, hat also einen deutlich höheren RecA-Protein-Anteil im Gesamt-Protein. Im Vergleich zur unbehandelten Probe zeigen die NaOCl-behandelten Proben keine Induktion von RecA-Protein. Die Proben nach 1 h sind von der Signalstärke vergleichbar mit der unbehandelten Probe. Nach 2 h, 4 h und 22 h nimmt die Signalstärke ab.

Tab. 4. 21: Proteingehalt von *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2, nach verschiedenen NaOCL-Behandlung (0, I, II, III) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (A: 5 min – 30 min und B: 1 h – 22 h). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (3er-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt sind angegeben. Regression der Eichgerade über BSA (A: $y = 0,0493x + 0,117$, $R^2 = 0,9969$; B: $y = 0,0499x + 0,1203$, $R^2 = 0,9964$).

A:

Konzentration aktives Chlor	MW Abs.	SD	Proteingehalt [$\mu\text{g/mL}$]
0	0,4135	0,001	616,74
5 min			
3 mg/L (I)	0,397	0,008	582,64
0,3 mg/L (II)	0,385	0,006	557,85
15 min			
3 mg/L (I)	0,381	0,001	549,59
0,3 mg/L (II)	0,3545	0,002	494,83
30 min			
3 mg/L (I)	0,3725	0,002	532,02
0,3 mg/L (II)	0,334	0,010	452,48
0,003 mg/L (III)	0,3805	0,001	548,55

B:

Konzentration aktives Chlor	MW Abs.	SD	Proteingehalt [$\mu\text{g/mL}$]
0	0,371	0,016	502,40
1h			
3 mg/L (I)	0,404	0,018	568,54
0,3 mg/L (II)	0,359	0,016	478,36
0,03 mg/L (III)	0,359	0,011	478,36
2h			
3 mg/L (I)	0,3895	0,022	539,48
0,3 mg/L (II)	0,2725	0,008	305,01
0,03 mg/L (III)	0,3085	0,023	377,15
3,5h			
3 mg/L (I)	0,447	0,003	654,71
0,3 mg/L (II)	0,3005	0,006	361,12
0,03 mg/L (III)	0,298	0,013	356,11
22h			
3 mg/L (I)	0,418	0,028	596,59
0,3 mg/L (II)	0,4275	0,012	605,85
0,03 mg/L (III)	0,436	0,000	622,98

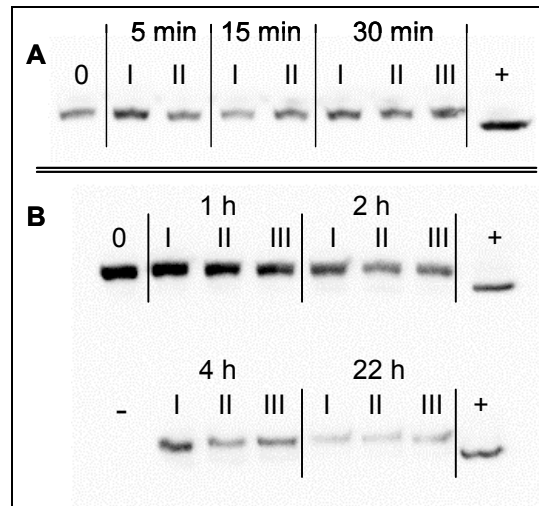


Abb. 4. 30: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Je 5 μ g Gesamt-Protein wurde untersucht. RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. Unterschiedliche Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (5 min – 22 h). (+) = RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

4.5.2 NaOCl-Behandlung und spezifische Genexpression in *Enterococcus faecium*

Northern Blot-Analysen

Enterococcus faecium wurde mit den gleichen Versuchsparemtern wie *Pseudomonas aeruginosa* mit NaOCl behandelt, 15 min bis 27 h im Dunkeln inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Die RNA-Gehalte sind in Tabelle 4.22 wiedergegeben. Es wurden zwischen 80 und 270 μ g/mL Gesamt-RNA isoliert.

Die Northern Blot-Analyse der RNA mit der *recA*-spezifischen Sonde für *Enterococcus faecium*, die mit den Primern rAEntF und rAEntR (Tab. 4.1) erstellt wurden, ist in Abb. 4.31 gezeigt. Von oben nach unten sind die Chlor-Konzentrationen (I, II, III) aufgetragen. Von links nach rechts steigen die Dunkelinkubationszeiten von 15 min bis 27 h an. Die Proben nach 15 min, 30 min, 1 h und 4 h Dunkelinkubation zeigen vor allem bei den Chlor-Konzentrationen 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) einen hohen Anteil an *recA*-mRNA in der Gesamt-RNA. Nach 21 und 27h ist das *recA*-mRNA-Signal schwächer. Jedoch kann man keine signifikante Induktion der *recA*-mRNA-Expression im Gegensatz zur unbehandelten Probe erkennen. Um dies zu überprüfen, wurde die RNA in der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und in der Real Time-PCR untersucht (s.u.).

Tab. 4. 22: RNA-Gehalt (1:10-Verdünnungen) von *Enterococcus faecium*-Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2 nach verschiedenen NaOCl-Behandlungen und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h). Mittelwert (MW) der gemessenen RNA-Werte und Standardabweichung (SD) sind angegeben. Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben.

Konzentration aktives Chlor	MW [$\mu\text{g/mL}$]	SD
0	22,800(4)	0,638
15 min		
3 mg/L (I)	17,167(3)	2,376
0,3 mg/L (II)	21,550(6)	0,404
0,03 mg/L (III)	22,333(3)	0,473
30 min		
3 mg/L (I)	14,000(3)	0,265
0,3 mg/L (II)	17,033(3)	0,252
0,03 mg/L (III)	12,320(5)	1,248
1 h		
3 mg/L (I)	14,750(4)	0,289
0,3 mg/L (II)	23,433(3)	0,115
0,03 mg/L (III)	20,167(3)	0,115
4 h		
3 mg/L (I)	12,533(3)	0,252
0,3 mg/L (II)	15,033(3)	0,115
0,03 mg/L (III)	11,933(3)	0,416
21 h		
3 mg/L (I)	8,767(3)	0,252
0,3 mg/L (II)	27,400(4)	5,314
0,03 mg/L (III)	19,100(6)	0,551
27 h		
3 mg/L (I)	18,033(3)	0,208
0,3 mg/L (II)	19,033(3)	0,208
0,03 mg/L (III)	22,733(3)	0,058

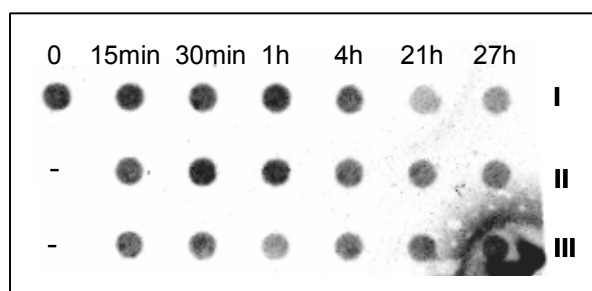


Abb. 4. 31: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von *Enterococcus faecium* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Nach unterschiedlichen Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h). Je 1 μg Gesamt-RNA wurde geblottet. *recA*-mRNA wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *recA*-Sonde (rAEnt) detektiert.

Genexpressionsanalyse mittels reverser Transkription und TaqMan-PCR

Die Ergebnisse der Real Time-PCR der cDNA, die aus der *recA*-mRNA von *Enterococcus faecium* (Abb. 4.30) stammten, sind in Tabelle 4.23 dargestellt. Aufgeführt sind die verschiedenen Dunkelinkubationszeiten von links nach rechts ansteigend und die NaOCl-Behandlungen von oben nach unten mit sinkender Konzentration. Es sind jeweils die Ct-Werte mit Standardabweichung (SD) und Mittelwert (MW) angegeben. Insgesamt wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den Ct-Werten während den einzelnen Dunkelinkubationszeiten festgestellt. Das bedeutet, dass keine Induktion der Expression von *recA*-mRNA nach Behandlung mit NaOCl zu verzeichnen war. Mit Zunahme der Dunkelinkubationszeit vergrößerte sich der Ct-Wert etwas, d.h. weniger *recA*-mRNA war in der Probe vorhanden. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis der Northern Blot-Analyse von *Enterococcus faecium* nach NaOCl-Behandlung (Abb. 4.30).

Western Blot-Analysen

Nach Behandlung mit verschiedenen NaOCl-Konzentrationen und unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten wurde *Enterococcus faecium* schließlich auch auf Proteinebene untersucht. Die Versuchsbedingungen sind die gleichen wie vorangehend beschrieben. Die optische Dichte (OD_{600}) der *Enterococcus faecium*-Kultur betrug 0,2. Vor der Erstellung des Zellextraktes wurden die Proben zwischen 15 min und 27 h im Dunkeln inkubiert. Tabelle 4.24 zeigt die Werte des Gesamt-Proteingehalts der Zellextrakte. Mit zunehmender Dauer der Dunkelinkubation ging der Proteingehalt ebenfalls zurück.

Tab. 4. 24: Proteingehalt von *Enterococcus faecium*-Kulturen mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2 nach verschiedenen NaOCl-Behandlungen (I, II, III) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt sind angegeben. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0524x + 0,119$, $R^2 = 0,9928$).

Konzentration aktives Chlor	MW Abs.	SD	Proteingehalt [$\mu\text{g/mL}$]
0	0,306	0,002	355,916
15 min			
3 mg/L (I)	0,215	0,005	182,252
0,3 mg/L (II)	0,366	0,008	470,420
0,03 mg/L (III)	0,357	0,012	453,244
30 min			
3 mg/L (I)	0,350	0,001	440,840
0,3 mg/L (II)	0,394	0,011	524,809
0,03 mg/L (III)	0,423	0,020	580,153
1 h			
3 mg/L (I)	0,181	0,001	118,436
0,3 mg/L (II)	0,388	0,016	512,405
0,03 mg/L (III)	0,353	0,009	445,611
4 h			
3 mg/L (I)	0,314	0,007	372,137
0,3 mg/L (II)	0,339	0,006	419,847
0,03 mg/L (III)	0,348	0,007	437,023
21 h			
3 mg/L (I)	0,272	0,006	291,031
0,3 mg/L (II)	0,329	0,004	399,809
0,03 mg/L (III)	0,314	0,008	372,137
27 h			
3 mg/L (I)	0,335	0,006	412,214
0,3 mg/L (II)	0,308	0,004	359,733
0,03 mg/L (III)	0,319	0,004	381,679

Das Ergebnis der Western Blot-Analyse der Proteine aus Tabelle 4.24 ist in Abbildung 4.32 gezeigt. Aufgetragen wurden jeweils 7,5 μg Gesamtprotein. Die mit den verschiedenen NaOCl-Konzentrationen (I, II, III) behandelten Proben sind in jeder Reihe von links nach rechts aufgeführt. Die jeweiligen Dunkelinkubationszeiten sind angegeben. Die unbehandelte Probe

(0) zeigte kein RecA-Signal. Auch nach 15 min, 30 min und 1 h Dunkelinkubation waren keine RecA-Signale zu detektieren. Erst nach 4 h Dunkelinkubation konnte RecA-Protein schwach detektiert werden. Nach 20 h war RecA deutlich nach Behandlung mit 0,03 mg/L zu erkennen, nach 27 h war nach allen NaOCl-Konzentrationen ein starkes RecA-Signal zu sehen.

Im Gegensatz zu den mRNA-Analysen von *Enterococcus faecium*, bei denen der Anteil *recA*-mRNA in der Gesamt-RNA mit ansteigender Dunkelinkubationszeit abnahm, wurde die Menge an RecA-Protein im Gesamt-Proteingehalt mit ansteigender Dunkelinkubationszeit deutlich erhöht.

Auch nach Behandlung von *Enterococcus faecium*-Kulturen mit dem chemischen Desinfektionsmittel NaOCl konnte eine verzögerte Bildung von RecA-Protein festgestellt werden, wie sie schon nach der Behandlung mit UV-Strahlung gezeigt werden konnte.

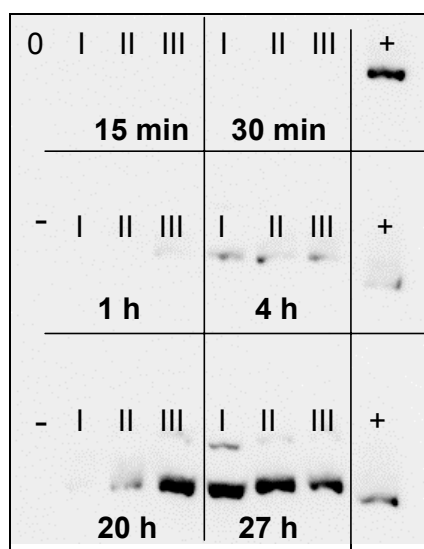


Abb. 4. 32: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von *Enterococcus faecium* mit einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,2. Je 7,5 μ g Gesamt-Protein wurde untersucht. RecA wurde mit einem spezifischen Antikörper ARM414 nachgewiesen. Unterschiedliche Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h). (+): RecA-Protein von *Caulobacter crescentus*.

Zusammenfassung der Versuche der chemischen Desinfektion

Die opportunistischen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* wurden nach Behandlung von Natriumhypochlorit (NaOCl) auf molekularbiologischer Ebene hinsichtlich des *recA*-Genproduktes untersucht. Die NaOCl-Konzentrationen lagen in dem Bereich, wie er in der Trinkwasserdesinfektion als Restkonzentrationsbereich (0,3 mg/L) vorgeschrieben wird.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* zeigte sich nach NaOCl-Behandlung und 2-stündiger Dunkelinkubation keine Induktion der Expression des *recA*-Gens oder der Bildung des RecA-Proteins. Nach UV-Bestrahlung war diese Induktion deutlich zu detektieren.

Bei *Enterococcus faecium* wurde nach NaOCl-Behandlung und 27 h Dunkelinkubation verstärkt RecA-Protein detektiert, vergleichbar mit den Ergebnissen der UV-Bestrahlungsversuche.

Jedoch sind die Ergebnisse dieser Versuche nicht direkt vergleichbar mit den Ergebnissen der UV-Bestrahlungs-Versuche. Grund dafür sind folgende Punkte:

- Die Art und Schwere der DNA-Schäden in den unterschiedlich behandelten Zellen (UV bzw. NaOCl) wurden nicht überprüft. Daher ist nicht klar, ob die Schäden nach UV-Bestrahlung und nach NaOCl-Behandlung vergleichbar groß waren.
- Es wurde nicht gemessen, ob und wie schnell das Chlor in dem Batch-Ansatz abgebaut wurde.
- Es wurde nicht gemessen, wieviel aktives Chlor nach 27 h vorhanden war.

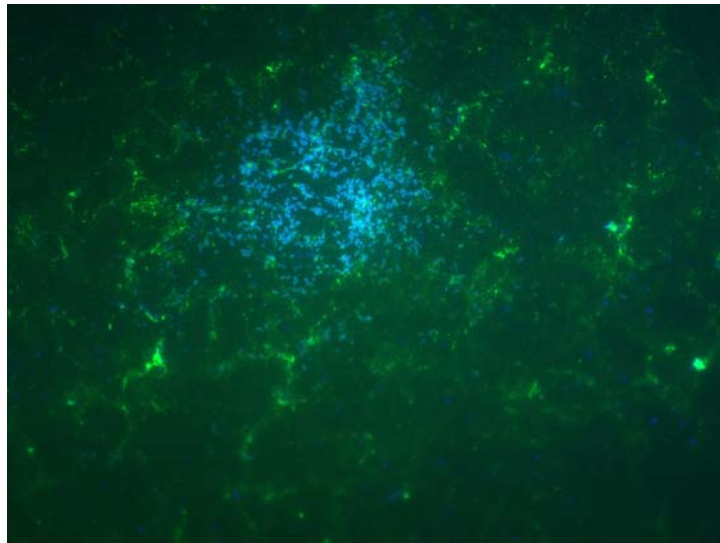
Somit müssen in Zukunft weitere Versuche durchgeführt werden, um einen direkten Vergleich zwischen unterschiedlichen Desinfektionsmethoden hinsichtlich der Dunkelreparatur in Bakterien zu ermöglichen.

4.6 Induktion der Dunkelreparatur bei adhärennten Bakterien

Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa* wurden über 7 Tage auf synthetischen Oberflächen kultiviert und diese mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten bestrahlt (200, 400, 600 J/m²). Die Biofilme wurden nach 2 h und 6 h Dunkelinkubation mit Zellschabern von der Oberfläche gelöst. Aus diesen Proben wurden Gesamt-RNA und Gesamt-Proteine isoliert. Die Messungen der RNA- und Proteinmenge wiesen große Konzentrationsschwankungen auf. Aufgrund dieser Unterschiede war es schwierig, vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu produzieren. Es wurden zwar Northern Blot-Hybridisierung, reverse Transkription mit anschließender Real Time-PCR und Western Blot-Analyse durchgeführt und sowohl *recA*-mRNA als auch RecA-Protein konnte nachgewiesen werden. Aber es konnten keine eindeutigen Aussagen über das Verhalten der *recA*/RecA-Expression gemacht werden. Vergleichbare Bestrahlungsexperimente können nur mit definierten Biofilmen (definierte Anzahl der Bakterien, Masse an EPS, Dicke des Biofilms) gemacht werden.

Parallel zu den Bestrahlungsversuchen wurden die *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilme mit DAPI und FITC-markiertem Lektin (Concanavalin A) gefärbt und mit dem Mikroskop untersucht. Die Abbildung 4.33 A und B zeigen Ausschnitte aus *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen. Blau angefärbt sind die mit DAPI-markierten *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterien, mit grün dargestellt wird die Lektin-markierte extrazelluläre polymere Substanz (EPS). Aus beiden Bildern wird deutlich, dass sich die Bakterien in dem Biofilm unterschiedlich verteilen. In Abbildung B sind die Bakterien gleichmäßig verteilt, während sie in Abbildung A punktuell gehäuft sind. Diese Tatsache macht die Reproduzierbarkeit der Bestrahlungsversuche schwierig.

A:



B:

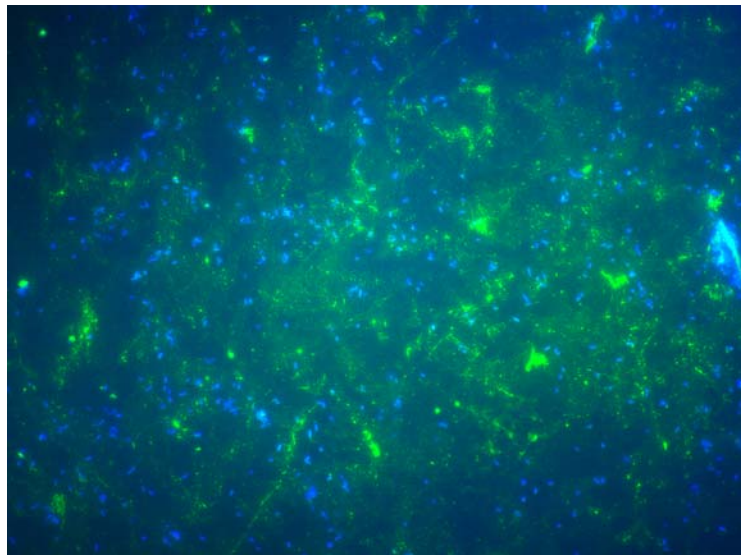


Abb. 4. 33: Mikroskopische Aufnahmen von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen. Blau: Bakterien angefärbt mit DAPI. Grün: EPS angefärbt mit FITC-ConA.

4.7 Übersicht zu den Ergebnissen

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst und unter A - E aufgelistet.

(√) = wurde erfolgreich etabliert/ durchgeführt.

A. DNA-Ebene: *recA*-Nachweissysteme; Primer/ Probe-Design:

Auf DNA-Ebene konnten für alle untersuchten Bakterien Primer über Datenbank-Recherchen und eigenen Sequenzierungen *in silico* entwickelt werden, die sehr spezifisch für *recA*-Gene verschiedener Bakterien waren. Mit diesen Primern wurden erfolgreich *recA*-Sequenzen amplifiziert und Digoxigenin-markierte Sonden für Genexpressionsanalysen erstellt. In der folgenden Tabelle sind kurz die in dieser Arbeit erstellten Nachweissysteme aufgelistet. Angegeben ist die Spezifität der Primersysteme für die PCR, die Sondenerstellung mit Digoxigenin und die durchgeführten Sequenzierungen.

Primer	PCR	Sonde	Sequenzierungen
rA2F/R	√ bei <i>Caulobacter crescentus</i> √ auch bei Umweltproben	√ für <i>Caulobacter crescentus</i>	<i>recA</i> und 16S von <i>Caulobacter crescentus</i>
rAcomF/R	√ bei <i>Aquabacterium commune</i>	√ für <i>Aquabacterium commune</i>	<i>recA</i> von <i>Aquabacterium commune</i>
rAPsF/R	√ bei Pseudomonaden bei Enterokokken √ auch bei Umweltproben	√ für Pseudomonaden	<i>recA</i> von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rAEntF/R	√ bei <i>Enterococcus faecium</i> und <i>Enterococcus faecalis</i>	√ für <i>Enterococcus faecium</i> und <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>recA</i> von <i>Enterococcus faecium</i>

B. RNA-Ebene: *recA*-mRNA-Analyse nach UV-Bestrahlung

Auf mRNA-Ebene konnte die Expression von *recA* über Northern Blot-Hybridisierung detektiert werden. Zur Quantifizierung der Expression konnte die *recA*-mRNA über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden und in der Real Time-PCR mit den neu entwickelten Primer/Probe-Systemen nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle faßt diese Versuchsergebnisse zusammen.

Bakterium	Sonde	Northern Blot-Analyse	TaqMan-System	reverse Transkription + Real Time-PCR
<i>Caulobacter crescentus</i>	√	Induktion in Abhängigkeit der Zelldichte bis zu 600 J/m ²	√	Induktion in Abhängigkeit von optischer Dichte bis zu 300 J/m ²
<i>Aquabacterium commune</i>	√	Induktion bei 100 J/m ²	n.b.	n.b.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	√	Induktion bis 600 J/m ²	√	Induktion bis 600 J/m ²
<i>Enterococcus faecium</i>	√	ohne Induktion; Grundexpression	√	ohne Induktion; Grundexpression

n.b.: nicht bearbeitet

C. Proteine-Ebene: RecA-Protein-Analyse nach UV-Bestrahlung

Auf Proteinebene konnte RecA über Western Blot-Analysen mit einem RecA-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

	ARM414	Western Blot-Analyse
<i>Caulobacter crescentus</i>	√	Induktion in Abhängigkeit von der Zelldichte, bis zu 600 J/m ² .
<i>Aquabacterium commune</i>	√	Induktion nach 100 J/m ² .
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	√	Induktion in Abhängigkeit von der Zelldichte, bis zu 600 J/m ² . Induktion bis 6 h Dunkelinkubation. Nach 20 und 27 h keine Induktion mehr erkennbar.
<i>Enterococcus faecium</i>	√	Späte Induktion. Früheste Induktion nach 6 h, stärkste Induktion nach 20 bis 27 h.

D. Untersuchungen der *Quorum sensing*-Gene bei *Pseudomonas aeruginosa* nach UV-Bestrahlung:

Die QS-Gene (*lasI*, *lasR*, *vsmR* und PA4296) wurden parallel zu *recA* und 16S rRNA mittels reverser Transkription und Real Time-PCR untersucht. Die Expression aller untersuchten QS-Gene wurde nach Bestrahlung mit UV nicht induziert bzw. nicht durch induzierte *recA*-Genprodukte beeinflusst.

E. NaOCl-Untersuchungen: *recA*-mRNA und RecA-Protein-Analysen nach Behandlung mit NaOCl

Zusätzliche Untersuchungen wurden mit den in dieser Arbeit entwickelten und etablierten *recA*/RecA-Nachweissystemen nach Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* mit NaOCl durchgeführt. Folgende Tabelle stellt die Ergebnisse zusammen.

Bakterium	Ergebnisse der Genexpressions-Untersuchungen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Keine deutliche Induktion von <i>recA</i> -mRNA und RecA-Protein nach Behandlung mit NaOCl.
<i>Enterococcus faecium</i>	Keine deutliche Induktion von <i>recA</i> -mRNA nach Behandlung mit NaOCl. RecA-Protein kann nach 20 und 27 h Dunkelinkubation detektiert werden.

5 Diskussion

Die UV-Desinfektion ist eine vielversprechende Alternative zur chemischen Desinfektion und findet bereits Anwendung in der Aufbereitung von Trinkwasser, Brauchwasser und Abwasser.

Ein kritischer Punkt in der Trinkwasseraufbereitung ist das Überleben und Wiederaufkeimen von planktonischen oder Biofilm-Bakterien nach der Desinfektionsbarriere. Einige Veröffentlichungen berichten über eine Passage von Bakterien durch natürliche und technische Filtersysteme, aber auch durch Desinfektionsbarrieren (Gauthier et al., 1999, Camper et al., 2003, Schwartz et al., 2003, Emtiazi et al., 2004, Wu et al., 2005).

Schwartz et al. (2003) berichteten von einem Unterschied in der Biofilmbildung im Verteilungssystem in Abhängigkeit von Chlordioxid-Desinfektion und UV-Desinfektion in einem Wasserwerk. Es wurde beobachtet, dass im Gegensatz zur chemischen Desinfektion nach der UV-Desinfektion die metabolische Aktivität der Bakterien in den Biofilmen deutlich erhöht war. Hygienisch relevante Bakterien wurden sporadisch nach UV-Desinfektion mittels molekularbiologischer Methoden gefunden. Diese Befunde gaben Anlass, molekulare Mechanismen zu untersuchen, die die schädigende Wirkung der UV-Bestrahlung limitieren.

Untersuchungen zu Reparaturmechanismen von Bakterien nach der UV-Desinfektion wurden bereits in früheren Arbeiten durchgeführt. Dabei stand die Photoreaktivierung im Mittelpunkt. Photoreaktivierung ist ein lichtinduzierter Mechanismus, der zelluläre DNA-Schäden repariert. Schoenen und Kolch (1992) beobachteten bei UV-bestrahlten *E. coli*-Zellen über Kultivierungsversuche, dass durch Licht der Wellenlänge 350 bis 600 nm die Photoreaktivierung induziert wurde, während bei UV-Desinfektionsversuchen mit nachfolgender Dunkelinkubation sich die Zahl der kultivierbaren Bakterien nicht änderte. Auch Tosa und Hirata (1999) bestätigten die Wirkung der Photoreaktivierung in verschiedenen *E. coli*-Stämmen nach UV-Bestrahlung über Kulturverfahren. Oguma et al. (2004) führten UV-Bestrahlungsversuche mit *Legionella pneumophila* durch und fanden über Kultivierungsmethoden heraus, dass *L. pneumophila* höhere Photoreaktivierungsraten hat als *E. coli*. „Endonuclease Sensitive Site (ESS)“-Tests wurden zur Messung der Anzahl der Pyrimidindimere durchgeführt, die als Produkt der UV-Bestrahlung die Replikation blockieren können (Oguma et al., 2002, 2004). Mit diesen Ansätzen konnten auch auf molekularer Ebene DNA-Zielregionen der Photoreaktivierung bei UV-Desinfektion detektiert werden. Zusätzlich wurde die Photoreaktivierung bei *E. coli* nach UV-Bestrahlung mit unterschiedlichen Lampen (Niederdruck- und Mitteldruckstrahler) untersucht (Zimmer und Slawson, 2002, Oguma et al., 2005), wobei die Mitteldruckstrahler am desinfektions-effektivsten waren, da hier geringere Photoreaktivierungsaktivität nachgewiesen wurde.

Dennoch beruht der überwiegende Anteil der bekannten Untersuchungen zur Reparatur von Bakterien nach UV-Bestrahlung auf mikrobiologischen Kulturverfahren, die auch zur mikrobiologischen Überwachung bei der Aufbereitung von Trinkwasser und im Verteilungsnetz angewandt werden. So werden Enterokokken und *Escherichia coli* als Indikatoren für fäkale Kontamination verwendet. Die Beurteilung mit Fäkalindikatoren ist aber nicht ohne weiteres auf andere Pathogene übertragbar, da diese in der Trinkwasseraufbereitung unterschiedlich gut erfasst werden. Weder diese noch die oftmals genutzte Kolonien-bildenden Einheiten (KBE)-Bestimmung für heterotrophe Bakterien (heterotrophic plate count; HPC) sind offenbar ausreichend für eine umfassende Beurteilung einer Desinfektionsmaßnahme. Es wurde gezeigt, dass einige Organismen (z.B. Mykobakterien, Viren, Giardia und deren Cysten, Cryptosporidium mit Oocysten) schwerer durch Aufbereitung und Desinfektion zu entfernen sind, als die genannten Indikator-Organismen. Nwachuku und Gerba (2004) fassen Faktoren zusammen, die bei Mikroorganismen auftreten können und ihre Elimination während der Trinkwasseraufbereitung deutlich minimieren. Wachsähnliche Zellwandbestandteile, Ausbildung von Dauerformen (Cysten, Sporen), doppelsträngige DNA bei Viren, kleine Genome, kleine Zellformen, Aggregate, Adhärenz an Partikel werden u.a. als relevant aufgeführt.

In den gängigen Verfahren zur routinemäßigen Überwachung der Desinfektion bleiben Bakterien unberücksichtigt, die nicht oder nur unzureichend über Kulturverfahren identifiziert werden. Dazu zählen:

- a) schwer kultivierbare Bakterien mit einer erhöhten natürlichen Toleranz gegenüber Desinfektionsmaßnahmen (Resistenz), wie z.B. Mykobakterien;
- b) Bakterien, die zum Zeitpunkt der Untersuchung lebend, aber nicht kultivierbar sind (VBNC-Stadium);
- c) Bakterien, die zwar durch die Desinfektion geschädigt, aber nicht dauerhaft inaktiviert sind.

In dieser Arbeit wurde daher die UV-Desinfektion im Hinblick auf die Fähigkeit vieler Bakterien zur Dunkelreparatur von UV-bedingten DNA-Schäden untersucht. Um die Reparaturmechanismen besser einschätzen und verstehen zu können, wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt.

Neben den Untersuchungen der Photoreaktivierung über das Enzym Photolyase sind die Dunkelreparaturmechanismen bei der Desinfektion von Trinkwasser und Brauchwasser bis jetzt noch wenig untersucht, obwohl dieser Weg der DNA-Reparatur auf molekularer Ebene bereits bekannt ist (Kuzminov, 1999) und Wiedererholungsmechanismen in Dunkelheit im Verteilungssystem wahrscheinlich sind. Die meisten Daten über den Dunkelreparaturmechanismus und das SOS-Reparatursystem sind für *E. coli* unter Laborbedingungen beschrieben. Jedoch gibt es nur wenige Daten bezüglich Dunkelreparatur

und Verhalten von Bakterien nach UV-Desinfektion im Bereich der Wasseraufbereitung. Bei den wenigen Versuchen in der Literatur, die Aktivität von Photoreaktivierung und Dunkelreparatur in Bakterien zu vergleichen, scheint die Dunkelreparatur im Gegensatz zur Photoreaktivierung eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sommer et al. (2000) gaben demzufolge der Photoreaktivierung mehr Bedeutung als der Dunkelreparatur. Die Regulation des Dunkelreparatur-Systems in Bakterien kommt aber dann in Systemen zum Tragen, in denen kein Licht vorhanden ist, und damit die lichtabhängige Photoreaktivierung zum Erliegen kommt. Da auch in Trinkwasserverteilungssystemen kein Licht vorhanden ist und hygienisch relevante Keime auch nach der UV-Desinfektionsbarriere auftreten können, ist es notwendig, mehr Informationen über den molekularen Zusammenhang gerade im Hinblick auf Dunkelreparatur zu erfahren, da hier die Datenlage sehr lückenhaft ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Dunkelreparaturmechanismen nach UV-Bestrahlung in ausgewählten Bakterien aus dem Trinkwasser und in Bakterien, die Kontaminationen im Trinkwasser anzeigen, untersucht. Verschiedene UV-Strahlungsintensitäten und Zelldichten wurden ausgewählt, um das Vorhandensein der spezifischen Genexpression von *recA*, dem wichtigsten Regulations-Gen der bakteriellen Dunkelreparatur und der SOS-Antwort auf verschiedene Stressfaktoren, sowie das Auftreten von RecA-Protein zu untersuchen.

Für das *recA*-Gen wurden für die untersuchten Bakterien *Caulobacter crescentus*, *Aquabacterium commune*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* spezifische Nachweissysteme zunächst *in silico* berechnet und dann im Experiment optimiert. Mit PCR-Verfahren konnten spezifische *recA*-Amplifikate erstellt werden. Die neu etablierten Verfahren wurden auch an natürlichen Proben (Biofilme aus Wasserwerken, Filterausläufe etc.) getestet. In der PCR konnten spezifische *recA*-Genprodukte nachgewiesen werden. Diese Versuche zeigten, dass mit den erstellten Nachweissystemen durchaus auch *recA* in Umweltproben nachgewiesen werden kann und die Möglichkeit besteht, bei ausreichender Biomasse (RNA-Gehalt) Genexpressionsanalysen direkt an Umweltproben durchzuführen. Biofilmuntersuchungen mit Probenmaterialien aus dem Wasserwerk zeigten zwar, dass die Zelldichte in Biofilmen für den DNA-Nachweis von *recA* ausreichte. Für Expressionsanalysen waren die RNA-Gehalte in den Biofilmen aufgrund der Oligotrophie im Trinkwasser noch zu gering.

Mit den *recA*-Primern konnten erfolgreich Digoxigenin-markierte Gen-Sonden erstellt werden, die der spezifischen Detektion der *recA*-mRNA über die Northern Blot-Hybridisierung dienen. Weiterhin wurde die Expression des konstitutiv exprimierten 16S ribosomalen Gens untersucht, um die Zuverlässigkeit der *recA*-Induktion nach UV-Bestrahlung im parallel durchgeführten Ansatz zu zeigen.

Die Expression der *recA*-spezifischen mRNA- und der RecA-spezifischen Protein-Synthese wurde in dieser Arbeit gezielt untersucht. Ihre UV-vermittelte Induktion wurde in den genannten unterschiedlichen Bakterien verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine Expression des *recA*-Gens in planktonischen Trinkwasserbakterien und opportunistischen Bakterien.

Es traten deutliche Unterschiede im Expressionsverhalten verschiedener Bakterien auf. Das untersuchte Trinkwasserbakterium *Caulobacter crescentus* zeigte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine Induktion der *recA*-Genexpression nach 400 J/m² und teilweise auch bei einer Bestrahlungsintensität von 600 J/m², die eigentlich als letal gelten sollte. Die Induktion bei *Aquabacterium commune*, einem weiterem Trinkwasserbakterium, wurde auf RNA- und Proteinebene nur bei Bestrahlungsintensitäten bis zu 100 J/m² deutlich detektiert. Gezeigt wurden diese Induktionen nach jeweils 2 h Inkubation der Zellen im Dunkeln. Schon bei diesen beiden Vertretern von Trinkwasserbakterien zeigten sich Spezies-spezifische Reaktionen auf die UV-Bestrahlung.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde auf RNA- und Proteinebene eine *recA*-Induktion bei Bestrahlungsintensitäten bis zu 600 J/m² und nach 2 h Dunkelinkubation detektiert. Bei verlängerten Dunkelinkubationszeiten wurde diese Induktion bis einschließlich 6 h nach der UV-Bestrahlung detektiert. Nach 20 h Dunkelinkubation wurde keine Induktion mehr gefunden. Im Gegensatz dazu wurde eine verzögerte Induktion der Dunkelreparatur auf Proteinebene in *Enterococcus faecium* nach frühestens 6 h und bis zu einer maximaler Expression nach 27 h und teilweise sogar noch nach 44 h Dunkelinkubation beobachtet. Bei all diesen Ergebnissen ist zu bemerken, dass sogar nach UV-Intensitäten höher als 400 J/m² *recA*-Genprodukt nachgewiesen werden konnte, obwohl 400 J/m² als Standard der Trinkwasserdesinfektion in Deutschland eingesetzt ist (DVGW, 2003).

Diese Ergebnisse zeigen die Unterschiede in der Regulation in Abhängigkeit von den Bakterien-Spezies. Unterschiede bei der Expression von *recA*-mRNA und der Bildung von RecA-Protein wurden bereits in der Literatur beschrieben. Untersuchungen mit *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium tuberculosis* zeigten ebenso Unterschiede in der Spezies-spezifischen Regulation. Bei *Bacillus subtilis* wurden schon nach 40 bis 90 Minuten Dunkelinkubationszeit RecA-Protein detektiert (Lovett et al., 1988, 1993). Bei *Mycobacterium smegmatis* wurde nach 1 h und maximal zwischen 3 und 6 h Dunkelinkubation RecA-Protein exprimiert, während in *Mycobacterium tuberculosis* eine schwache Induktion erst nach 6 h und dann eine deutliche Induktion ab 12 h mit einem Maximum der RecA-Expression zwischen 18 und 36 h ersichtlich war (Papavinasundaram et al., 2001). Vergleichbare Ergebnisse zur verzögerten Proteinexpression wurden auch bei Untersuchungen der *recA*-mRNA von *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt.

Diese grundlegenden Untersuchungen zum Verhalten von verschiedenen Mikroorganismen auf Desinfektionsmaßnahmen sollten zukünftig bei der Validierung von Desinfektionsverfahren berücksichtigt werden. Ein erweitertes Spektrum an Referenzbakterien bei der Überprüfung der Effizienz eines solchen Verfahrens für die Trinkwasseraufbereitung würde zu einer gesicherteren Aussage hinsichtlich der Abtötung hygienisch relevanter Mikroorganismen führen.

Auch wurden Unterschiede im *recA*-Gen-Expressionsverhalten bei den untersuchten Bakterien nach UV-Bestrahlung von unterschiedlichen Zelldichten deutlich. Je höher die Zelldichten waren, umso stärker konnte ein *recA*-mRNA- bzw. RecA-Protein-Signal detektiert werden, auch noch nach UV-Bestrahlungsintensitäten bis zu 600 J/m². Hohe Zelldichten können mit stark kontaminierten Wässern verglichen werden, während geringe Zelldichten Wässer mit niedriger Zellfracht darstellen. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass Bakterien in niedrig kontaminierten Wässern sensibler gegenüber UV-Bestrahlung sind, während hoch kontaminierte Wässer mehr bakterielles Reparaturpotential aufweisen.

In einigen Versuchen wurde *recA*-mRNA und speziell auch RecA-Protein bei höheren UV-Bestrahlungen wie 400 und 500 J/m² deutlicher stärker detektiert als *recA*-Genprodukte bei Proben mit niedrigeren UV-Bestrahlungen. Bei *Caulobacter crescentus* wurde dies auf Proteinebene bei unterschiedlichen Zelldichten beobachtet. *Aquabacterium commune* zeigte das Phänomen auf mRNA-Ebene. Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde die Verstärkung des Signals nach 400 und 500 J/m² von RecA-Protein bei Zelldichten mit einer OD₆₀₀ von 0,1 deutlich beobachtet. Auch bei Enterokokken wurde dieses Phänomen auf Proteinebene detektiert. Die Erklärung dieser Resultate ist in einem erhöhten zellulären Bedarf an *recA*-Genprodukten (mRNA, Protein) bei erhöhter UV-Bestrahlungsintensität zu suchen. Die normiert untersuchten RNA- und Proteinmengen in den Versuchsansätzen haben zur Folge, dass die *recA*-spezifischen Anteile im Vergleich zu den nicht-induzierten Genprodukten deutlich ansteigen, und damit verstärkte Signale in Nachweisverfahren bewirken. Im Hinblick auf den Standard-Bestrahlungswert der deutschen Norm von 400 J/m² sollten die Ergebnisse vor allem hinsichtlich der UV-Sensibilität bei Pathogenen diskutiert werden.

Bei Versuchen mit *Enterococcus faecium* konnte anhand der mRNA eine Grundexpression, aber keine eindeutige Induktion von *recA* nach Bestrahlung mit UV festgestellt werden. Über Northern Blot-Hybridisierung mit der *recA*-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde wurden keine deutlichen Expressionsmuster erkennbar. Es waren Unterschiede in den *recA*-mRNA-Intensitäten in den verschiedenen Versuchen vorhanden. Über ein Umschreiben der *recA*-mRNA in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase und anschließender Real Time-PCR konnte verifiziert werden, dass die *recA*-mRNA keine Induktion nach Behandlung mit UV zeigte,

sondern gleichmäßig eine Grundexpression besaß. Auf Protein-Ebene zeigte sich aber eine verzögerte Expression von RecA-Proteinen. Das bedeutet, dass *recA*-mRNA in den Zellen konstant vorlag, jedoch die RecA-Protein-Bildung als regulatorische Stufe in *Enterococcus faecium* funktionierte. Kultivierungsversuche belegen die Fähigkeit zur Reparatur von UV-Schädigungen nach Dunkelinkubation von 27 h. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf posttranslationale Modifikationen als Regulation der Dunkelreparatur bei *Enterococcus faecium*. Vermehrt werden posttranslationale Modifikationen für Regulationen in Bakterien beschrieben (Benz und Schmidt, 2002; Power und Jennings, 2003). Vor allem wird die Glykosilierung von bakteriellen Oberflächenproteinen als gängige posttranslationale Modifikation beobachtet, aber auch bei cytoplasmatischen Proteinen wurden posttranslationale Modifikationen festgestellt (Fischer und Haas, 2004).

Pseudomonas aeruginosa zeigte bei manchen Versuchen Doppelbanden im Nachweis von RecA-Protein mit dem spezifischen Antikörper ARM414. Eine höher molekulare Protein-Bande bei ca. 47 kDa und eine deutlich niedermolekulare Protein-Bande bei ca. 40 kDa wurden in verschiedenen Western Blot-Analysen detektiert. Ein ähnlich auftretendes Phänomen wurde auch von Booth et al. (2001 a) beschreiben, die mehrere Banden im Western Blot vom RecA-Protein bei *Escherichia coli* nachgewiesen haben. Aufgrund der hohen Homologie des RecA-Proteins von *P. aeruginosa* zu *E. coli* von 70% (Kruitov et al., 1990) kann man ähnlich wie bei *E. coli* die Proteindoppelbanden bei *P. aeruginosa* als Oxidationsprodukte oder Polymere des eigentlichen Proteins diskutieren. Miller und Kokjohn (1988) beschreiben das RecA-Protein von *P. aeruginosa* in der SDS-PAGE als 47 kDa großes Protein. Im Gegensatz zum Auftreten von Doppelbanden bei *P. aeruginosa* zeigten die anderen untersuchten Bakterienspezies nur eine spezifische Proteinbande nach Reaktion mit dem Antikörper.

In der Literatur werden Unterschiede in der UV-Sensitivität unterschiedlicher Bakterien, darunter auch Pathogene, beschrieben. Es sind hier gegensätzliche Daten zur Sensitivität und benötigten UV-Strahlungsdosis unterschiedlicher Bakterien zu finden, was an den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und der großen Variabilität der Organismen liegt (Hijnen et al., 2006, Clauß et al., 2005). Jedoch weiß man, dass zur Inaktivierung von verschiedenen gesundheitsschädigenden Bakterien, Viren und Protozoen um 4 Log-Stufen sehr unterschiedliche UV-Dosen angewendet werden müssen (Linden et al., 2002). Bei Untersuchungen von 8 verschiedenen pathogenen *E. coli*-Stämmen wurden große Unterschiede in der Sensitivität gegenüber UV-Strahlung gefunden (Sommer et al., 2000). Hinzu kommt, dass neue Krankheitserreger (Bakterien, Viren) als trinkwassergängig erkannt werden, bei denen die benötigte UV-Strahlungsdosis zur Abtötung nicht bekannt ist und die sich stark von den in der Trinkwasserverordnung aufgelisteten Indikator-Keimen unterscheiden

können (Schindler, 2004). Da die Unterschiede der Sensitivität gegenüber UV-Strahlung und der Möglichkeit zur Reparatur zwischen verschiedenen Bakterien sehr groß ist, ist es notwendig, opportunistische und pathogene Mikroorganismen individuell zu untersuchen.

Unterschiede in den molekularen Stressantworten werden in unterschiedlichen physiologischen Stadien von Bakterien beschrieben. Bei Untersuchungen mit verschiedenen Stressoren wurde beobachtet, dass in Laborexperimenten die Effizienz der Desinfektion von mikrobiellen Reinkulturen und Mischkulturen abhängig von einer Reihe physiologischer Charakteristika waren. Diese schließen das mikrobielle Wachstumsstadium, das Angebot von Nährstoffen, die Induktion von Stressproteinen bei Nährstoffmangel (starvation) und die Änderung in der Membranstruktur ein. Die Anwendung von Kultivierungs-basierenden mikrobiologischen Methoden zeigten auch hier die Grenzen für ein vollständiges Verstehen der Beziehung zwischen dem Aufbereitungsprozess und der Desinfektion in Umweltproben (Ponniah et al., 2003). Untersuchungen zeigten, dass Bakterien wie *E. coli*, *Enterococcus faecium* oder *Enterobacter cloacae* erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber UV-Strahlung speziell in der stationären Wachstumsphase haben (Kolch und Schoenen, 1994).

Einige Pathogene und fäkale Indikatorkeime können aufgrund ihrer Möglichkeit, verschiedene Arten von Überlebens-Strategien zu aktivieren, als lebensfähige Organismen in der natürlichen Umwelt persistieren (Signoretto et al., 2005). Solche Strategien sind z.B. die Adhäsion (Camper et al., 2003, Wu et al., 2005, Gauthier et al., 1999), die Bildung von Biofilmen (Wingender et al., 1998), und der Eintritt in das sogenannte „viable but nonculturable“-Stadium (VBNC) (Byrd et al., 1991, Lleò et al., 2005). Insgesamt sind diese bakteriellen Strategien relevant für die mögliche Überwindung von Barrieren (Untergrundpassagen, Filtration, Desinfektion) in der Trinkwasseraufbereitung.

Da mRNA als Informationsträger für Zellfunktion und –regulation in prokaryotischen Zellen sehr rasch synthetisiert aber auch gleichzeitig wieder abgebaut wird, wurde in dieser Arbeit speziell die Detektion der *recA*-mRNA auch als Indikator für die Lebensfähigkeit von Bakterien in Betracht gezogen. Die RNA-Experimente wiesen eine aktive Transkription der *recA*-mRNA auf und zeigten gleichzeitig anhand der RecA-Proteine eine aktive Translation von *recA*-mRNA zu RecA-Protein an. Im Vergleich mRNA – Protein ist aufgrund der höheren Turnover-Raten die mRNA als das geeignetere Biomolekül zum Anzeigen von Stoffwechselaktivitäten in Bakterien bzw. Vitalitätsmarker zu werten. Proteine oder Protein-abhängige Zellstrukturen werden dennoch häufig als Marker für Zellvitalität genutzt, obwohl deren Stabilität über den Zelltod hinaus noch andauern kann.

Kultivierungsexperimente mit UV-bestrahlten Enterokokken zeigten zunächst den Verlust der Vermehrungsfähigkeit, jedoch gleichzeitig eine bestehende Grundexpression von *recA*-mRNA

und einen erhöhten Level an RecA-Protein. Beides deutet trotz fehlender Kultivierbarkeit auf eine zelluläre Dunkelreparaturaktivität und damit Vitalität dieser Bakterien hin. Ein Übergang der Bakterien in das VBNC-Stadium (viable but nonculturable) erscheint hier wahrscheinlich. Bakterien in diesem physiologischen Stadium sind durch ihren Verlust an Kultivierbarkeit auf konventionellen Wachstums-Medien charakterisiert. Die Zellen behalten jedoch ihre Lebensfähigkeit und ihre potentielle Fähigkeit, Krankheiten zu verursachen, indem sie unter optimierten Bedingungen in das kultivierbare Stadium zurückkehren können. Lleò et al. (2005) zeigten, dass Oligotrophie einer der Hauptparameter ist, der die Inhibition der Teilungsfähigkeit und die Aktivierung von Überlebensstrategien als Antwort auf Stress auslöst. Gerade Enterokokken können auch durch andere Stressfaktoren wie Hitze, Säure, H₂O₂, Hyperosmolarität, Natriumhypochlorit und sogar UV-Bestrahlung in VBNC-Stadien fallen und damit Stressresistenzen entwickeln (Giard et al., 2004).

Die direkte Detektion von mRNA-Sequenzen wie *recA*-mRNA kann somit als Lebensfähigkeits-Test betrachtet werden, da die Expression trotz eines veränderten physiologischen Stadiums der Zelle nachgewiesenerweise stattfindet. Viele Autoren beschrieben Testverfahren für die bakterielle Lebensfähigkeit durch Messungen der Enzymaktivitäten, Membran-Integrität oder Reporter-Protein-Aktivitäten (Fiksdal und Tryland, 1999; Lehtinen et al., 2003). Es wurde aber deutlich, dass die Aussagekraft zur Vitalität der Zellen wegen der Stabilität der Zielstruktur (Membran) bzw. des Zielmoleküles (Protein) auch in bereits toten Zellen eingeschränkt wird. Villarino et al. (2003) führten Prolongations-Tests durch, bei denen unterschiedlich UV-behandelte Zellen auf Protein- und Peptidoglykan-Synthese untersucht wurden. D.h. hier wurde wieder eine Protein-abhängige metabolische Aktivität als Referenz-Parameter für die Lebensfähigkeit verwendet. Andere Untersuchungen führten spezifische Markierungen von DNA in toten Zellen mit Ethidiumbromid-Monoazid (EMA) durch (Wang und Levin, 2006). Das Prinzip basiert darauf, dass EMA die DNA nach Eindringen in die tote Zelle modifiziert, indem sie kovalent an ihr bindet. Als Konsequenz ist die DNA für die nachfolgende PCR-Amplifikation blockiert. Da in diesem Ansatz wiederum die Membran-Integrität der Zellen eine grundlegende Rolle für die Definition der Lebensfähigkeit spielt, muß erneut die Frage der Membranstabilität auch über den Zelltod hinaus gestellt werden.

Der Vorteil der mRNA-gerichteten Untersuchung zur Messung von Lebensfähigkeit, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, basiert auf den hohen Synthese- und Abbauraten und damit der Instabilität der mRNA in Bakterien. Während Protein-bezogene Nachweissysteme aufgrund der zeitlich längeren Stabilität der Zielmoleküle auch bei toten, nicht lysierten Zellen detektierbar sein können, ist die mRNA ein sehr spezifisches und sensibles Zielmolekül für die Lebensfähigkeit von Bakterien.

Aufgrund der Ergebnisse der vorgelegten Untersuchungen zur Dunkelreparatur bei ausgewählten Bakterien hat sich die Hypothese erhärtet, dass sich UV-geschädigte Bakterien im Trinkwasserverteilungssystem regenerieren können.

Die Erholung von planktonischen und Biofilm-Bakterien nach der Desinfektionsbarriere ist somit ein kritischer Punkt in der Aufbereitung von Trinkwasser. Trinkwasser ist meist frei von Trübung und Partikeln, wenn es nach den bestehenden Regeln behandelt und verteilt wird. Bei einigen Szenarien wie z.B. Hochwasser-beeinflusste Rohwässer oder Filterrückspülung können Partikel aufgeschwemmt und in einer reduzierten Desinfektionseffizienz für die an Partikel angelagerte Bakterien resultieren. Beispiele für das Vorkommen von Partikeln sind kleinste Aktivkohlefilterbestandteile, Goethit-Nadeln als partikuläre Eisenverbindungen, die sehr häufig bei Korrosionsereignissen im Trinkwasserverteilungssystem entstehen, Aggregatbildung von Bakterien, Makroinvertebraten oder Algen im Wasserwerk und im Verteilungssystem (Camper et al., 1986, LeChevallier et al., 1988, Gauthier et al., 1999, Camper et al., 2003, Wu et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass das Anlagern von Mikroorganismen an Oberflächen deren Physiologie ändert. Nährstoffe können besser aufgenommen werden. Außerdem sind sie im Gegensatz zu planktonischen Bakterien resistenter gegenüber Umweltstress wie Nährstoffmangel (starvation), Schwermetalle und Chlor (Herson et al., 1987, Wu et al., 2005). Es ist bekannt, dass Biofilme 10 – 1000 mal resistenter gegenüber antimikrobieller Agentien sind als planktonisch lebende Bakterien (Mah et al., 2003). Die Anlagerung von Bakterien an Oberflächen oder deren Einbettung in Biofilme ist somit eine erfolgreiche Überlebensstrategie für die Mikroorganismen. Speziell bei der Bestrahlung mit UV können Partikel durch Abschirmung, Absorption, Blockierung und Streuung der Strahlung die Bakterien schützen. Dazu ist es nicht einmal notwendig, dass Bakterien direkt an die Partikel angelagert sind; auch bei planktonisch lebenden Bakterien können solche Effekte abhängig von der Partikelgröße und dem Trübungsgrad auftreten.

In früheren DNA-bezogenen und mikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass metabolisch aktive Bakterien in Biofilmen sogar direkt nach der UV-Desinfektionsanlage gefunden wurden (Schwartz et al., 2003). Diese früheren Befunde gaben Anlass, in dieser Arbeit gezielt subletal UV-behandelte *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen auf eine *recA* abhängige Biofilmbildung zu untersuchen. Zusätzlich zur *recA*-mRNA-Bildung wurde die Expression von Genen analysiert, die bekannterweise eine wesentliche Rolle bei der Biofilmbildung spielen. Diese Biofilm regulierenden Gene (*Quorum sensing* (QS)-Regulation) steuern neben der Biofilmentwicklung die Synthese von Signalmolekülen und Pathogenitätsfaktoren (Wagner et al., 2003, Dong et al., 2005).

Die untersuchten QS-Gene zeigten in den planktonischen Bakterien allerdings keine Veränderung in ihrem Expressions-Verhalten nach Behandlung mit UV-Strahlung. Sie wurden

lediglich mit einer Grundexpression transkribiert. Im direkten Vergleich zeigte *recA* einen deutlichen Expressionsanstieg nach der UV-Bestrahlung. Weder die UV-Bestrahlung noch die erhöhte Menge an *recA*-Genprodukten zeigten einen Einfluss auf die QS-Genregulation bei den planktonischen Bakterien.

In Gegensatz zu diesen Biofilm-bezogenen Untersuchungen mit QS regulierenden Genen zeigten Literaturdaten, dass RecA-Protein über die bereits genannten Funktionen hinaus auch Einfluß auf interzelluläre Vorgänge zwischen Bakterien aufweisen kann, die mit Biofilmen assoziiert sind. Boles et al. (2004) zeigten in *P. aeruginosa*-Biofilmen, dass die hohe genetische Diversität, ausgelöst durch horizontalen Gentransfer, *recA*-abhängig ist. Andere Autoren bestätigten die Rolle des RecA-Proteins beim horizontalen Gentransfer (Bearber et al, 2004, Hastings et al., 2004, McGrath et al., 2005). Selbst die hohe genetische Diversität, die bei *Helicobacter pylori* beobachtet wurde, wurde durch RecA vermittelten horizontalen Gentransfer und freie Rekombination zwischen den Stämmen erzeugt (Fischer und Haas, 2004). RecA ist eine der zentralen Komponenten in dieser Maschinerie des genetischen Informationsaustauschs, vor allem in Biofilmen.

Im Hinblick auf die Effektivität der UV-Strahlung gegenüber Biofilmen ist die Datenlage sehr gering. Zudem wird augenfällig, dass es schwierig ist, Biofilme gleichmäßig und reproduzierbar herstellen zu können. Dieses Problem wird auch in der Literatur aktuell diskutiert (Persson et al., 2005). In eigenen Versuchen konnten Biofilme auf synthetischen Oberflächen mit *Pseudomonas aeruginosa* kultiviert werden. Dies belegten mikroskopische Untersuchungen mit dem Fluorochrom DAPI als Zellmarker und dem Fluorochrom-markierten Lektin Concanavalin A, das spezifisch an extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) von *Pseudomonas aeruginosa* bindet. Im Experiment wurden diese gezüchteten Biofilme mit UV bestrahlt und auf *recA/RecA*-Induktion mit den *Pseudomonas aeruginosa* spezifischen Nachweissystemen untersucht. Die Expressionsdaten waren jedoch sehr variabel und zeigten keinen eindeutigen Trend im Expressionsmuster von UV-behandelten und nicht behandelten Ansätzen. Im Bezug auf Biofilm-Expressionsmuster besteht noch ein erheblicher Forschungsbedarf, auch im Hinblick auf die zu verwendeten Substratmaterialien. Voruntersuchungen dieser Art belegen die Adhärenz von *Pseudomonas aeruginosa* an natürlicherweise im Trinkwasser vorkommenden Partikeln wie Goethit, Aktivkohle und Tonmineralien.

Bis jetzt ist nicht klar, in welchem Ausmaß adhärente Bakterien die UV-Desinfektionsbarriere im Wasserwerk überleben. Der Einfluß von Abschattungseffekten und Schutzmechanismen in Biofilm-Strukturen muss detaillierter untersucht werden.

Biofilmbildung in Trinkwassersystemen ist ein bekanntes Phänomen, dessen Ausmaß abhängig ist von Faktoren wie Rohwasserqualität und Aufbereitungstechnologie vor Ort.

Praxiserfahrungen der Trinkwasseraufbereitung verschiedener Länder wurden von Kühn et al. (2003) zusammengetragen. Es wurden Daten aus Brasilien, China, Indonesien, Iran, Südafrika, Thailand, Vietnam und den USA zusammengestellt, bewertet und letztlich sehr große Unterschiede in der Beschaffenheit der Rohwässer und deren Aufbereitung beschrieben. Die Länder nutzen mit Ausnahme von Deutschland, China, und den städtischen Gebieten im Iran überwiegend Oberflächenwasser zur Trinkwassergewinnung (Tabelle 5.1).

Tab. 5. 1: Rohwasserherkunft in den Ländern der Datenerhebung (aus: Kühn et al., 2003).

Land	Oberflächenwasser in %	Grundwasser in %
China	30	70
Iran (Städte), Deutschland	35	65
Indonesien, USA, Vietnam	65	35
Südafrika	80	20
Thailand	90	10
Brasilien	95	5

Ein grundsätzliches Problem in den meisten Ländern war die mikrobiologische Belastung vor allem der Rohwässer. Eine geregelte Abwasserentsorgung gab es oftmals praktisch nicht (z.B. Indonesien, Thailand). Hochkontaminierte kommunale Abwässer werden in Drittwelt-Ländern und Schwellenländern oft unbehandelt in Oberflächenwässer eingeleitet. Das zusätzliche Ausbringen von Abwasser auf Felder und die ungenügende Sicherung von Abwassergruben stellte die weitere Ursache für eine Verschmutzung der Vorfluter oder Rohwässer dar. Verschärft wird diese Problematik oft durch die vorherrschenden klimatischen Bedingungen. Beispielsweise wiesen in verschiedenen Regionen die Vorfluter Temperaturen von ca. 18-25 °C auf, die für ein Bakterienwachstum als sehr geeignet anzusehen sind.

Weiter tragen einige Szenarien wie z.B. Starkniederschläge zu Gefährdung der Trinkwasseraufbereitung bei, da durch diese die Trübungswerte der Flüsse von 100 bis 1000 FNU über einen Zeitraum von Stunden und Tagen ansteigen, d.h. die Wasserbeschaffenheit extremen Schwankungen unterliegt.

Erhöhter Gehalt von natürlichen organischen Stoffen, erhöhte Bromidkonzentrationen sowie höhere Temperaturen riefen infolge der Desinfektion mit Chlor eine verstärkte Bildung von Trihalogenmethanen (THM) hervor. THM's sind toxische Desinfektionsnebenprodukte, die zu den organischen Chlorverbindungen gehören und vor allem bei Chlorung des Trinkwassers entstehen können. In der Regel liegen die im Ausland geltenden Grenzwerte für THM über den in Deutschland verbindlichen Werten.

Diese Daten zeigen, dass Alternativen zur chemischen Desinfektion zur Vermeidung von toxischen Verbindungen notwendig sind. UV-Desinfektion ist eine sehr gute Alternative vor allem für Wässer, die frei von Trübstoffen sind. Bei richtigem Einsatz und unter Kenntnis der molekularen Mechanismen zur Reparatur von UV-Schädigungen können Bakterien und andere Mikroorganismen effektiv entfernt werden. Der große Vorteil der UV-Desinfektion liegt gerade in der Vermeidung von toxischen Desinfektionsnebenprodukten. Die UV-Desinfektionstechnik ist zudem leicht anwendbar, benötigt geringen Energieaufwand (5 - 50 W/m³) und geringen Wartungsaufwand, erfordert keine ausgebildete Fachkraft zur Bedienung und die laufenden Kosten sind niedrig.

Mit diesen Vorteilen ist im Hinblick auf die Situation in den Drittwelt-Ländern und Schwellenländern die Anwendung von UV-Strahlung sehr interessant und wurde bereits getestet. Das Lawrence Berkley Labor in Kalifornien, USA, entwickelte eine UV-Desinfektionsanlage, die u.a. in Südafrika eingesetzt wurde. Gefiltertes Wasser mit hoher Kontaminationsfracht wurde so ausreichend mit UV-Strahlung desinfiziert (Gadgil et al., 1997). Das zeigt, dass es möglich ist, UV-Strahlung auch bei besonders problematischen Wässern effektiv einzusetzen.

Gerade wegen der erhöhten Kontamination von Rohwässern sollte jedoch die UV-Desinfektion im Hinblick auf das Reparaturverhalten von Bakterien weiterhin optimiert und genauer untersucht werden. Das wurde auch durch die Ergebnisse der Untersuchungen hoher Bakteriendichten nach Bestrahlung mit UV deutlich, die ein höheres Reparatur-Potential aufwiesen als Wässer mit niedrigen Bakteriendichten.

Einige Optimierungsversuche wurden in der Literatur schon beschrieben. Diskutiert wurde z.B. die zusätzliche Nutzung von anderen Wellenlängen bei der Desinfektion, die nicht nur die DNA schädigen, sondern auch von anderen Molekülen absorbiert werden (Clauß et al., 2005). Proteine haben neben einem Maximum bei 280 nm ein starkes Absorptionsmaximum bei 220 nm, was durch KrCl-Excimer-Lampen generiert werden kann. Untersuchungen, die die Photoreaktivierung von *Escherichia coli* nach 222 nm und 254 nm verglichen, zeigten, dass die Bestrahlung mit 222 nm weniger effektiv ist gegenüber 254 nm (Clauß et al., 2005). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass *Bacillus subtilis*-Sporen viel besser mit 222 nm inaktiviert werden konnten, während vegetative Formen von *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* und *E. coli* besser mit 254 nm inaktiviert werden konnten (Munakata et al., 1986; Clauß et al., 2003). In diesen Versuchsansätzen wurde jedoch nicht die Dunkelreparatur berücksichtigt, sondern lediglich die Photoreaktivierung diskutiert. Zudem wurden die Versuche mittels mikrobiologischen Kultivierungsversuchen durchgeführt.

In Bezug auf die molekularen Wirkmechanismen besteht eine Informationslücke hinsichtlich der Inaktivierung von Mikroorganismen mit Wellenlängen niedriger als 254 nm.

Wenn die Bestrahlung-Intensität bei einer Wellenlänge von 222 nm hoch genug ist, werden offensichtlich viele Proteine in solch einem Ausmaß geschädigt, dass für die Zelle keine Möglichkeit besteht, den Metabolismus aufrecht zu erhalten. Das führt unabhängig von Reparaturmechanismen schließlich zum gewünschten Zelltod. Gerade in oligotrophen Kompartimenten ist die Proteinsynthese in hungernden Bakterien limitiert (Reeve et al., 1984).

Wenn also nicht nur DNA-Strukturen bei 254 nm geschädigt werden, sondern beim Einsatz von 222 nm auch Proteine, die für einer Reihe von Reparaturmechanismen verantwortlich sind, kann das für die Zelle Konsequenzen haben. Folglich kann dies zu einer effektiveren Inaktivierung auch von UV-resistenten Spezies führen.

Es muss jedoch bei der Technikoptimierung berücksichtigt werden, dass Photonen bei höheren Wellenlängen wie 254 nm viel tiefer in Wasser eindringen können als bei 222 nm (Kelland et al., 1984).

Ein weiteres Beispiel für einen Optimierungsversuch von UV-Desinfektion, der in der Literatur diskutiert wird, ist der Einsatz von Silberkationen (Butkus et al., 2004, 2005). Silberkationen können einen Komplex mit der DNA bilden und sie somit photoreaktiver machen. Es wird von einem synergistischen Effekt zwischen kationischem Silber und UV-Strahlung berichtet, der die Inaktivierung vom MS-2 Coliphagen beträchtlich verstärkt. In bakteriziden Konzentrationen des Silbers wird das Wasser weder durch Geruch noch Geschmack oder Verfärbung beeinflusst und hat keine offensichtlichen nachteiligen Effekte auf Säugerzellen. Der einzige negative Gesundheitseffekt kann bei langen Einnahmen hoher Silberkonzentrationen auftreten, die zu irreversiblen Verfärbungen der Haut und der Schleimhäute führen können (Argyrie). Für niedrige Konzentrationen, wie sie in Zusammenhang mit der UV-Desinfektion diskutiert werden, scheint dies aber nicht relevant zu sein.

Solche Anwendungen könnten ein Optimierungsschritt für die UV-Desinfektion von Wässern mit hohem Kontaminationspotential sein, wie sie z.B. in den Entwicklungsländern auftreten.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch erste Untersuchungen zur *recA/RecA*-Expression bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* nach Behandlung mit Natriumhypochlorit (NaOCl), einem chemischen Desinfektionsmittel, durchgeführt. NaOCl wurde wegen seiner weitverbreiteten Anwendung als Desinfektionsmittel in der Wasseraufbereitung gewählt. Chlor oder chlorhaltige Reagenzien sind als Desinfektionsmittel generell weit verbreitet und gelten als Standard. Die Anwendung des Desinfektionsmittels unmittelbar vor dem Verteilungssystem stellt eine Kontrolle der Mikroorganismen im vorhandenen Trinkwasser dar. Dieses Vorhandensein einer Restdesinfektion wird oft als wichtiger Schritt angesehen.

Es ist bekannt, dass Chlor Effekte auf eine Vielzahl von subzellulären Komponenten und metabolischen Prozessen einschließlich der Hemmung der Proteinsynthese hat (Grohmann, 2004, Laplace et al., 1997).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass bei *Pseudomonas aeruginosa* nach Behandlung mit NaOCl im Vergleich mit der unbehandelten Probe kein *recA*-mRNA oder RecA-Protein induziert wurde. Bei *Enterococcus faecium* wurde auf mRNA-Ebene ebenso keine *recA*-mRNA-Induktion detektiert, jedoch konnte auf Proteinebene nach 27 h Inkubation im Dunkeln RecA-Protein detektiert werden.

Die Ergebnisse der NaOCl-Versuche in dieser Arbeit können allerdings nicht direkt mit den Ergebnissen der UV-Behandlung verglichen werden. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob die UV- und die NaOCl-behandelten Zellen ein ähnliches Schadensausmaß aufwiesen. Außerdem wurde nicht gemessen, ob und wie schnell sich das Chlor in dem Batch-Ansatz abgebaut hat, d.h. wie viel aktives Chlor nach 27 h noch vorhanden war. Das Verhältnis von dem im Wasser herrschenden Gleichgewicht zwischen unionisierter unterchloriger Säure (HOCl) und Hypochlorit-Anionen (ClO⁻) hängt vom pH-Wert und von der Temperatur ab. Die unterchlorige Säure ist ein extrem starkes bakterizides und virizides Agens, sogar bei Konzentrationen unter 0,1 mg/L.

Einige Untersuchungen wurden bereits über das Verhalten von Bakterien bei Behandlung mit NaOCl gemacht (Laplace et al. 1997). Die Autoren stellten Versuche mit *Enterococcus faecalis* unter NaOCl-Einwirkung an und beobachteten über Kultivierungsversuche eine natürliche Resistenz. Ein hoher Resistenzlevel wurde, im Gegensatz zu Zellen in der exponentiellen Phase, bei Kohlenhydrat-hungernden Zellen und in Zellen der stationären Wachstumsphase beobachtet. Über 2-dimensionale Proteingel-Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Protein-Synthese bei subletalen Konzentrationen an NaOCl inhibiert wurde, jedoch einige Proteine verstärkt synthetisiert wurden. In Versuchen mit *recA*-mutierten *E. coli*-Stämmen wurde im Vergleich zum Wildtyp gezeigt, dass auch HOCl (unterchlorige Säure) DNA schädigen kann und damit die *recA* induzierende Wirkung von NaOCl erklärt werden kann (Dukan und Touati, 1996).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die UV-Desinfektion von Trinkwasser eine sehr effektive Methode zur Abtötung von Bakterien ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass nach Bestrahlung von Bakterien mit einer UV-Dosis, die dem deutschen Standard für die Trinkwasserdesinfektion entspricht, die Dunkelreparatur von Bakterien relevant für das Überleben und Wiederaufkeimen sein kann. In dieser Arbeit wurde der Dunkelreparaturmechanismus auf molekularbiologischer Ebene mit Nachweissystemen für die Genprodukte von *recA* untersucht. Mit diesen spezifischen Nachweissystemen konnte gezeigt werden, dass Bakterien Spezies-abhängig auch in Stadien, in denen sie ihre Kultivierbarkeit auf herkömmlichen Medien verloren haben, trotzdem eine aktive Gen-Expression und Proteinbildung für die Reparatur und damit Wiedererholung zeigen können.

6 Ausblick

Die Ergebnisse unterstreichen den Forschungsbedarf zur detaillierten Bewertung der Desinfektionseffizienz bei der Trinkwasseraufbereitung. Besonders im Hinblick auf Dunkelreparaturmechanismen in Bakterien im Trinkwasserverteilungssystem sollten weitere vertiefte Arbeiten durchgeführt werden. Ziel ist es, universelle Stressantworten in Desinfektionsprozessen umfassender zu verstehen, um letztlich unerwünschte bakterielle Kontaminationen zu vermeiden.

- Die in dieser Arbeit entwickelten und etablierten Nachweissysteme zur Detektion von *recA*-mRNA und RecA-Protein müssen auf Bedingungen, die in Desinfektionsprozessen vorherrschen, übertragen werden.

Auch ist es notwendig, mehr Daten über das Dunkelreparaturverhalten von Bakterien zu erhalten, um bei bestimmten Szenarien in der Trinkwasseraufbereitung bakterielles Verhalten besser einschätzen und entsprechend reagieren zu können. Bei einem notwendigen Bedarf zur Optimierung der UV-Desinfektion sind weiterhin folgende Aspekte noch zu berücksichtigen:

- die Effizienz der Technik bei Biofilmen bzw. an Partikel gebundenen Bakterien
- die Effizienz der Technik bei Bakterien in verschiedenen Wachstums- und Dauerstadien
- Optimierungen durch zusätzliche UV-Bestrahlung mit niedrigeren Wellenlängen
- Einsatz von Mitteldruck-UV-Strahlern

Weitere Untersuchungen zum Verhalten von Bakterien nach Behandlungen mit chemischen Desinfektionsmitteln sollten außerdem im Hinblick auf die mögliche Induktion von Reparatursystemen auf molekularer Ebene durchgeführt werden.

7 Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1997. Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage. VHC, Weinheim, Deutschland.

Amersham Bioscience, ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent Protocoll.

Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K. 2004. SOS-Response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(1), 72-74.

Benz, I., Schmidt, M.A. 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 45, 267-276.

Berg, B.J.V., Sancar, G.B. 1998. Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* 273(32), 20276-20284.

Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K. 2004. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *PNAS* 101(47), 16630-16635.

Bolton, J.R. 1999. Ultraviolet application handbook. Bolton Photosciences Inc.

Bolton, J.R., Henke, L. 1999. Ultraviolet disinfection: A basic primer. *Water Conditioning and Purification (WCP)* 04, 34-38.

Booth, M.G., Hutchinson, L., Brumsted, M., Aas, P., Coffin, R.B., Downer, R.C. Jr., Kelley, C.A., Lyons, M.M., Pakulski, J.D., Holder Sandvik, S.L., Jeffrey, W.H., Miller, R.V. 2001 a. Quantification of recA gene expression as an indicator of repair potential in marine bacterioplankton communities of Antarctica. *Aquat. Microb. Ecol.* 24, 51-59.

Booth, M.G., Jeffrey, W.H., Miller, R.V. 2001 b. RecA expression in response to solar UVR in the marine bacterium *Vibrio natrigens*. *Microb. Ecol.* 42, 531-539.

Butkus, M.A., Labare, M.P., Starke, J.A., Moon, K., Talbot, M. 2004. Use of aqueous silver to enhance inactivation of Coliphage MS-2 by UV disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5), 2848-2853.

Butkus, M.A., Talbot, M., Labare, M.P. 2005. Feasibility of the silver-UV process for drinking water disinfection. *Wat. Res.* 39, 4925-4932.

Byrd, J., Xu, H., Colwell, R. 1991. Viable but not culturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 875-878.

Camper, A.K., LeChevallier, M.W., Broadaway, S.C., McFeters, G.A. 1986. Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(3), 434-438.

Camper, A.K., Brastrup, K., Sandvig, A., Clement, J., Spencer, C., Capuzzi, A.J. 2003. Effect of distribution systems materials on bacterial regrowth. *J. AWWA* 95(7), 107-121.

Chang, Y.Y., Killick, E.G. 1995. The effect of salinity, light and temperature in a disposal environment on the recovery of *E. coli* following exposure to ultraviolet radiation. *Wat. Res.* 29, 1373-1377.

Clancy, J.L., Hargy, T.M., Marshall, M.M., Dyksen, J.E. 1998. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *J. AWWA* 90(9), 92-102.

- Clauß, M., Kolch, A., Mannesmann, R. 2003. Comparative examination of a 254 nm mercury lamp and a 222 nm excimer lamp regarding the inactivation of different microorganisms. In: Proceedings of the 2nd International Congress of Ultraviolet Light Technology, IUVA.
- Clauß, M., Mannesmann, R., Kolch, A. 2005. Photoreactivation of *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* after irradiation with a 222 nm excimer lamp compared to a 254 nm low-pressure mercury lamp. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33(6), 579-584.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., Hanawalt, P.C. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158, 41-46.
- Deutscher Verein des Gas- und Wasserfachs e.V. (DVGW) 1997. UV-Desinfektionsanlagen für die Trinkwasserversorgung – Anforderung und Prüfung. Technischer Standard W 294. [Online.], Bonn, Deutschland. <http://www.dvgw.de>. – Revised version of 2003.
- Deutscher Verein des Gas- und Wasserfachs e.V. (DVGW). Trinkwasserverordnung (TrinkwV) 2001. Artikel 1, Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Umsetzung der Richtlinie 98/83/EG des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch vom 3. November 1998.
- Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., Soo, H.-M.L., Greenberg, E.P., Zhang, L.-H. 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 56(5), 1287-1301.
- Dukan, S., Touati, D. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.* 178(21), 6145-6150.
- Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P., Obst, U. 2004. Biofilms, population shifts, opportunistic pathogenic bacteria, enzymatic activities, molecular-biological techniques. *Wat. Res.* 38, 1197-1206.
- Entchewa-Dimitrov, P., Spormann, A.M. 2004. Dynamics and control of biofilms of the oligotrophic bacterium *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 186(24), 8254-8266.
- Exner, M. 2003. Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser. Berichte aus dem IWW Rheinisch Westfälisches Institut für Wasserforschung, gemeinnützige GmbH, Institut an der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, Ergebnisse des Verbundprojektes, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, Band 36: Vorwort.
- Farjardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Nicholson, W.L. 2005. Essential cysteine residues in *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase identified by alanine scanning mutagenesis. *Curr. Microbiol.* 51(5), 331-335.
- Fernandez de Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., Woodgate, R. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35(6), 1560-1572.
- Fiksdal, L., Tryland, I. 1999. Effect of u.v. light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* β -D-galactosidase activity and other potential viability parameters. *J. Appl. Microbiol.* 87, 62-71.
- Fischer, W., Haas, R. 2004. The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranscriptional modification for full activity. *J. Bacteriol.* 186(3), 777-784.

- Flemming H.-C., Wingender, J. 2001. Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen. *Biologie in unserer Zeit* 31(39), 169-180.
- Franklin, W.A., Haseltine, W.A. 1986. The role of the (6-4) photoproduct in ultraviolet light-induced transition mutation in *E.coli*. *Mut. Res.* 165, 1-7.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. 1995. DNA Repair and mutagenesis. ASM Press, Washington D.C.
- Gadgil, A., Greene, D., Drescher, A., Weil, S. 1997. Water disinfection for the developing world. Status report on UV Waterworks. Laurence Berkeley National Laboratory Report Number LBNL-40730.
- Gauthier, V., Redercher, S., Block, J.-C. 1999. Chlorine inactivation of *Sphingomonas* cells attached to Goethite particles in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1), 355-357.
- Gerba, C.P., Nwachuku, N., Riley, K.R. 2003. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Conatminant Candidate List (CCL). *J. Water SRT – Aqua* 52, 81-94.
- Giard, J.-C., Laplace, J.-M., Rincé, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeuf, C., Flahaut, S., Auffray, Y., Hartke, A. 2004. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22, 2947-2954.
- Giese, N., Darby, J. 2000. Sensitivity of microorganisms to different wavelengths of UV light: implications on modelling of medium pressure UV systems. *Wat. Res.* 34(16), 4007-4013.
- Goldstein, S.T. et al. 1996. Cryptosporidiosis: An outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. *Ann. Int. Med.* 124(5), 459-468.
- Grohmann, A. 2004. Ansichten über die Desinfektion von Wasser und die Wirkung von Chlor im Wandel der Zeit. *Vom Wasser* 102(1), 15-19.
- Haider, T., Sommer, R., Knasmüller, S., Eckl, P., Pribil, W., Cabaj, A., Knudi, M. 2002. Genotoxic response of Austrian groundwater samples treated under standardized UV (254 nm) – disinfection conditions in a combination of three bioassays. *Wat. Res.* 36, 25-32.
- Harmon, F.G., Rehrauer, W.M., Kowalczykowski, S.C. 1996. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. *J. Biol. Chem.* 271(39), 23874-23883.
- Harris, G.D., Adams, V.D., Sorensen, D.L., Curtis, M.S. 1987. Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. *Wat. Res.* 21(6), 687-692.
- Hastings, P.J., Rosenberg, S.M., Slack, A. 2004. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 12(9), 401-404.
- Herson, D.S., McGonigle, B., Payer, M.A., Baker, K.H. 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(5), 1178-1180.
- Hijnen, W., Beerendonk, E., Medema, G. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (o)cyst in water: a review. *Wat. Res.* 40(1), 3-22.
- Hoyer, O., Bernhardt, H. 1996. Aufbereitung von Wasser aus Talsperren und Seen. *DVGW-Handbuch Band 6 „Wasseraufbereitung“*, 1-24.

- Hoyer, O. 2003. Ist die UV-Desinfektion für die öffentliche Trinkwasserversorgung akzeptabel? bbr Fachmagazin für Wasser- und Leitungsbau 54(3), 62-66.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J., Szewzyk, U. 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 29(2), 769-777.
- Kao, Y.-T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D. 2005. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *PNAS* 102(45), 16128-16132.
- Kashimada, K., Kamiko, N., Yamamoto, K., Ohgaki, S. 1996. Assessment of photoreactivation following ultraviolet light disinfection. *Wat. Sci. Techn.* 33(10-11), 261-269.
- Kelland, L.R., Moss, S.H., Davies, D.J.G. 1984. Laakage of $^{86}\text{RB}^+$ after ultraviolet irradiation of *E. coli* K12. *Photochem. Photobiol.* 39(3), 329-335.
- Kerwick, M., Reddy, S., Holt, D., Chamberlain, A. 2005. A methology for the evaluation of disinfection technologies. *J. Water and Health*, 03, 393-404.
- Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J. 2003. Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206(6), 563-573.
- Ko, G., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D. 2005. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. *Wat. Res.* 39, 3643-3649.
- Kolch, A., Schoenen, D. 1994. Biologische Grundlagen der UV-Desinfektion. Abschlußbericht F+E-Vorhaben: Untersuchungen zur Sicherheit des technischen Einsatzes von UV-Strahlen zur Trinkwasserdesinfektion 12, 1-19.
- Konola, J.T., Sargent, K.E., Gow, J.-B. 2000. Efficient repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage by *Escherichia coli* requires SOS induction of RecA and RuvA proteins. *Mut Res.* 459, 187-194.
- Kriukov V.M., Zaitsev, E.N., Kuz'min, N.P., Baev, A.A. 1990. Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* recA gene. *Bioorg. Khim.* 16(9), 1177-1182.
- Kühn, W., Lipp, P., Müller, U., Schlitt, V., Stauder, S. 2003. Praxiserfahrungen bei der Trinkwassergewinnung in anderen Ländern. Exportorientiertes F+E-Vorhaben auf dem Gebiet der Wasserver- und -entsorgung, Teil 1: Trinkwasser. Band 1. Abschlussbericht zum BMBF-Vorhaben 02WT0207.
- Kuzminov, A. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ . *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63(4), 751-813.
- Laplace, J.-M., Thuault, M., Hartke, A., Boutibonnes, P., Auffray, Y. 1997. Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: Influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr. Microbiol.* 34, 284-289.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., Lee, R.G. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(3), 649-654.
- LeChevallier, M.W., Welch, N.J., Smith, D.B. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2201-2211.

- LeChevallier, M.W., Au, K.-K. 2004. Inactivation (disinfection) processes. Water treatment and pathogen control: Process efficiency in achieving safe drinking water. World Health Organisation (WHO), IWA Publishing.
- Lehtinen, J., Virta, M., Lilius, E.M. 2003. Fluoro-luminometric real-time measurement of bacterial viability and killing. *J. Microbiol. Meth.* 55, 173-186.
- Lenntech. <http://www.Lenntech.com/deutsch/UV-info.htm>.
- Liltved, H., Landfald, B. 1996. Influence of liquid holding recovery and photoreactivation of survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria. *Wat. Res.* 30, 1109-1114.
- Lindauer, K. G., Darby, J. 1994. Ultraviolet disinfection of waste water: effect of dose on subsequent photoreactivation. *Wat. Res.* 28, 805-817.
- Linden, K.G., Shin, G.A., Sobsey, M.D. 2001. Comparative effectiveness of UV wavelengths for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Wat. Sci. Tech.* 43(12), 171-174.
- Linden, K.G., Shin, G.A., Faubert, G., Cairns, W., Sobsey, M.D. 2002. UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Environ. Sci. Technol.* 36(11), 2519-2522.
- Liu, W., Andrews, S.A., Bolton, J.R., Linden, K.G., Sharpless, C., Stefan, M. 2002. Comparison of DBP formation from different UV technologies at bench scale. IWA World Water Congress, Melbourne, Australia 2002.
- Liu, G. 2005. An investigation of UV disinfection performance under the influence of turbidity and particulates for drinking water applications. Thesis, University of Waterloo, Ontario, Canada.
- Lleò, M.M., Bonato, B., Benedetti, D., Canepari, P. 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 189-196.
- Lovett, C.M. Jr., Love, P.E., Yasbin, R.E., Roberts, J.W. 1988. SOS-like induction in *Bacillus subtilis*: induction of the RecA protein analog and a damage-inducible operon by DNA damage in RecA⁺ and DNA repair deficient strains. *J. Bacteriol.* 170, 1467-1474.
- Lovett, C.M., Jr., Cho, K.C., O'Gara, T.M. 1993. Purification of an SOS repressor from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 6842-6849.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., Fischer, U., Schleifer, K.H. 1993. Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta subunit genes. *Ant. Leeuw.* 64, 285-305.
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306-310.
- Matic, I., Taddei, F., Radman, M. 2004. Survival versus maintenance of bacterial stability: a conflict of priorities during stress. *Res. Microbiol.* 155, 337-341.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.M. 2002. Structure of the major UV-induced photoproducts in DNA. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Cambridge University Press.
- McGrath, B.M., O'Halloran, J.A., Pembroke, J.T. 2005. Pre-exposure to UV irradiation increases the transfer frequency of the IncJ conjugative transposon-like elements R391, R392, R705, R706, R997 and pMERPH and is recA⁺ dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 461-465.

- McGrew, D.A., Knight, K.L. 2003. Molecular design and functional organisation of the RecA-Protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38(5), 385-432.
- McKenzie, G.J., Harris, R.S., Lee, P.L., Rosenberg, S.M. 2000. The SOS response regulates adaptive mutation. *PNAS* 97(12), 6646-6651.
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A.P.M., Carell, T., Essen L.-O. 2004. Crystal Structure of a Photolyase Bound to a CPD-Like DNA Lesion After in Situ Repair. *Science* 306, 1789-1793
- Miller, R.V., Kokjohn, T.A. 1988. Expression of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO is inducible by DNA-damaging agents. *J. Bacteriol.* 170(5), 2385-2387.
- Miller, R.V. 2000. *recA*: the gene and its protein product. In: Luria S. (ed) *Encyclopedia of Microbiology*, 2nd edn, Vol 4. Academic Press, San Diego, 43-54.
- Morin, P., Camper, A.K., 1997. Attachment and fate of carbon fines in simulated drinking water distribution system biofilms. *Wat. Res.* 31(3), 399-410.
- Munakata, N., Hieda, K., Kobayashi, K., Ito, A., Ito, T. 1986. Action spectra in ultraviolet wavelengths (150 - 250 nm) for inactivation and mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores obtained with synchrotron radiation. *Photochem. Photobiol.* 44(3), 385-390.
- Nicholson, W.L. 1995. Photoreactivation in the genus *Bacillus*. *Curr. Microbiol.* 31(6), 361-364.
- Niermann, W.C. et al. 2001. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *PNAS* 98(7), 4136-4141.
- Nwachuku, N., Gerba, C.P. 2004. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Curr. Opin. Biotechn.* 15, 175-180.
- Nwachuku, N., Gerba, C.P., Oswald, A., Mashadi, F.D. 2005. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9), 5633-5636.
- ÖNORM M-5873-1 D. 2001. Anlagen zur Desinfektion von Wasser mittels Ultraviolett-Strahlen, Anforderungen und Prüfung. Teil 1: Anlagen mit Quecksilberdampf-Niederdruckstrahlern. Österreichisches Normierungsinstitut Wien.
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. 2002. Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- and medium-pressure UV disinfection determined by endonuclease sensitive site assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12), 6029-6035.
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. 2004. Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Wat. Res.* 38(11), 2757-2763.
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. 2005. Spectral impact of inactivating light on photoreactivation of *Escherichia coli*. *J. Environ. Engin. Sci.* 4(S1-S6), Suppl 1.
- Oliver, J.D. 2005. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: Colwell, R.R., Grimes, D.J. (ed.). *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM Press, Washington, D.C. 277-300.
- Papavinasundaram, K.G., Anderson, C., Brooks, P.C., Thomas, N.A., Movahedzadeh, F., Jenner, P.J., Colston, M.J., Davis, E.O. 2001. Slow induction of RecA by DNA damage in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol.* 147, 3271-3279.

- Payment, P., Robertson, W. 2004. The microbiology of piped distribution systems and public health. In: WHO, Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems. IWA Publishing London, UK. 1-18.
- Persson, F., Langmark, J., Heinicke, G., Hedberg, T., Tobiason, J., Stenström, T.-A., Hermansson, M. 2005. Characterisation of the behaviour of particles in biofilters for pre-treatment of drinking water. *Wat. Res.* 39(16), 3791-3800.
- Ponniah, G., Chen, H., Michielutti, R., Salonen, N., Blum, P. 2003. Single-cell protein profiling of wastewater enterobacterial communities predicts disinfection efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7), 4227-4235.
- Power, P.M., Jennings, M.P. 2003. The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 211-222.
- Pozos, N., Scow, K., Wuertz, S., Darby, J. 2004. UV disinfection in a model distribution system: biofilm growth and microbial community. *Wat. Res.* 38, 3083-3091.
- Radman, M. 1974. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In: Hanawalt, P., Setlow, R.B. (eds). *Molecular mechanisms for repair of DNA. Part A.* Plenum Publishing Corp., New York, 355-367.
- Reeve, A.C., Amy, P.S., Matin, A. 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 160(3), 1041-1046.
- Rice, J.K., Ewell, M. 2001. Examination of peak power dependence in the UV inactivation of bacterial spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12), 5830-5832.
- Roeske, W., Müller, C. 2003. Die Desinfektion von Trinkwasser mit Chlor und Chlordioxid. Eine Verfahrensübersicht. *Braunwelt. Sonderdruck* 11, 287-292.
- Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U., Vahaboglu, H. 2002. Expression stability of six house keeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT PCR. *J. Med. Microbiol.* 52, 403-408.
- Schindler, P. 2004. Fäkale Verunreinigungen im Trinkwasser. Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit München. In: Behling, G. 2004. *Wasser – Reservoir des Lebens. Aktuelle Fragen zu Wasserversorgung und -hygiene.* Seminarband FLUGS Fachinformationsdienst, GSF-Bericht 01/04. Hrsg: GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.
- Schmidt, W. 2004. Using chlorine dioxide for drinking water disinfection by the application of the chlorite/chlorine processes. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 32(1), 48-60.
- Schoenen, D., Kolch, A. 1992. Photoreactivation depending on light-intensity after UV irradiation. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 192(6), 565-570.
- Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U. 1998 a. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research* 32, 2787-2797.
- Schwartz, T., Kalmbach, K., Hoffmann, S., Szewzyk, U., Obst, U. 1998 b. PCR-based detection of mycobacteria in biofilms from a drinking water distribution system. *J. Microbiol. Meth.* 34, 113-123.

- Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U. 2003. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and UV disinfection in public drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 95, 591-601.
- Setlow, R.B., Carrier, W.L. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error correcting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51, 226-231.
- Shaban, A.M., ElTaweel, G.E., Ali, G.H. 1997. UV ability to inactivate microorganisms combined with factors affecting radiation. *Water Sci. Techn.* 35 (11-12), 107-112.
- Shin G.-A., Linden, K.G., Sobsey, M.D. 2005. Low pressure ultraviolet inactivation of pathogenic enteric viruses and bacteriophages. *J. Environ. Engin. Sci.* 4 (S1), S7-S11 (1).
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Pruzzo, C., Canepari, P. 2005. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5), 2756-2761.
- Sinha, R.P., Häder, D.-P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225-236.
- Sommer, R., Lhotsky, M., Haider, T., Cabaj, A. 2000. UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. *J. Food Protection* 63(8), 1015-1020.
- Stevik, T., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J. 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in waste water percolating through porous media: a review. *Wat. Res.* 38, 1355-1367.
- Stohl, E.A., Brockman, J.P., Burkle, K.L., Morimatsu, K., Kowalczykowski, S.C., Seifert, H.S. 2003. *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 2278-2285.
- Tosa, K., Hirata, T. 1999. Photoreactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* following UV disinfection. *Wat. Res.* 33(2), 361-366.
- Umweltbundesamt 2005. Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß § 11 Trinkwasserverordnung 2001. Teil I c. Aufbereitungsstoffe, die zur Desinfektion des Wassers eingesetzt werden.
- US-EPA, 2002. Health risk from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems. EPA's Office of Ground Water and Drinking Water and Office of Research and Development. Distribution system white papers. <http://www.epa.gov/safewater/tcr/pdf/biofilms.pdf>.
- US-EPA CCL 2005. United States Environmental Agency's Contaminant Candidate List February 2005. 2nd Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL) (http://www.epa.gov/safewater/ccl/ccl2_list.html).
- US-EPA 2006. Long term 2 enhanced surface water treatment rule (LT2). <http://www.epa.gov/safewater/disinfection/lt2#prepub>.
- UV-Xtender™ Amalgam Lamps. http://www.spectralinnovations.com/uv_technologies/ultraviolet_lamps.htm.
- Vaitilingom, M., Gendre, F., Brignon, P. 1998. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3), 1157-1160.

- Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., de Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3(7), 1-12.
- Villarino, A., Rager, M.-N., Grimont, P.A.D., Bouvet, O.M.M. 2003. Are UV-induced nonculturable *Escherichia coli* K-12 cells alive or dead? *Eur. J. Biochem.* 270, 2689-2695.
- Voet, D., Voet, J.G. 1994. *Biochemie*. VHC, Weinheim, Deutschland.
- Wagner, V., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185(7), 2080-2095.
- Wang, S., Levin, R.E. 2006. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 64, 1-8.
- Wingender, J., Grobe, S., Fiedler, S., Flemming, H.-C. 1998. The effect of extracellular polysaccharides on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorine and hydrogen peroxide. In: Keevil, C., Holt, D., Down, C., Godfree, A. (eds.): *Biofilms in aquatic systems*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Wu, Y., Clevenger, T., Deng, B. 2005. Impacts of Goethite particles on UV disinfection of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7), 4140-4143.
- Yang Y.-C., Yang M.-K. 2000. Construction and characterisation of a *recA* mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41, 129-137.
- Zimmer, J.L., Slawson, R.M. 2002. Potential repair of *Escherichia coli* DNA following exposure to UV radiation from both medium- and low-pressure UV sources used in drinking water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7), 3293-3299.

8 Anhang

A: Alignments

A1: Alignment vom <i>recA</i> -Gen unterschiedlicher Bakterien: unterschiedliche Proteobakterien und Enterokokken	133
A2: Alignment von <i>Caulobacter crescentus recA</i> -Gen mit rA2F/rA2R und TQrecAF/R/P	136
A3: Alignment von <i>Aquabacterium commune recA</i> -Gen mit rAcomF/rAcomR	137
A4: Alignment des <i>recA</i> -Gens von verschiedenen Enterokokken aus NCBI	138
A5: Alignment des <i>recA</i> -Gens unterschiedlicher Pseudomonaden aus NCBI	141
R: Daten zum RNA-Gehalt	144
P: Daten zum Proteingehalt	145

A: Alignements

A1: Alignment von unterschiedlichen Bakterien: unterschiedliche Proteobakterien und Enterokokken:

Bakterien/Gensequenz:

α -Proteobakterien:

>gi|13422388:3701-4771 *Caulobacter crescentus* CB15 section 112 of 359 of the complete genome

β -Proteobakterien:

>gi|1575710|gb|U70431.1|BCU70431 *Burkholderia cepacia* RecA protein (*recA*) gene, complete cds

γ -Proteobakterien:

>Pseudomonasaeruginosa gi|45413:145-1185 *Pseudomonas aeruginosa recA* gene

>Pseudomonasputida gi|294374:111-1178 *Pseudomonas putida recA* protein gene, complete cds

>L.pneumophila gi|48779:8-1212 *L.pneumophila recA* gene

>E.coli gi|42672:239-1300 *E. coli recA* gene

ϵ -Proteobakterien:

>Campylobacterjejuni gi|437275:136-1167 *Campylobacter jejuni* 81-176 RecA (*recA*) gene, complete cds, and enolase gene, partial cds

Enterococcus:

>gi|47678137|emb|AJ621707.1| *Enterococcus faecium recA* gene for RecA recombinase, strain LMG 11423T

>gi|29374661:c3045517-3044471 *Enterococcus faecalis* V583, complete menome

Alignment der oben aufgelisteten recA-Sequenzen und der recA-spezifischen Primer

rA2F/rA2R, rAEntF/rAEntR und rAPsF/rAPsR :

.....		
Pseudomonas aeruginosa	CCCTGGGTCTGGACATCGCCCTCGGCATCGGGCGCCTGCCAAGGGCCGG	177
Pseudomonas putida	CGCTGGGCTGGACATCGCACTGGGCATTGGCGCCTGCCAAAAGGCCGT	177
Burkholderia cepacia	CGCTGGGCTGGACATCGCACTGGGCCTCGGGCGCCTGCCGCGGCCCGC	400
Caulobacter crescentus	CGCTCGGCTCGACATCGCGCTGGGCATCGGGCGCCTGCCAAGGGCCGG	213
Escherichia coli	CGCTTTCACTGGATATCGCGCTTTGGGCGAGTGGTCTGCCGATGGGCCGT	183
Enterococcus faecium	CTCTTGCGTTAGATGTGCTTTAGGTGTGGCGGTTACCCCGTGGACGT	177
Enterococcus faecalis	CTTTAGCGTTAGATGTTGCATTGGGCGTAGGTGGGTATCCACGTGGCCGA	177
Campylobacter jejuni	CAGTTGGGCTTGATCTTGCTTTAGGTATAGGCGGTGTTCCAAAAGGAAG	177
Legionella pneumophila	CATTAGGTCTTGATATTGCCTTAGGGATAGGCGGTTTGCCAAAAGGCCGT	338
	* * * * *	
rA2F	-----CGGAATTCTCGGGCAAGACCACC-----T	23
Pseudomonas aeruginosa	ATCGTCGAGATCTACGGTCCGGAATCTCGGGCAAGACCACCCTGACCCCT	227
Pseudomonas putida	ATCGTCGAGATCTACGGCCCGGAATCGTCGGGTAACACCACGCTGACCCCT	227
Burkholderia cepacia	GTGGTCGAGATCTACGGCCCGGAATCGTCGGCAAGACCACGCTGACCCCT	450
Caulobacter crescentus	ATCGTCGAGGTCTATGGTCCGGAAGCTCGGGCAAGACCACCCTGACCCCT	263
Escherichia coli	ATCGTCGAAATCTACGGACCCGGAATCTTCGGGTAAACACCACGCTGACCCCT	233
Enterococcus faecium	ATCATGAAGTATATGGACCTGAAAGTTTCAGGTAAACCAACAGTTGACCT	227
Enterococcus faecalis	ATTATTGAAGTATATGGTCTGAGAGTTTCAGGTAAACCAACTGTTTCTT	227
Campylobacter jejuni	ATTATAGAAATTTATGGACCTGAAAGTTTCAGGTAAACCACTCTAACTTT	227
Legionella pneumophila	ATTGTTGAAATTTATGGCCCTGAGTCTTCTGGTAAACCAACGCTCACTCT	388
	* * * * *	
rAEnt-f	ACACGCTATTGCAGAAGTACAA-----	23
Pseudomonas aeruginosa	CTCGGTGATCGCCGAGGCCAGAAACAGGGCGCACCTGTGCCTTCGTGCG	277
Pseudomonas putida	GTCCGGTATCGCCGAAAGCCAGAAAAACGGCGCCACCTGCGCCTTCGTGCG	277
Burkholderia cepacia	GCAGGTCAATGCGCAGCTGCAGAAGCTGGGCGGCACCCGCGCTTCATCG	500
Caulobacter crescentus	GCACGTCGTGGCCGAGGTCCAGAAGGCCGGCGGCACCCGCGCTTCGTGCG	313
Escherichia coli	GCAGGTGATCGCCGAGCGCAGCGTGAAGGTAAACCTGTGCGTTTTATCG	283
Enterococcus faecium	ACACGCTATTGCAGAAGTACAAAAAAATGGCGAAGCCGCGCTTTCATTG	277
Enterococcus faecalis	ACACGCAATTGCAGAAGTGCAACGAAATGGTGGAACAGCCGCTTTTATCG	277
Campylobacter jejuni	ACATATTTATCGCAGAATGCCAAAAAGCAGGTGGAGTTTGTGCTTTTATCG	277
Legionella pneumophila	TCAAGTATCGCTGAATGTCAAAAAATGGGTGGTACAGCAGCATTTATCG	438
	* * * * *	
Pseudomonas aeruginosa	ACGCCGAGCACGCGCTCGATCCGACTATGCCGCAAGCTGGGCGTCAAC	327
Pseudomonas putida	ACGCCGAGCACGCCCTCGACCCTGAATACGGGGCAAGCTGGGCGTCAAC	327
Burkholderia cepacia	ACGCCGAGCACGCGCTCGACGCTCAAGTACGGCGCAAGCTCGGCGTCAAC	550
Caulobacter crescentus	ACGCCGAGCACGCGCTCGATCCGCTCCTACGCGTACAAGCTGGGCGTCAAC	363
Escherichia coli	ATGCTGAACACGCGCTGGACCCAATCTACGCACGTAACTGGGCGTCAAC	333
Enterococcus faecium	ATGCTGAGCATGCGTTAGATCCGCAATATGCACAAAAATTAGGTGTGAAT	327
Enterococcus faecalis	ATGCTGAGCATGCGTTAGATCCGCAATATGCAGAAAAATTAGGTGTGAAT	327
Campylobacter jejuni	ATGCAGAACATGCGCTTATGTAATAATGCTAAAAATTTGGGTGTAAT	327
Legionella pneumophila	ATGCCGAACATGCTCTGGATCCAAGCTATGCTCAGAACTTGGTGTGAAG	488
	* * * * *	
recAPsF	-----CTGGA4	4
Pseudomonas aeruginosa	GTTCGACGACCTGCTGGTCTCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCCCTGGA	377
Pseudomonas putida	GTAGACGACCTGCTGGTTTCGACGCCGACACCGGCGAACAGGCCCTGGA	377
Burkholderia cepacia	GTGCGGATCTGCTGATCTCGACGCCGACACCGGCGAGCAGGCCCTGGA	600
Caulobacter crescentus	CTCGATAATCTCCTGGTCTCTCAGCCGACAAACCGGCGAACAGGCCCTGGA	413
Escherichia coli	ATCGACAACCTGCTGTGCTCCAGCCGGACACCGGCGAGCAGGCACTGGA	383
Enterococcus faecium	ATCGATGAACACTCTTTTACAGCCTGACACAGGAGAAACAAGTCTAGA	377
Enterococcus faecalis	ATCGATGAACACTCTTTTATCTCAACCAGGATACGGGCGAGCAAGGCTAGA	377
Campylobacter jejuni	ACAGATGATTTGATGTTTCTCAGCCTGATTTTGGAGAACAGCCTTAGA	377
Legionella pneumophila	GTGGATGAGCTGTGGTTTCTCAGCCGGATACAGGCGAGCAAGCTCTGGA	538
	* * * * *	
recAPsF	AATCACCGACATG-----	18
Pseudomonas aeruginosa	AATCACCGACATGCTGGTGCCTTCCAACCGGTTGACGTGATCATCGTCG	427
Pseudomonas putida	AATCACCGACATGCTGGTGCCTTCCAACCGGTTGACGTGATCATCGTCG	427
Burkholderia cepacia	AATCACCGACCGCTGGTGCCTCGGGCTCGATCGACATCGTGCATCG	650
Caulobacter crescentus	GATCACCGACACCTTGGTGCCTCGGGCGCCGTCGACATCGTGGTCTGCG	463
Escherichia coli	AATCTGTGACGCCCTGGCGGTTCTGGCGAGTAGACGTTATCGTCTGTTG	433
Enterococcus faecium	GATCGCTGATGCTTTAGTATCAAGTGGGGCTGTAGATATCGTAGTAGTCG	427
Enterococcus faecalis	GATTGGCGATGCTTAGTATTCAAGTGGTGCATTTGACATCGTTGTCATCG	427
Campylobacter jejuni	AATTGTAGAACTATAGCAAGAAGTGGCGAGTAGATCTTATCGTAGTAG	427
Legionella pneumophila	AATTACTGATATGCTGGTGCCTTCTGCAGCGATTGATGTCGTAATAATTG	588
	* * * * *	
Pseudomonas aeruginosa	ACTCCGTGGCCGCGCTGGTACCCAAGGCCGAGATCGAAGGCGAGATGGGC	477
Pseudomonas putida	ACTCCGTGGCCGCGCTGGTGCAGAGGCCGAGATCGAAGGCCGAAATGGGT	477
Burkholderia cepacia	ACTCCGTGGCCGCGCTGGTGCAGAGGCCGAAATCGAAGGCCGAGATGGGC	700
Caulobacter crescentus	ACTCCGTGGCCGCGCTGACGCCAAGGCCGAAATCGAAGGCCGAGATGGGC	513
Escherichia coli	ACTCCGTGGCCGCGCTGACGCCAAGGCCGAAATCGAAGGCCGAAATGGGC	483
Enterococcus faecium	ATTCAGTTGCTGCTTTAGTTCACGAGCAGAAATCGACGGCGAAATGGGT	477
Enterococcus faecalis	ACTCCGTGGTGCCTTGTGCTTCTCGTGCAGAGATTGATGGTGGATGGGA	477
Campylobacter jejuni	ATAGCGTTGACGCACTTACTCCAAAAGCAGAAATCGAAGGCCGATGGGC	477
Legionella pneumophila	ACTCCGTGGTGCCTTACTCCAAAAGCAGAAATCGAAGGCCGATGGGC	638
	* * * * *	

rAEntR	-----ATGCTCAAGCATTGCGTAA-----	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GACGCCACGTCGGCCTGCAGGCAGCCTGATGTCCAGGCGTGCACAA	527
<i>Pseudomonas putida</i>	GACATGCACGTGGGCTGCAGGCTCGCCTGATGTCCAGGCGTGCACAA	527
<i>Burkholderia cepacia</i>	GATTTCGCTGCCGGCTGCAGGCGCGCCTGATGTCCAGGCGTGCACAA	750
<i>Caulobacter crescentus</i>	GACAGCCTGCCGGTCTTCAAGCCGCTGATGAGCCAGGCGTGCACAA	563
<i>Escherichia coli</i>	GACTCTCACATGGGCTTGCAGCAGTATGATGAGCCAGGCGTGCACAA	533
<i>Enterococcus faecium</i>	GACTCACATGTCCGGTTACAAGCAGTGTGATGTCTCAAGCATTGCGTAA	527
<i>Enterococcus faecalis</i>	GCCAGCCATGTCGGCTTACAAGCTCGACTAATGTCTCAAGCATTGCGTAA	527
<i>Campylobacter jejuni</i>	GATCAACATGTAGGACTTCAAGCAAGACTTATGTCTCAAGCTCTAAGAAA	527
<i>Legionella pneumophila</i>	GATTCATGTTGTTTACAGGCAAGATTGATGTCCAGGCGTGCACAA	688
	* * * * *	
rAEntR	A-----	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GATCACC GGCAATCAAGAACGCCAACTGCCTGGTCATCTTCATCAACC	577
<i>Pseudomonas putida</i>	AATCACC GGTAACATCAAGAACGCCAACTGCCTGGTCATCTTCATCAACC	577
<i>Burkholderia cepacia</i>	GCTGACGGGCAGATCAAGCGCAGCAACTGCCTCGTGCATCTTCATCAACC	800
<i>Caulobacter crescentus</i>	GCTGACGGCTCGATCAACAAGGCCAACACCATCGTCATCTTCATCAACC	613
<i>Escherichia coli</i>	GCTGGGGGTAACCTGAAGCAGTCCAACACGCTGCTGATCTTCATCAACC	583
<i>Enterococcus faecium</i>	ACTCTCTGGTTCGATCAACAAAACAAAACAATCGCTATTTTCATCAACC	577
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATTATCAGGCTCAATTAATAAGACAAAACAATTGCTATTTTCATCAACC	577
<i>Campylobacter jejuni</i>	ACTTACAGGTATAGTTCATAAAATGAATACCACAGTAATTTTTCATCAACC	577
<i>Legionella pneumophila</i>	ATTGACCGCTAACATTAACGTTGCAACACACTGGTATTTTTCATTAATC	738
	* * * * *	
recAPSR	-----GAAACCACC-----	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AGATCCGCATGAAGATCGGCGTCAATG---TTCGGCAACCCGGAAACCACC	624
<i>Pseudomonas putida</i>	AGATCCGTATGAAGATCGGCGTAAATG---TTCGGCAGCCCGGAAACCACC	624
<i>Burkholderia cepacia</i>	AGATCCGCATGAAGATCGGCGTCAATG---TTCGGCAACCCGGAAACCACC	847
<i>Caulobacter crescentus</i>	AGATCCGTCAAGATCGGCGTCAATG---TTCGGCAACCCGGAAACCACC	660
<i>Escherichia coli</i>	AGATCCGTATGAAAATGGTGTGATG---TTCGGTAACCCGGAAACCACC	630
<i>Enterococcus faecium</i>	AAATCCGTGAAAAAGTAGGCGTCAATG---TTTGGGAATCCAGAAATCACT	624
<i>Enterococcus faecalis</i>	AAATTCGTGAAAAAGTAGGCGTCAATG---TTCGGAAATCCGAAATCACT	624
<i>Campylobacter jejuni</i>	AAATTCGTATGAAAATCGGTGCTATGGGTATGGCACTCCTGAAACTACA	627
<i>Legionella pneumophila</i>	AAATACGTATGAAAATGGTGTGATG---TTTGGTAGCCCTGAAACTACT	785
	* * * * *	
recAPSR	ACCGGCGGTAA-----	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ACCGGCGGTAAACGCACTGAAGTCTACGCCTCGGTCCGCTGGACATCCG	674
<i>Pseudomonas putida</i>	ACCGGCGGTAAACGCACTGAAGTCTACGCCTCGGTCCGCTGGACATCCG	674
<i>Burkholderia cepacia</i>	ACCGGCGGCAACGCGCTGAAGTCTTATCGTCCGTCGCTGACATCCG	897
<i>Caulobacter crescentus</i>	ACCGGCGGCAACGCGCTGAAGTCTTACGCTTCAAGTCCGCTGGATATCCG	710
<i>Escherichia coli</i>	ACCGGCGGTAAACGCGCTGAAGTCTACGCCTCTGTTGCTTCGACATCCG	680
<i>Enterococcus faecium</i>	CCTGGAGGACGCGCATGAAATCTACGCAACGATCCGTTTGAAGTAGC	674
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCTGGTAGCAGCTGATGAAATCTACGCAACGTTCTGCTGAAAGTCCG	674
<i>Campylobacter jejuni</i>	ACAGGTGAAATGCATTAATAATCTATGCTTCTGTCGCTTAGATGTTAG	677
<i>Legionella pneumophila</i>	ACAGGGGGCAATGCTTTGAAGTTTATGCTTCAAGTTCGTTTGGATATCCG	835
	* * * * *	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TCGTACCGGCGCGGTGAAGGAAGGCGACGAGGTGGTGGGTAGCGAAACCC	724
<i>Pseudomonas putida</i>	TCCGACCGGTGCGGTCAAGGAAGGCGACGAGGTGGTGGGTAGCGAAACCC	724
<i>Burkholderia cepacia</i>	CCGATCGGCTCGATCAAGAAGAACGACGAGGTGATCGGCAACGAAACGC	947
<i>Caulobacter crescentus</i>	CCGCACCGCTCGGTGAAGGCGCGTGAAGATCGTCCGCAACAAATGTCC	760
<i>Escherichia coli</i>	TCGTATCGGCGCGGTGAAGGAGGGCGAAAACGTTGGTGGGTAGCGAACCC	730
<i>Enterococcus faecium</i>	TCGTGCAGAACAAATGAAACAAGGTACAGATATTGTTGGTAACCGTACAA	724
<i>Enterococcus faecalis</i>	TCGTGCAGAACAGTTAAAACAAGGAACAGACATCGTCCGTAACCGCACAA	724
<i>Campylobacter jejuni</i>	AAAAGTAGCAACCTTAAAAACAAGGAAGAACCTATAGGAACCGGTTA	727
<i>Legionella pneumophila</i>	CCGTATTGGTTCAATTAAGGGGTGAAGAAATATTAGGCAGTGAACCC	885
	* * * * *	
ra2R_	-----AAGGTGGTCAAGAACAAGCTTGCTA-----	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GCGTCAAGTGGTGAAGAACAAGTTTCCCGCCGTTCCGCCAGGCCGAG	774
<i>Pseudomonas putida</i>	GCGTCAAGATCGTCAAGAACAAGTTTCCGCCACCGTTCCGTCAAGCCGAG	774
<i>Burkholderia cepacia</i>	GCGTGAAGTTCGTCAGAACAAGTTGTCGCCCGCTTCCGCCAAGCGATC	997
<i>Caulobacter crescentus</i>	GCGTGAAGTGGTGAAGAACAAGTTGGCCCGGCTTCCGCCAAGCGATC	810
<i>Escherichia coli</i>	GCGTGAAGTGGTGAAGAACAAGTTGCTGCGCCGTTTAAACAGGCTGAA	780
<i>Enterococcus faecium</i>	AGATCAAAGTTCGTAAGAAACAAGTAGCACCTCCTTTCAAATCGCTGAA	774
<i>Enterococcus faecalis</i>	AAATTAAGTTCGTTAAAGAAACAAGTTGGCCGACCATTTAAAGTGGCAGAA	774
<i>Campylobacter jejuni</i>	AAGTAAAAGTAGTTAAAAATAAAGTTGCTCCTCCATTACAGCAAGCTGAA	777
<i>Legionella pneumophila</i>	GAGTTAAAGTAGTTAAAAATAAAGTAGCGCCACCGTTTAAATGACTGAG	935
	* * * * *	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TTCCAGATCTCTACGGTAAGGGCATCTACCGTACCGGCGAGATCATCGA	824
<i>Pseudomonas putida</i>	TTCCAGATCTCTACGGCAAGGGTATCTACCGCAATGGCGAAATCATCGA	824
<i>Burkholderia cepacia</i>	TTCCAGATCTCTACGGCAGGGGCAATTTCCGCTCAGGGCGAGATCATTGA	1047
<i>Caulobacter crescentus</i>	TTCCAGATCTCTACGGCAGGGGCAATTTCCGCTCAGGGCGAGATCATTGA	860
<i>Escherichia coli</i>	TTCCAGATCTCTACGGCAGGGTATCAACTTCTACGGCGAACTGTTTGA	830
<i>Enterococcus faecium</i>	GTAGATGTATGATGTTTGGTATGATCTCACAAAGAAAGGAGACTTAGA	824
<i>Enterococcus faecalis</i>	GTTGATATCATGTATGGCCAGGTTATTTCCAAGAAGGCGAATTAAGTA	824
<i>Campylobacter jejuni</i>	TTTGATGTGATGTTTGGAGAGGGTTTAAAGCGTGAAGGTGAATGATCGA	827
<i>Legionella pneumophila</i>	TTTGATTTTATATAACGAAGGTTATATCTCGTGAGAGTGAATTTAA	985
	* * * * *	

A2. Alignment von *Caulobacter crescentus* recA-Gen mit rA2F/rA2R und TQrecAF/R/P:

Bakterium/Gensequenz:

NCBI: >gj|13422388:3701-4771 *Caulobacter crescentus* CB15 section 112 of 359 of the complete

Alignment:

Caulobacter crescentus	ATGACAAGTCAGGCGCTTTGAAACTCGTGGCCAAGGAAGAAGGCGATAA	50
Caulobacter crescentus	GCAACGCGCGCTAGAGGCGGCTCTCGCCAGATCGACCGCGGTTTCGGCA	100
Caulobacter crescentus	AGGGCTCGGTGATGAAGCTGGGCGAGAAGGCAAGTTCGAGATCGAGTCG	150
Caulobacter crescentus	GTCTCCACCGGGTCGCTCGGCCTCGACATCGCGCTGGGCATCGGCGGCT	200
Caulobacter crescentus	GCCCAAGGGCCGGATCGTCGAGGTCTATGGTCCGGAAAGCTCGGGCAAGA	250
rA2F	-----CGGAATTCTCGGGCAAGA	18
Caulobacter crescentus	CCACCCTGGCCCTGCACGTCGTGGCCGAGGTCCAGAAGGCCGGCGGCACC	300
rA2F	CCACC-----	23
Caulobacter crescentus	GCCGCCTTCGTCGACGCCGAGCATGCGCTCGATCCGTCCTACGCCTACAA	350
Caulobacter crescentus	GCTGGCGTCAATCTCGATAATCTCCTGGTCTCTCAGCCGACAACGGCG	400
Caulobacter crescentus	AACAGGCCCTGGAGATCACCGACACCCTGGTGCCTCGGGCGCCGTCGAC	450
Caulobacter crescentus	ATCGTGGTCGTCGACTCGGTGGCGGCCCTGACGCCAAGGCCGAAATCGA	500
Caulobacter crescentus	AGGCGAGATGGGCGACAGCCTGCCGGTCTTCAGGCCGTCTGATGAGCC	550
Caulobacter crescentus	AGGCGCTGCGCAAGCTGACGGCCTCGATCAACAAGGCCAACACCATCGTC	600
TqrecA_F	-----CAAGCTGACCGCCTCGAT	18
TqrecA_P	-----ACAAGGCCAACACCATCGTC	20
Caulobacter crescentus	ATCTTCATCAACCAGATCCGTCACAAGATCGGGGTGATGTACGGCAGCCC	650
TqrecA_P	ATCTTCATC-----	29
TqrecA_R	-----AGATCGGSGTAGTGTACGG	19
Caulobacter crescentus	CGAAACGACCACGGGCGGCAACGCGCTGAAGTTCTACGCTTCAGTGCGCC	700
Caulobacter crescentus	TGGATATCCGCCGACCCGGCTCGGTGAAGGCGCGTGACGAGATCGTCGGC	750
Caulobacter crescentus	AACAATGTCCGCGTGAAGGTGGTCAAGAACAAGGTGGCCCCGCGTTCCG	800
rA2R	-----AAGGTGGTCAAGAACAAGCTTGCTA	25
Caulobacter crescentus	CGAGGTCGAGTTCGACATCATGTACGGCGAGGGCATCTCCAAGCTGGGCG	850
Caulobacter crescentus	AAGTCATCGACCTAGGCGTCAAAGCCGGGATCATCGACAAGGCCGGCTCG	900
Caulobacter crescentus	TGGTTCTCGTACGGCAGCCAGCGGATCGGCCAGGGCCGCGACAATGTCCG	950
Caulobacter crescentus	CGAGTTCCTGAAGAACAACCCGACGTCGCCGCCGACATCGAAAAGGCTG	1000
Caulobacter crescentus	TCCGCAAGTCGTCGAGAAGATCGAAGAAGAGCTTCTGGTCGGCGGCCCG	1050
Caulobacter crescentus	GAAGAGGGCGAAGAGGACTAG	1071

A3. Alignment von *Aquabacterium commune* recA-Gen mit rAcomF/rAcomR:**Bakterium/Genesequenz:**

Aquabacterium commune: recA-Gen, eigene Sequenzierung.

Alignement:

rAcomF	-----AGGCCGAACTCGAAGGTGAAAT-----	22
A. commune	ACGCCCAAGGCCGAACTCGAAGGTGAAATGGGCGACGCGCTGCCCGCCTGCAGGCCCGC	60
A. commune	CTGATGAGCCAGGCCTTGCGCAAGCTGACGGCCAACATCAAGAAGACGAACTGCACCGTC	120
A. commune	ATCTTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCGTGATGTTCCGCAGCCCCGAAACCACC	180
A. commune	ACCGGTGGCAACGCGCTGAAGTTCTACGCGTCTGTGCGCCTGGACATCCGCCGCACCGGT	240
A. commune	TCCATCAAGCGCGGCGAAGAGATCGTGGGCAACGAAACCAAGGTCAAGGTCGTCAAGAAC	300
rAcomR	-----TTCAAGACCGCTGAATTCGACAT-----	23
A. commune	AAGGTGGCGCCCCCTTCAAGACCGCTGAATTCGACATCCTGTACGGCGAGGGCATCAGC	360
A. commune	CGCGAAGGCGAGGTCATCGACCTGGGTGTCACCGCCAAA	399

A4: Aligement des recA-Gens von verschiedenen Enterokokken aus NCBI:**Bakterien/Gensequenz:**

>gi|47678127|emb|AJ621702.1| ***Enterococcus avium*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 7983T
>gi|47678129|emb|AJ621703.1| ***Enterococcus gallinarum*** recA gene for RecA recombinase, strain LMG 13129T
>gi|47678131|emb|AJ621704.1| ***Enterococcus cecorum*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 27299T
>gi|47678133|emb|AJ621705.1| ***Enterococcus columbae*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 27894T
>gi|47678135|emb|AJ621706.1| ***Enterococcus durans*** recA gene for RecA recombinase, strain LMG 10746T
>gi|47678137|emb|AJ621707.1| ***Enterococcus faecium*** recA gene for RecA recombinase, strain LMG 11423T
>gi|47678139|emb|AJ621708.1| ***Enterococcus hirae*** recA gene for RecA recombinase, strain LMG 6399T
>gi|47678141|emb|AJ621709.1| ***Enterococcus malodoratus*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 30572T
>gi|47678143|emb|AJ621710.1| ***Enterococcus mundtii*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 18656T
>gi|47678145|emb|AJ621711.1| ***Enterococcus pallens*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 45554T
>gi|47678147|emb|AJ621712.1| ***Enterococcus pseudoavium*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 33310T
>gi|47678149|emb|AJ621713.1| ***Enterococcus raffinosus*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 29292T
>gi|47678151|emb|AJ621714.1| ***Enterococcus ratti*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 43228T
>gi|47678153|emb|AJ621715.1| ***Enterococcus saccharolyticus*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 27643T
>gi|47678155|emb|AJ621716.1| ***Enterococcus solitarius*** recA gene for RecA recombinase, strain LMG 12890T
>gi|47678157|emb|AJ621717.1| ***Enterococcus sulfureus*** recA gene for RecA recombinase, strain CCUG 30571
>gi|47678159|emb|AJ621718.1| ***Enterococcus villorum*** recA gene for RecA recombinase, strain LMG 12287T
>gi|29374661:c3045517-3044471 ***Enterococcus faecalis*** V583, complete genome

Alignment der oben aufgelisteten Enterococcen-recA-Sequenzen und der recA-spezifischen Primer rAEntF/rAEntR TQrAEntF/R/P:

.....		
rAEnt F	-----TACACGCTATTGCAGAAGTACAA-----	23
TQrAEntF	-----CGCTATTGCAGAAGTACAAA-----	20
faecalis	GAGTTCAGGTA AAAACA ACTGTTTCTTTACACGCAATTGCAGAAGTGC AAC	250
faecium	AAGTTCAGGTA AAAACA ACAGTTGCAC TACACGCTATTGCAGAAGTACAAA	250
malodoratus	AAGTTCTGGTAAAACACGGTGGCATTGCATGCAATCGCAGAAGTGCAAA	250
raffinosis	AAGTTCTGGTAAAACACGGTGGCATTACATGCCATCGCGAAAGTCCAAA	250
avium	AAGTTCTGGTAAAACACGGTGGCATTGCATGCGATTGCAGAAGTTCAAA	250
pseudoavium	AAGTTCAGGTA AAAACA ACCGTTGCCTTGCACGCAATCGCAGAGGTTCAAA	250
pallens	AAGCTCTGGTAAAGACCACTGTAGCGTTACATGCGATTGCTGAAGTCAAAA	250
mundtii	AAGTTCAGGTA AAAACA ACAGTTGCCTCCATGCAATCGCAGAAGTCCAAA	250
durans	AAGTTCAGGTAAGACCACAGTTGCCTTACATGCAATGCTGAAGTACAAA	250
hirae	AAGTTCAGGTAAGACCAACCGTTGCCTTGCATGCAATCGCTGAAGTACAAA	250
villorum	AAGTTCAGGTA AAAACA ACAGTTGGCATTACATGCGATTGCCGAAGTGCAGA	250
ratti	AAGTTCAGGTA AAAACA ACCGTTGCTTACATGCAATGCTGAAGTACAAA	250
gallinarum	AAGTTCTGGTAAAACACAGTTGCTTACACGCAATCGCTGAAGTCAAAA	250
saccharolyticus	AAGTTCTGGTAAAACAACGGTGGCTTACATGCTGTTGCAGAAGTTCAAA	250
solitarius	AAGTTCTGGTAAAACA ACTGTTGCTTTCATGCTGTAGCTGAGGTACAAA	250
columbae	AAGTTCTGGTAAAACAACAGTGCCTTACATGCCATTGCTGAAGTACAAA	250
sulfureus	AAGTTCTGGTAAAACAACAGTGCATTACATGCTATAGCTGAAGTTCAAA	250
cecorum	AAGTTCTGGTAAAGACGAGGTTGCTTACATGCGATTGCCGAAGTTCAAA	250
TQrAEntR	AAAATC-----	26
TQrAEntR	-----GGGAACGGCCGCTTTCATTGATC-----	23
TQrAEntR	-----AGCATGCGTTAGATCCG-----	17
faecalis	GAAATGTTGGAAACAGCCGCTTTATCGATGCTGAGCATGCATTGGATCCT	300
faecium	AAAATGTTGGAAACGGCCGCTTTTCATTGATGCTGAGCATGCGTTAGATCCG	300
malodoratus	AACATGGCGGCACGGCAGCCTTTATCGATGCGGAGCAGCAGCCTTAGATCCT	300
raffinosis	AGCATGGTGGTACCGCAGCCTTTATCGATGCTGAACATGCGTTGGATCCT	300
avium	AACATGGCGGCACGGCAGCCTTTATCGATGCGGAGCAGCAGCCTTAGATCCT	300
pseudoavium	AACATGGTGGTACAGCAGCTTTATCGATGCTGAGCATGCCCTTAGATCCT	300
pallens	AGCAAGGCGGAACGGCAGCCTTTATCGATGCGAGCATGCATTGGACCCG	300
mundtii	AAAATGGTGGGACTGCCGCTTTATCGATGCGGAAACATGCCTTAGATCCA	300
durans	GAAATGGTGGCAGCAGCAGCTTTATTGATGCTGAACATGCCTTAGATCCA	300
hirae	AAAATGGCGGAACAGCCGCTTTATCGATGCTGAGCATGCCTTAGATCCA	300
villorum	AAAATGGGGGAACGGCTGCTTTTATCGATGCTGAGCATGCCTTAGATCCA	300
ratti	AAAATGGTGGGACAGCAGCTTTATTGATGCGGAGCATGCCTTAGATCCA	300
gallinarum	AAGGCGCGGAACAGCAGCCTTTATCGATGCGAGAACATGCATTAGATCCT	300
saccharolyticus	AACAAGGTGGAACTGCCGCTTTATTGATGCGAGCAGCCTTAGATCCT	300
solitarius	AACAAGGCGGAACGCTGCTTTATTGATGCGAAGAACGCACTAGATCCG	300
columbae	AAAATGGTGGAAACGGCTGCCTTTATTGATGCTGAGCATGCCCTAGATCCA	300
sulfureus	AAAATGGTGGAAACAGCAGCTTTATTGATGCGGAAACATGCCTTAGATCCT	300
cecorum	AACAAGGCGGAACGCAAGCCTTTATCGATGCGGAAACAGCCTTAGATCCA	300
TQrAEntR	CA-----	19
faecalis	CAATATGCGGAGAAACTAGGCGTTAACATCGATGAATTACTTTTATCTCA	350
faecium	CAATATGCACAAAAATTAGGTGTGAATATCGATGAATACTTCTTTTACA	350
malodoratus	CAATACGCACAGCGCTTAGGTGTAAACATTGATGAGCTGTTACTTTTACA	350
raffinosis	CAATACGCACAGCGCTTAGGTGTAAATATCGATGAGCTGCTGCTTTTACA	350
avium	CAATACGCACAACTGCTAGGTGTAAACATTGATGAATTGCTGCTATCACA	350
pseudoavium	CAATATGCACAGCGCTTTGGGTGTCAATATCGACGAACTACTGCTTTTACA	350
pallens	CAATATGCACAGCACTTAGGCGTCAATATTGATGAATATTGCTTTTCCA	350
mundtii	CAATATGCCCCAAAAATTAGGGGTAATATCGATGAATTACTCCTTTTCTCA	350
durans	CAATATGCCCCAAAAATTAGGCGTAAATATCGATGAATTACTTCTTTTCTCA	350
hirae	CAATATGCTCAAAAAATTAGGGGTAACATTTGACGAATTACTTCTTTTACA	350
villorum	CAATATGCACAAAAACTCGGTGTAATATTGATGAATACTTCTTTTCCA	350
ratti	CAATACGCACAAAAATTGGGCGTGAATATTGACGAATTTGCTGCTTTTACA	350
gallinarum	CAATATGCACAAAAATTGGGTGTAATATCGATGATTTGCTGCTATCTCA	350
saccharolyticus	CAATATGCAGAAAAATTAGGTGTAATATTGATGAATACTTCTTTTCTCA	350
solitarius	CAATATGCAGAACATTTGGGTGTAAACATCGATGAATTTGTTGTTATCACA	350
columbae	GCTTATGCCAAAAAATTAGGTGTGAATATTGATGAGCTATTGCTTTTCTCA	350
sulfureus	AAATATGCTTCTAATCTTGGTGTAAATATTGATGATTACTTTTATCACA	350
cecorum	GCCTATGCCAAAAAGCTAGGCGTGAATATTGACGAATTACTTTTATCACA	350
faecalis	ACCAGATACGGGCGAGCAAGGCTTAGAGATTGCCGATGCCTTAGTTTCAA	400
faecium	GCCTGACACAGGAGAAACAAGGCTTAGAGATCGCTGATGCTTTAGTATCAA	400
malodoratus	ACCAGATACTGGTGAACAAGGATTAGAGATCGCTGATGCTTTAGTTTCTA	400
raffinosis	GCCAGATACTGGTGAACAAGGCTTAGAGATCGCTGATGCATTAGTTTCCA	400
avium	ACCAGATACTGGGGAACAAGGCTTAGAAAATTGCAGATGCTTTAGTTTCAA	400
pseudoavium	ACCAGATACTGGCGAACCAAGGATTAGAAAATTGCTGATGCCTTTGGTTTCTA	400
pallens	ACCAGATACTGGTGAACAAGGTTTGGAAATTGCTGACGCATTGGTATCCA	400
mundtii	ACCAGATACTGGGAGAAACAAGGATTAGAGATCGCTGATGCTTTAGTATCAA	400
durans	ACCTGATACTGGTGAACAAGGATTAGAAAATTGCTGATGCTTTAGTATCAA	400
hirae	ACCAGATACTGGGGAACAAGGACTAGAAAATTGCTGATGCGCTTGTATCAA	400
villorum	ACCAGATACTGGCGAACCAAGGTTTAGAAAATTGCAGATGCTTTAGTGTCTA	400
ratti	ACCAGACACTGGTGAACAAGGTTTAGAAAATTGCTGATGCTTTAGTATCAA	400
gallinarum	GCCCCATACAGGTGAGCAAGGCTTAGAGATCGCTGATGCTTTAGTATCAA	400
saccharolyticus	ACCAGATACTGGTGAACAAGGCTTAGAAAATTGCCGATGCATTAGTATCAA	400
solitarius	ACCTGATACTGGGGAACAAGGCTTGGAAAATTGCTGATGCATTAGTTTCAA	400
columbae	GCCAGATACTGGTGAACAAGGTTTAGAGATTGCCGATGCATTAGTTTCAA	400
sulfureus	ACCAGATACTGGGAGAAACAAGGACTTAGAGATTGCCGATGCTTTAGTTTCAA	400
cecorum	GCCAGATACTGGTGAACAAGGCTTAGAGATTGCTGATGCCCTTGGTTTCTA	400

Faecalis	GTGGTGCGATTGACATCGTTGTCATCGACTCGGTTGCTGCGTTAGTTCCT	450
Faecium	GTGGGGCTGTAGATATCGTAGTAGTCGATTGCTGCTTTAGTTCCA	450
malodoratus	GTGGTGCTGTTGATATTATCGTTATCGACTCAGTGGCGGCTTAGTACCG	450
raffinosus	GTGGCGCTGTTGATATCATCGTTATCGACTCAGTAGCGGCTTAGTACCG	450
avium	GTGGCGCAGTCGATATTATCGTTATTGACTCGGTGGCCGCGCTAGTCCCC	450
pseudoavium	GTGGTGCGGTTGATATTATCGTAATCGACTCTGTAGCAGCGTTAGTTCCA	450
pallens	GTGGTGCGTAGATATCGTAGTAGTCGATTGCTGCGTTGGTTCCT	450
mundtii	GTGGTGCGTAGATATTGTCGTTATCGACTCAGTAGCAGCTTTAGTACCA	450
durans	GTGGTGCGGTTGACATCGTTGTTGTCGATTCTGTAGCAGCTTAGTTCCT	450
hirae	GTGGTGCGTAGATATCGTAGTAGTCGATTGCTGCGTTGCAGCTTAGTTCCA	450
villorum	GTGGTGCTGTGGATATTGTCGTTGGTGGATTGCTGCGCTTAGTTCCA	450
ratti	GTGGAGCAATAGATATTGTTGTTGTTGATTCTGTGGCAGCTTAGTTCCA	450
gallinarum	GTGGAGCTGTCGATATTGTTGTTATCGACTCGGTTGCCGCTTAGTTCCA	450
saccharolyticus	GTGGTGCTGTTGATATTGTTGTTATTGACTCAGTAGCAGCTTAGTACCA	450
solitarius	GTGGTGCCGTAGATATTGTAGTAGTTGATTGATTGAGCAGCGCTAGTGCCA	450
columbae	GTGGTGCGTAGGATGTTATTGTCATCGACTCAGTAGCGGCTTAGTTCCA	450
sulfureus	GTGGTGCTGTAGATATGGTTGTTGTCGATTCTGTTGCAGCATTAGTTCCA	450
cecorum	GTGGCGCGGTCGATATTATTGTCATTGACTCAGTTGCCGCTTAGTGCCA	450
Faecalis	CGTGCAGAGATTGATGGTGAGATGGGAGCGAGCCATGTCGGCTTACAAGC	500
Faecium	CGAGCAGAAATCGACGGCGAAATGGGTGACTCACATGTCGGGTTACAAGC	500
malodoratus	CGTGCCGAAATCGATGGCGAAATGGGTGACGCTCACGTTGGTTTACAAGC	500
raffinosus	CGTGCCGAGATCGATGGAGAGATGGGAGACGCTCACGTTGGTTTGAAGC	500
avium	CGTGCTGAAATCGATGGCGAGATGGGTGATGCGCACGTTGGTCTGCAAGC	500
pseudoavium	CGAGCAGAAATTGATGGCGAAATGGGGACGCACACGTTGGTTTGAAGC	500
pallens	CGTGCGGAAATCGATGGTGAAATGGGTGACTCTCACGTTGGTTTGAAGC	500
mundtii	CGTGCAGAGATTGACGGGGAGATGGGTGACTCACACGTAGGGTTACAAGC	500
durans	CGTGCAGAAATTGATGGCGAAATGGGTGATTCTCACGTAGGGTTACAAGC	500
hirae	CGTGCTGAAATCGATGGAGAAATGGGTGACTCTCACGTAGGGTTACAAGC	500
villorum	CGTGCTGAAATCGACGGCGAAATGGGTGACTCACATGTTGGTCTACAAGC	500
ratti	CGGCAGAGATTGATGGTGAAATGGGCGATTCTCATGTTGGGTTACAAGC	500
gallinarum	AGAGCAGAGATCGATGGTGAAATGGGTGATACCCACGTTGGTCTTACAAGC	500
saccharolyticus	CGGCTGAAATTGATGGTGAGATGGGTGATGCTCACGTTGGTTTACAAGC	500
solitarius	AGAGCTGAAATTGACGGTGAAATGGGAGATGCCCATGTTGGCTTACAAGC	500
columbae	CGTGCTGAAATCGATGGTGAAATGGGTGATACGCATGTCGGCTTACAAGC	500
sulfureus	CGTGCTGAAATCGACGGTGAAATGGGTGCTTACACGTGGGTTACAAGC	500
cecorum	CGTGCCGAAATCGATGGCGAAATGGGGATACACACGTTGGGTTACAAGC	500
rAEnt_R	-----ATGTCTCAAGCATTGCGTAAA-----	21
Faecalis	TCGACTAATGTCTCAAGCACTACGTAAAATTATCAGGCTCAATTAATAAGA	550
Faecium	ACGTTTGATGTCTCAAGCATTGCGTAAAATTCTCTGGTTCGATCAACAAAA	550
malodoratus	TCGTTTGATGTCTCAAGCGTTGCGTAAAATTATCTGGTTCGATCAATAAAA	550
raffinosus	ACGTTTGATGTCTCAAGCGTTACGTAAAGTTGCTGGTTCGATTAACAAAA	550
avium	TCGTTTGATGTCAACAAGCATTGCGCAAGCTGTGAGGCTCTATCAACAAAA	550
pseudoavium	CCGTTTAAATGTCAACAAGCTTTGCGTAAAGTTATCTGGTTCATCAATAAAA	550
pallens	GCGTTTAAATGTCTCAAGCATTGCGTAAATTTATCTGGTTCGATTAATAAGA	550
mundtii	TCGTTTGATGTCTCAAGCCTTACGTAAACTCTCAGGATCGATCAACAAAA	550
durans	TCGCTAAATGTCTCAAGCATTACGTAAATTTGTCAGGATCGATCAATAAAA	550
hirae	TCGATTAATGTCAACAAGCATTGCGTAAACTATCTGGTTCGATCAATAAAA	550
villorum	TCGACTAATGTCAAGCATTGCGTAAATTTATCTGGCTCAATCAACAAAA	550
ratti	ACGCTTGATGTCAACAAGCGTTGCGTAAATTTATCTGGTTCGATTAATAAAA	550
gallinarum	CCGTTTGATGTCTCAAGCATTGCGTAAATTTATCTGGATCAATCAACAAGA	550
saccharolyticus	ACGTTTGATGTCTCAAGCATTACGTAAACTTTGAGGAACAATCAACAAAA	550
solitarius	GCGTTTGATGTCAACAAGCGCTACGTAAATTTATCTGGTTCGATTAATAAAA	550
columbae	ACGTTTGATGTGCAAGCTTTGCGTAAAGTTATCTGGTTCATTAATAAGA	550
sulfureus	ACGTTTGATGTCTCAAGCTCTACGTAAACTTTGAGGATCAATCAATAAAA	550
cecorum	CCGTTTAAATGTCTCAAGCCTTACGTAAATTTATCTGGTACGATTAATAAGA	550

gi		18076870	emb	AJ316162.1		PST	CGGTGGATGTGATCATCGTCTGACTCCGTGGCCGCGCTGGTCCCAAGGCT	226
gi		18076844	emb	AJ316149.1		PFL	CCATCGACGTGATCATTGTCTGATTCCGTGGCTGCACTGGTGCCAAAGGCC	226
gi		18076874	emb	AJ316164.1		PTO	CCATCGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076858	emb	AJ316156.1		PMA	CCATCGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076840	emb	AJ316147.1		PCH	CCATCGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076836	emb	AJ316145.1		PAU	CCATCGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076872	emb	AJ316163.1		PSY	CCATTGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076842	emb	AJ316148.1		PCI	CCGTTGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076834	emb	AJ316144.1		PAG	CCGTTGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076866	emb	AJ316160.1		PPU	CCGTTGACGTGATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076860	emb	AJ316157.1		PME	CTATCGACGTGATTATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076832	emb	AJ316143.1		PAE	CGGTGACGTGATCATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226
gi		18076868	emb	AJ316161.1		PRE	CGGTGACGTGATCATCGTGGTTCGACTCCGTGGCAGCCCTGGTACCGAAGGCT	226

gi		18076870	emb	AJ316162.1		PST	GAAATCGAAGGCGAGATGGGCGATACGACGTCGGCCTCCAGGCGCGTCT	276
gi		18076844	emb	AJ316149.1		PFL	GAAATCGAAGGCGAGATGGGCGATACGACGTCGGCCTCCAGGCTCGCCT	276
gi		18076874	emb	AJ316164.1		PTO	GAAATCGAAGGCGAAATGGGTGACATGCACGTTGGCCTGCAAGCCCTCT	276
gi		18076858	emb	AJ316156.1		PMA	GAAATCGAAGGCGAAATGGGTGACATGCACGTTGGCCTGCAAGCCCTCT	276
gi		18076840	emb	AJ316147.1		PCH	GAGATCGAAGGCGAGATGGGCGACATGCACGTTGGCCTGCAGGCCCGCCT	276
gi		18076836	emb	AJ316145.1		PAU	GAGATCGAAGGCGAGATGGGCGACATGCACGTTGGCCTGCAGGCCCGCCT	276
gi		18076872	emb	AJ316163.1		PSY	GAGATCGAAGGCGAAATGGGTGACATGCACGTTGGCCTGCAGGCCCGCCT	276
gi		18076842	emb	AJ316148.1		PCI	GAAATCGAAGGCGAAATGGGTGACATGCACGTTGGCCTGCAGGCCCGCCT	276
gi		18076834	emb	AJ316144.1		PAG	GAAATCGAAGGCGAAATGGGTGACATGCACGTTGGCCTGCAGGCCCGCCT	276
gi		18076866	emb	AJ316160.1		PPU	GAGATCGAAGGCGAAATGGGTGACATGCACGTTGGCCTGCAGGCCCGCCT	276
gi		18076860	emb	AJ316157.1		PME	GAAATCGAAGGTGAGATGGGCGACATGCACGTCGGTCTGCAGGCCCGACT	276
gi		18076832	emb	AJ316143.1		PAE	GAGATCGAAGGCGAGATGGGCGACGCCCACTCGGCCTGCAGGCCCGACT	276
gi		18076868	emb	AJ316161.1		PRE	GAGATCGAAGGTGAGATGGGCGATTCCACGTCGGCCTGCAAGTTCGCCT	276

TqrApsF							-----GCCTGCGCAAGATCAC-----	17
TqrApsP							-----CAATATCAAGAACGCCAACT-----	20
gi		18076870	emb	AJ316162.1		PST	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076844	emb	AJ316149.1		PFL	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAATGCCAACT	326
gi		18076874	emb	AJ316164.1		PTO	GATGTCCAGGCGCTGCGTAAATCACCGGTAACATCAAGAATGCCAACT	326
gi		18076858	emb	AJ316156.1		PMA	GATGTCCAGGCGCTGCGTAAATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076840	emb	AJ316147.1		PCH	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076836	emb	AJ316145.1		PAU	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076872	emb	AJ316163.1		PSY	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076842	emb	AJ316148.1		PCI	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076834	emb	AJ316144.1		PAG	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076866	emb	AJ316160.1		PPU	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076860	emb	AJ316157.1		PME	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076832	emb	AJ316143.1		PAE	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326
gi		18076868	emb	AJ316161.1		PRE	GATGTCCAGGCGCTGCGCAAGATCACCGGTAACATCAAGAACGCCAACT	326

TqrApsP							GCCTGGTC-----	28
TqrApsR							-----CTTCATCAACCAGATCCGCA-----	20
gi		18076870	emb	AJ316162.1		PST	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGTGTGATGTTT	376
gi		18076844	emb	AJ316149.1		PFL	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGTGTGATGTTT	376
gi		18076874	emb	AJ316164.1		PTO	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076858	emb	AJ316156.1		PMA	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076840	emb	AJ316147.1		PCH	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076836	emb	AJ316145.1		PAU	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076872	emb	AJ316163.1		PSY	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076842	emb	AJ316148.1		PCI	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076834	emb	AJ316144.1		PAG	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076866	emb	AJ316160.1		PPU	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076860	emb	AJ316157.1		PME	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076832	emb	AJ316143.1		PAE	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376
gi		18076868	emb	AJ316161.1		PRE	GCCTGGTCATATTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATCGGCCTGATGTTT	376

rAPSR							-----GAAACCACCACCGCG-----	16
gi		18076870	emb	AJ316162.1		PST	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGCGGTAATGCGCTGAAGTTCTACGCATC	426
gi		18076844	emb	AJ316149.1		PFL	GGTAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076874	emb	AJ316164.1		PTO	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076858	emb	AJ316156.1		PMA	GGTAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076840	emb	AJ316147.1		PCH	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076836	emb	AJ316145.1		PAU	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076872	emb	AJ316163.1		PSY	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076842	emb	AJ316148.1		PCI	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076834	emb	AJ316144.1		PAG	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076866	emb	AJ316160.1		PPU	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076860	emb	AJ316157.1		PME	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076832	emb	AJ316143.1		PAE	GGCAGCCCTGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426
gi		18076868	emb	AJ316161.1		PRE	GGCAGCCCGGAAACCACCACCGGTTGTAACGCCTGAAATTCTACGCCTC	426

gi	18076870	emb	AJ316162.1	PST	GGTTCGTCTAGACATCCGCCGTACCGGCGCGGTGAAGGAAGGCGACGAAG	476
gi	18076844	emb	AJ316149.1	PFL	GGTTCGTCTGGATATCCGTCGTACCGGCGCGGTGAAGGAAGGCGACGAAG	476
gi	18076874	emb	AJ316164.1	PTO	GGTCCGTCTGGATATCCGCCGTACTGGCGCGGTGAAGGAAGGTGACGAGG	476
gi	18076858	emb	AJ316156.1	PMA	GGTCCGTCTGGATATCCGCCGTACCGGCGCGGTGAAGGAAGGTGACGAGG	476
gi	18076840	emb	AJ316147.1	PCH	GGTTCGCCTGGATATCCGTCGTACTGGCGCGGTGAAGGAAGGTGACGAAG	476
gi	18076836	emb	AJ316145.1	PAU	GGTTCGTCTGGACATCCGTCGTACTGGCGCGGTGAAGGAAGGCGACGAAG	476
gi	18076872	emb	AJ316163.1	PSY	GGTACGTCTGGACATCCGCCGTACAGGCGCGGTCAAGGAAGGCGATGAAG	476
gi	18076842	emb	AJ316148.1	PCI	GGTACGTCTGGATATCCGCCGTACCGGCGCGGTGAAGGAAGGCGATGAAG	476
gi	18076834	emb	AJ316144.1	PAG	GGTTCGCCTGGACATCCGCCGTACCGGCGCGGTGAAGGAAGGCGATGAAG	476
gi	18076866	emb	AJ316160.1	PPU	GGTTCGTCTGGACATCCGCCGTACCGGTCGCGGTCAAGGAAGGCGACGAGG	476
gi	18076860	emb	AJ316157.1	PME	GGTTCGCCTGGACATCCGTCGTACTGGCGCGGTGAAGGAAGGCGAAGAAG	476
gi	18076832	emb	AJ316143.1	PAE	GGTCCGCCTGGACATCCGTCGTACTGGCGCGGTGAAGGAAGGCGACGAGG	476
gi	18076868	emb	AJ316161.1	PRE	CGTCCGCCTCGATATCCGCCGTACCGGCGCGGTGAAGGAGGCGAGGAAG	476
					** ** *	
.....						

R. Daten zum RNA-Gehalt

Tab. R1: RNA-Gehalt von *P. aeruginosa* #49 und #154 mit verschiedenen OD, verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m²). Mittelwert (MW) der gemessenen RNA-Werte in µg/mL und Standardabweichung (SD). Die Anzahl der Messungen sind in Klammern angegeben.

UV-Behandlung [J/m ²]	Verdünnung	MW [µg/mL]	SD	260/280 nm
#49: OD₆₀₀ = 0,15				
0	1:10	23,533(3)	0,351	1,973
100		26,467(3)	0,058	1,870
200		23,300(4)	0,316	1,596
300		21,233(3)	0,289	1,874
400		20,567(3)	0,551	1,985
500		31,700(3)	0,100	1,882
600		24,575(4)	0,300	1,857
#154: OD₆₀₀ = 0,16				
0	1:10	41,800(3)	0,100	1,926
100		34,133(3)	0,569	2,005
200		41,933(3)	0,306	1,902
300		42,533(3)	0,306	1,952
400		39,380(4)	0,669	1,942
500		41,725(4)	0,435	1,885
600		19,850(5)	0,311	1,946
#154: OD₆₀₀ = 0,08				
0	1:10	17,333(3)	0,462	1,897
100		15,575(4)	0,340	1,869
200		16,567(3)	0,306	1,907
300		17,267(3)	0,115	1,870
400		14,533(3)	0,208	1,968
500		13,767(3)	0,551	1,966
600		17,600(3)	0,557	1,946

P: Daten zum Proteingehalt

Tab. P1: Protein-Gehalt von *C. crescentus* mit verschiedenen OD, verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m²). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt in µg/mL. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0511x + 0,1072$, $R^2 = 0,9962$).

UV [J/m ²]	MW Abs.	SD	µg/mL
OD₆₀₀ = 0,05			
0	0,286	0,008	348,92
100	0,253	0,001	284,34
200	0,258	0,003	295,11
300	0,248	0,008	275,54
400	0,249	0,005	276,52
500	0,247	0,007	273,58
600	0,255	0,001	288,26
OD₆₀₀ = 0,1			
0	0,364	0,006	501,57
100	0,343	0,006	461,45
200	0,356	0,014	486,89
300	0,347	0,025	469,28
400	0,342	0,001	458,51
500	0,347	0,008	468,30
600	0,362	0,000	498,63
OD₆₀₀ = 0,2			
0	0,526	0,027	819,57
100	0,538	0,023	842,07
200	0,536	0,000	839,14
300	0,548	0,018	862,62
400	0,541	0,021	847,95
500	0,511	0,011	789,24
600	0,543	0,006	851,86

Tab. P2: Protein-Gehalt von *P. aeruginosa* mit verschiedenen OD, verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m²). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt in µg/mL. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0566x + 0,1282$, $R^2 = 0,9974$).

UV [J/m ²]	MW Abs.	SD	µg/µL
OD₆₀₀ = 0,05			
0	0,272	0,004	254,06
100	0,246	0,001	208,13
200	0,292	0,045	289,40
300	0,260	0,017	232,86
400	0,266	0,005	242,58
500	0,239	0,004	194,88
600	0,271	0,003	252,30
OD₆₀₀ = 0,1			
0	0,345	0,009	382,16
100	0,345	0,007	383,04
200	0,358	0,005	405,12
300	0,337	0,003	368,90
400	0,345	0,002	382,16
500	0,349	0,001	389,22
600	0,355	0,002	399,82
OD₆₀₀ = 0,2			
0	0,504	0,000	663,96
100	0,504	0,001	663,07
200	0,495	0,015	647,17
300	0,452	0,007	572,08
400	0,464	0,008	592,40
500	0,457	0,003	580,92
600	0,481	0,016	622,44
OD₆₀₀ = 0,01, 18 h			
0	0,364	0,011	416,61
100	0,360	0,004	409,54
200	0,364	0,001	416,61
300	0,358	0,013	405,12
400	0,374	0,023	434,28
500	0,374	0,009	433,39
600	0,379	0,038	443,11

Tab. P3: Protein-Gehalt von *E. faecium* mit $OD_{600}=0,2$, verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m^2) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2-27h). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt in $\mu g/mL$. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0485x + 0,1239$, $R^2 = 0,9969$).

UV [J/m^2]	MW	SD	$\mu g/mL$
2h			
0	0,535	0,011	847,63
100	0,448	0,010	668,25
200	0,448	0,006	668,25
400	0,4375	0,015	646,60
600	0,434	0,017	639,38
3h			
0	0,436	0,004	643,51
100	0,423	0,007	616,70
200	0,4215	0,005	613,61
400	0,41	0,001	589,90
600	0,413	0,016	596,08
6h			
0	0,3695	0,013	506,39
100	0,4185	0,005	607,42
200	0,4205	0,008	611,55
400	0,3675	0,032	502,27
600	0,429	0,001	629,07
20h			
0	0,479	0,008	732,16
100	0,431	0,006	633,20
200	0,405	0,013	579,59
400	0,4115	0,005	592,99
600	0,4015	0,008	572,37
27h			
0	0,4685	0,008	710,52
100	0,487	0,007	748,66
200	0,4515	0,019	675,46
400	0,432	0,007	635,26
600	0,4145	0,021	599,18

Tab. P4: Protein-Gehalt von *E. faecium* mit $OD_{600}=0,2$, verschiedenen UV-Intensitäten (0 und 100-600 J/m^2) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2-27h). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt in $\mu g/mL$. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0496x + 0,127$, $R^2 = 0,9961$).

UV [J/m^2]	MW Abs.	SD	$\mu g/mL$
2h			
0	0,323	0,008	395,16
100	0,3195	0,006	388,10
200	0,3225	0,006	394,15
400	0,3255	0,005	400,20
600	0,3125	0,011	373,99
3h			
0	0,33	0,011	409,27
100	0,3385	0,005	426,41
200	0,322	0,008	393,15
400	0,321	0,008	391,13
600	0,3215	0,012	392,14
5h			
0	0,4085	0,015	567,54
100	0,357	0,008	463,71
200	0,352	0,008	453,63
400	0,4225	0,016	595,77
600	0,426	0,018	602,82
20h			
0	0,2595	0,012	267,14
100	0,2565	0,015	261,09
200	0,256	0,010	260,08
400	0,2585	0,013	265,12
600	0,266	0,006	280,24
27h			
0	0,241	0,011	229,84
100	0,255	0,006	258,06
200	0,255	0,006	258,06
400	0,2495	0,006	246,98
600	0,2605	0,009	269,15

Tab. P5: Protein-Gehalt von *E. faecium* mit $OD_{600}=0,2$, unbehandelt und behandelt mit 400 J/m² UV-Behandlung, verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2-44h). Mittelwert (MW) der gemessenen Absorptionen (Doppel-Ansatz), deren Standardabweichung (SD) und der Proteingehalt in µg/mL. Regression der Eichgerade über BSA ($y = 0,0517x + 0,1251$, $R^2 = 0,9958$).

UV [J/m ²]	MW	SD	µg/mL
2h			
0	0,422	0,001	574,27
400	0,401	0,021	532,69
22h			
0	0,323	0,013	382,79
400	0,327	0,004	390,52
27h			
0	0,350	0,012	434,04
400	0,298	0,012	333,46
44h			
0	0,307	0,001	351,84
400	0,268	0,010	276,40

Tabellenverzeichnis

Tab. 2. 1: Primäre und opportunistische bakterielle Pathogene aus dem Wasser.	6
Tab. 2. 2: „Neue“ Krankheitserreger mit Relevanz für die Trinkwasseraufbereitung.	7
Tab. 2. 3: Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren für Trinkwasser in Deutschland (aus: Umweltbundesamt, 2005).	9
Tab. 2. 4: Daten und Fakten der Hg-Niederdruck- und –Mitteldrucklampen	14
Tab. 3. 1: Primersequenzen für einen Abschnitt auf der 16S-rDNA.	28
Tab. 3. 2: Primer- und Sondensequenzen („Primer/Probe“-Systeme) für die Real Time-PCR spezifisch für Abschnitte verschiedener <i>Quorum sensing</i> -Gene in <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	29
Tab. 3. 3: Bedingungen für den Sequenzier-Lauf.	33
Tab. 4. 1: Primer zur Amplifikation von <i>recA</i> -Fragmenten.	58
Tab. 4. 2: „Primer/Probe“-Systeme zum quantitativen Nachweis von <i>recA</i> -mRNA mittels Real Time-PCR.	60
Tab. 4. 3: Eubakterielles „Primer/Probe“-System zur quantitativen PCR-Amplifikation von 16S- rDNA-Fragmenten mit dem TaqMan-System.....	60
Tab. 4. 4: Primer-Sequenzen, spezifisch für das Gen des Elongationsfaktors <i>EF-Tu</i> von <i>Caulobacter crescentus</i>	61
Tab. 4. 5: Untersuchte Bakterien mit detektierter Größe der RecA-Proteine im Western Blot- Verfahren.	62
Tab. 4. 6: RNA-Konzentrationen aus Kulturen von <i>Caulobacter crescentus</i>	63
Tab. 4. 7: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TaqrecA F/R/P spezifisch für das <i>recA</i> -Gen von <i>Caulobacter crescentus</i>	67
Tab. 4. 8: Protein-Gehalt der Extrakte aus <i>Caulobacter crescentus</i> -Kulturen mit verschiedenen Bakteriendichten (OD ₆₀₀).....	68
Tab. 4. 9: RNA-Konzentration aus Kulturen von <i>Aquabacterium commune</i> mit verschiedenen Zelldichten (OD ₆₀₀).....	71
Tab. 4. 10: Protein-Gehalt der Extrakte aus <i>Aquabacterium commune</i> -Kulturen mit unterschiedlichen Bakteriendichten (OD ₆₀₀).....	73
Tab. 4. 11: RNA-Konzentrationen aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD ₆₀₀) von 0,2.	75
Tab. 4. 13: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System EUB338 spezifisch für die 16S-cDNA nach reverser Transkription. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturen.	79
Tab. 4. 14: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TQrAPs F/R/P. Auswahl von Proben der Verdünnungsreihe des <i>recA</i> -PCR-Produktes von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
Tab. 4. 15: Protein-Gehalt aus Extrakten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturen mit einer Bakteriendichte (OD ₆₀₀) von 0,2.....	81
Tab. 4. 16: RNA-Konzentration aus <i>Enterococcus faecium</i> mit einer Bakteriendichte (OD ₆₀₀) von 0,2.	85

Tab. 4. 17: Real Time-PCR mit dem TaqMan-System TQrAEnt spezifisch für das <i>recA</i> -Gen von <i>Enterococcus faecium</i> mit einer Bakteriendichte (OD_{600}) von 0,2.	87
Tab. 4. 18: KBE-Bestimmung von <i>Enterococcus faecium</i>	90
Tab. 4. 20: RNA-Gehalt aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturen nach verschiedenen NaOCL-Behandlungen (3 – 0,03 mg/L) und Dunkelinkubationszeiten.	95
Tab. 4. 21: Proteingehalt von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturen nach verschiedenen NaOCL-Behandlung (0, I, II, III) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten.....	97
Tab. 4. 22: RNA-Gehalt von <i>Enterococcus faecium</i> -Kulturen nach verschiedenen NaOCL-Behandlungen und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten.	99
Tab. 4. 24: Proteingehalt von <i>Enterococcus faecium</i> -Kulturen nach verschiedenen NaOCL-Behandlungen (I, II, III) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h).. ..	102
Tab. 5. 1: Rohwasserherkunft in den Ländern der Datenerhebung (aus: Kühn et al., 2003)... ..	119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2. 1: Verschiedene Prinzipien der Trinkwasserdesinfektion mit relevanten Vor- und Nachteilen.	10
Abb. 2. 2: UV-Licht im elektromagnetischen Spektrum (aus: Liu, 2005)	11
Abb. 2. 3: Absorptionsspektrum der DNA (aus: Voet und Voet, 1994).	12
Abb. 2. 4: Relative spektrale Emission von einer typischen Niederdrucklampe (low pressure, LP, links) und einer Mitteldrucklampe (medium pressure, MP, rechts) (aus: UV-Xtender). 13	
Abb. 2. 5: Spektrale Energieverteilungskurve keimtötender Effekte und die Strahlungsleistung von Nieder- und Mitteldruck-UV-Lampen (aus: Lenntech).	13
Abb. 2. 6: Struktur der Haupt-Photoprodukte der DNA, die durch UV-Strahlung induziert werden (aus: Matsumura und Ananthaswamy, 2002).....	16
Abb. 2. 7: Stress auf Bakterien: genetische oder metabolische Antwort der Zelle.	17
Abb. 2. 8: Die SOS-Antwort bei Bakterien. O: Operator.	21
Abb. 2. 9: Methodisches Fließschema der Arbeit mit den verschiedenen Versuchsparametern.....	23
Abb. 2. 10: Schema der Proteinbiosynthese.....	25
Abb. 3. 1: Prinzip des Nachweises von Zielsequenzen durch quantitative Real Time-PCR.....	40
Abb. 3. 2: Amplifikationsverlauf bei der Real Time-PCR.	40
Abb. 3. 3: A: SDS-PAGE-Apparatur. B: Lauf eines SDS-PAGE Gels (aus: Alberts et al., 1997).....	43
Abb. 3. 4: Immunologischer Nachweis und Chemilumineszenzreaktion mit HRP bei der Western Blot-Analyse (aus: Amersham Bioscience).....	45
Abb. 3. 5: Schema zur Anzucht von Biofilmen auf Petrischalen-Aufwuchsträgern.....	47
Abb. 4. 1: PCR-Produkte der PCR mit den Primern r2AF und rA2R und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	50
Abb. 4. 2: Alignment der Primer rA2F und rA2R mit Ausschnitten aus <i>recA</i> -Sequenzen unterschiedlicher Bakterien.....	50
Abb. 4. 3: PCR-Produkte mit den Primern rA2F und rA2R von verschiedenen Umweltproben und Proben aus einem Wasserwerk, aufgetrennt in einen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	51
Abb. 4. 4: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAbF und rAbR, Annealing-Temperaturen von 50 und 55°C und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	52
Abb. 4. 5: Sequenzausschnitt des <i>recA</i> -Gens von <i>Aquabacterium commune</i> aus der Sequenzierungen mit der Primern rAbF und rAbR..	52
Abb. 4. 6: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAcomF und rAcomR und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	53

Abb. 4. 7: Alignment der Primer rAEntF und rAEntR mit Ausschnitten aus <i>recA</i> -Sequenzen verschiedener Enterokokken.....	54
Abb. 4. 8: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAEntF und rAEntR und verschiedenen Referenzbakterien als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.	55
Abb. 4. 9: Alignment der Primer rAEntF und rAEntR mit Ausschnitten aus <i>recA</i> -Sequenzen verschiedener Bakterien.....	55
Abb. 4. 10: Alignment der Primer rAPsF und rAPsR mit Ausschnitten aus <i>recA</i> -Sequenzen verschiedener Pseudomonaden.....	56
Abb. 4. 11: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAPsF und rAPsR und verschiedenen Pseudomonaden als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel..	56
Abb. 4. 12: Alignment der Primer rAPsF und rAPsR mit Ausschnitten aus <i>recA</i> -Sequenzen verschiedener Bakterien.....	57
Abb. 4. 13: PCR-Produkte der PCR mit den Primern rAPsF und rAPsR und verschiedenen Umweltproben und Proben aus einem Wasserwerk als Template, aufgetrennt in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	57
Abb. 4. 14: Northern Blot-Analyse verschiedener Gesamt-RNA-Proben.....	59
Abb. 4. 15: Western Blot-Analyse verschiedener Gesamt-Protein-Proben.....	62
Abb. 4. 16: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Caulobacter crescentus</i> . Nach Behandlung mit unterschiedlichen UV-Strahlungsintensitäten (0 und 100 – 600 J/m ²) und unterschiedlichen Zelldichten (OD ₆₀₀ = 0,05 - 0,25).....	64
Abb. 4. 17: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Caulobacter crescentus</i> . Nachweis mit <i>recA</i> -Sonde r2A und Nachweis mit 16S rRNA-Sonde EF-Tu.....	65
Abb. 4. 18: Northern Blot-Analyse von <i>Caulobacter crescentus</i> mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 260 - 310 J/m ²) und einer Bakteriendichte (OD ₆₀₀) von ca. 0,05. Oben: Nachweis mit <i>recA</i> -Sonde, rA2. Unten: Nachweis mit 16S-Sonde.	66
Abb. 4. 19: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Caulobacter crescentus</i> . Unterschiedliche UV-Strahlungsintensitäten (0 und 100-600 J/m ²) und unterschiedliche Zelldichten (OD ₆₀₀ = 0,1 bis 0,25).....	69
Abb. 4. 20: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Aquabacterium commune</i> . <i>recA</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten <i>recA</i> -Sonde (rAcom) detektiert. Unterschiedliche UV-Strahlungsintensitäten (0 und 100 – 600 J/m ²) und unterschiedliche Zelldichten (OD ₆₀₀ = 0,08 und 0,14).....	71
Abb. 4. 21: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Aquabacterium commune</i> mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 260 - 310 J/m ²) und einer Bakteriendichte (OD ₆₀₀) von ca. 0,06. Oben: Nachweis mit <i>recA</i> -Sonde rAcom. Unten: Nachweis mit 16S-Sonde.	72
Abb. 4. 22: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Aquabacterium commune</i>	74
Abb. 4. 23: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Unterschiedliche UV-Bestrahlungen (0 und 100 - 600 J/m ²) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (2 - 27 h).....	76
Abb. 4. 24: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Untersucht wurde die Zelldichte (OD ₆₀₀) 0,2 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungen (0 und 100 - 600 J/m ²) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2 - 27 h).....	82
Abb. 4. 25: Western Blot-Analyse von Gesamtprotein von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Untersucht wurden die Zelldichten (OD ₆₀₀) 0,05, 0,1 und 0,2.....	84

Abb. 4. 26: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Enterococcus faecium</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Unterschiedliche UV-Bestrahlungen (0 und 100 - 600 J/m ²) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (2 - 27 h).....	86
Abb. 4. 27: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Enterococcus faecium</i> . Untersucht wurde die Zelldichte (OD ₆₀₀) 0,2 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungsintensitäten (0 und 100 - 600 J/m ²) und verschiedenen Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h).....	89
Abb. 4. 28: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Enterococcus faecium</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Untersucht wurden unbehandelte Proben (0) und Proben nach 400 J/m ² UV-Bestrahlung nach unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten (2 – 27 h)	91
Abb. 4. 29: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Unterschiedliche Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (5 min – 22 h).....	96
Abb. 4. 30: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Unterschiedliche Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (5 min – 22 h).....	98
Abb. 4. 31: Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von <i>Enterococcus faecium</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Nach unterschiedlichen Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) aktives Chlor) und unterschiedlichen Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h).....	99
Abb. 4. 32: Western Blot-Analyse von Gesamt-Protein von <i>Enterococcus faecium</i> mit einer Zelldichte (OD ₆₀₀) von 0,2. Unterschiedlichen Behandlungen mit NaOCl (0 und 3 mg/L (I), 0,3 mg/L (II) und 0,03 mg/L (III) altives Chlor) und unterschiedliche Dunkelinkubationszeiten (15 min – 27 h).....	103
Abb. 4. 33: Mikroskopische Aufnahmen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Biofilmen.....	105

Lebenslauf

Name: Christina Jungfer
Geburtsdatum: 12.03.1976
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Breite Str. 73, 76137 Karlsruhe
Email: christinajungfer@web.de
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-1987 Südendschule in Karlsruhe
1987-1996 Goethe-Gymnasium in Karlsruhe

Hochschulbildung

10/1996- 12/2002 Diplombiologie an der Universität Karlsruhe (TH)
Diplomarbeit am Forschungszentrum Karlsruhe:
„Optimierung von Extraktionsverfahren aus Biofilmen natürlicher Umwelthabitate zur nachfolgenden molekularbiologischen Populationsanalyse.“
02/2003 – 06/2006 Promotion an der Universität Karlsruhe (TH).
(Ausführung am Forschungszentrum Karlsruhe, ITC-WGT, Abteilung Umweltmikrobiologie)

Tätigkeiten

1987-1996 Kinderchor des Badischen Staatstheaters Karlsruhe
Seit 1996 Statistin in der Sparte Musiktheater am Badischen Staatstheater
1992 Ferientätigkeit in einer Verpackungsfirma in Karlsruhe
1993-1994 Gruppenleitertätigkeit in der Pfarrei St. Elisabeth Karlsruhe
1994 Ausbildung zur Gruppenleiterin in der KJG in Karlsruhe
1993 – 2002 Cafe/Restaurant Zooterrassen Gass Karlsruhe
März 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie
2002 Wissenschaftliche Hilfskraft im Forschungszentrum Karlsruhe im ITC-WGT / Abteilung Umweltmikrobiologie

Sprachkenntnisse Englisch, Großes Latinum, Grundkenntnisse Französisch

Besondere Kenntnisse Kenntnisse in Word/Exel/Powerpoint
Kenntnisse in ARB-Software
