

# **Entwicklung einer *in vivo* Markierung und Separation bakterieller RNA und ihre Anwendung in der Biofilmforschung**

## **Dissertation**

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

**von**

**Dipl.-Biol. (t.o.) Nikolai Stankiewicz**

**geboren am 6. Januar 1979 in Celle**

**Tag der mündlichen Prüfung: 02. Dezember 2009**

**Referent:** Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb

**Korreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

**Institut für Funktionelle Grenzflächen**

**Karlsruher Institut für Technologie**

Karlsruhe 2009



**Erklärung:**

Ich versichere, dass die hier vorliegende Dissertation mit dem eingereichten und genehmigten Prüfungsexemplar der Doktorarbeit übereinstimmt.

Karlsruhe, den 07.12.2009

---

(N.Stankiewicz)



**Für Katha**



## **Danksagung**

Prof. Dr. Matthias Franzreb danke ich herzlich für seine Bereitschaft der Übernahme des Gutachtens und sein großes Interesse an dieser Arbeit und die fachlichen Diskussionen.

Prof. Dr. Christoph Syldatk danke ich dafür, dass er diese Arbeit als Korreferent begutachtet und für das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Thomas Schwartz danke ich für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit. Herzlich möchte ich mich außerdem für die vielen fachlichen Diskussionen und die Unterstützung in allen Phasen dieser Doktorarbeit bedanken. Außerdem danke ich ihm für die Anregungen und Hinweise während aller schriftlichen Ausarbeitungen.

Prof. Dr. Sonja Berensmeier danke ich für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit. Zusätzlich danke ich Ihr für die fachlichen Diskussionen und Anregungen im Verlauf dieser Arbeit und ihre Unterstützung bei der Schriftlichen Ausarbeitung.

Der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG danke ich als Industriepartner dieses Forschungsprojektes, der die Magnetpartikel-Technologie zur Verfügung stellte. Insbesondere Danke ich Dr. Uwe Jäntges.

Für die Förderung dieser Forschungsarbeit möchte ich mich bei der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AIF) herzlich bedanken.

Prof. Dr. Ursula Obst danke ich für die freundliche Aufnahme in Ihrem Labor und die fachlichen Diskussionen.

Yousra Yüksel, Andrea Gold und Thomas Teutenberg danke ich für Ihre Beiträge zu meiner Doktorarbeit, die sie während ihrer Praxissemester und Diplomarbeiten mit großem Interesse und Engagement erbracht haben.

Der gesamten Abteilung Mikrobiologie natürlicher und technischer Grenzflächen und der gesamten Abteilung Physikalisch-chemische Interaktion an Grenzflächen danke ich für die angenehme und freudige Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen. Besonders danke ich Jacqueline Suess, Annika Rieder, Kerstin Scheu und Mareike Marten für die erheiternden Mittagspausen.

Meiner Frau Katharina danke von ganzem Herzen für ihre Liebe, Motivation, Unterstützung, Geduld und Hilfe in allen Lebenslagen und dafür, dass sie immer für mich da ist.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich herzlich für Ihre uneingeschränkte Unterstützung und Motivation, die sie mir während meines Studiums, dieser Doktorarbeit und weit darüber hinaus gegeben haben.

## Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur *in vivo* Markierung und Separation bakterieller RNA. Die Verfügbarkeit eines solchen Verfahrens erleichtert die Erforschung von natürlichen bakteriellen Populationen, da sie deren RNA schnell und einfach zugänglich macht. Durch die gleichzeitige Markierung und Separation von mRNA und rRNA schließt das entwickelte Verfahren die Lücke zwischen der funktionellen und taxonomischen Analyse bakterieller Populationen unbekannter Zusammensetzung. In bestehenden Verfahren war es bisher nur mit hohem Zeit- und technologischen Aufwand möglich, eine Markierung der neu synthetisierten RNA mit ihrer Separation zu kombinieren.

Zur *in vivo* RNA Markierung wurde ein modifiziertes Nukleotid (Digoxigenin-11-Uridin-5`-Triphosphat) von den Mikroorganismen unter natürlichen Bedingungen aufgenommen und in ihre neu synthetisierte RNA eingebaut. Dies konnte sowohl für Gram-negative und Gram-positive Bakterien, als auch für natürliche Biofilme unbekannter Zusammensetzung gezeigt werden. Die von den Wachstumsbedingungen und der Populationszusammensetzung abhängige Einbaurrate, spezifisch in die RNA, lag zwischen 0,5% und 10%. Die Aufnahme und Markierung der Biofilme erfolgte im jeweils natürlichen Habitat und ohne direkte chemische oder mechanische Manipulation der Bakterien, wodurch eine Veränderung der Genexpression vermieden wurde.

Die Separation dieser Digoxigenin markierten RNA wurde über eine Magnetseparation realisiert. Durch die Verwendung eines biotinylierten Anti-DIG Antikörpers konnte die Digoxigenin markierte RNA spezifisch an streptavidinfunktionalisierte Magnetpartikel gebunden werden. Nach einer Optimierung konnte diese Separation sehr effizient mit Ausbeuten an markierter RNA von bis zu 97% in der Elutionsfraktion durchgeführt werden. Darüberhinaus war dieses Verfahren hochspezifisch durchführbar. Der Anteil an nicht markierten Nukleinsäuren, die unspezifisch an die Magnetpartikel banden, war mit weniger als 0,01% kaum nachweisbar.

In exemplarischen Populations- und Genexpressionsanalysen wurde die grundlegende Anwendbarkeit dieses Markierungs- und Separationsverfahrens erprobt. Die Analyse von natürlichen Biofilmpopulationen über die ribosomale RNA

(rRNA) zeigte, dass das Nukleotidanalogen von den Biofilmbakterien in die rRNA eingebaut wurde und damit die genetischen Fingerabdruckmuster auch nach der Separation die natürliche Zusammensetzung der Biofilme widerspiegelte. Unterschiede in den Einbauraten erlaubten dabei Rückschlüsse auf die physiologische Aktivität der Bakterien in ihrem jeweiligen Habitat.

Die Analyse der Genexpression von zwei stressinduzierten Genen zeigte darüberhinaus, dass eine spezifische Induktion dieser Gene auch nach der Separation über die markierte mRNA reproduzierbar nachgewiesen werden konnte. Der Einbau von DIG-11-UTP in die RNA war demnach direkt proportional zur Induktion der untersuchten Gene.

Im Hinblick auf eine Kommerzialisierung des entwickelten Verfahrens wurde eine Automatisierung der Separation mittels der magnetischen Separier- und Dosiereinheit chemagic Prepito™ realisiert.

Das Verfahren der *in vivo* Markierung und Separation bakterieller RNA dient somit dem besseren Verständnis der Biofilmentwicklung in natürlichen und technischen Systemen. Mit ihm kann sowohl mRNA, als auch rRNA aus unbekanntem Bakterien in natürlichen Habitaten markiert, separiert und analysiert werden. Dadurch kann diese Methode tiefere Einblicke in die Regulation, Funktion und Stressreaktion bakterieller Biofilme liefern. Die Automatisierung des Verfahrens erlaubt dabei den Einsatz des Verfahrens im Hochdurchsatz, was auch die Analyse sehr großer Transkriptome natürlicher Habitate erlaubt.

## **Abstract**

The work presented here focused on the development of a method for an *in vivo* labeling and separation of bacterial RNA in order to facilitate research into natural bacterial populations. The method developed is based on the simultaneous labeling and separation of mRNA and rRNA and, thus, closes the gap between functional and taxonomic analysis of bacterial populations of unknown composition.

Conventional methods require much time and a high technical expenditure to combine the labeling of newly synthesized RNA and its separation.

The *in vivo* RNA labeling is uses microorganisms under natural conditions taking up a modified nucleotide (digoxigenin-11-uridine-5'-triphosphate) and incorporating it in their newly synthesized RNA. It was demonstrated for both gram-negative and gram-positive bacteria as well as for natural biofilms of unknown composition. Depending on the growth conditions and population composition, the specific incorporation rate of the nucleotide analog into the bacterial RNA varied between 0.5% and 10%. Incorporation and labeling of the biofilms was accomplished in their natural habitats without any direct chemical or mechanical manipulation of the bacteria, avoiding a modification of the gene expression.

The digoxigenin-labeled RNA was separated magnetically. By using a biotinylated anti-DIG antibody, digoxigenin-labeled RNA was bound specifically to streptavidin-functionalized magnetic particles. After optimization, separation yields of labeled RNA reached values of up to 97% in the elution fraction. Moreover, this method was applied in a highly specific manner. The fraction of non-labeled nucleic acids unspecifically bound to the magnetic particles could hardly be detected and was below 0.01%.

General applicability of this labeling and separation method was tested by specific population and gene expression analyses. Analysis of natural biofilm populations based on the ribosomal RNA (rRNA) revealed that the nucleotide analog was incorporated in the rRNA by biofilm bacteria. Consequently, the genetic fingerprints reflected the natural composition of the biofilms even after separation. Varying incorporation rates allowed conclusions to be drawn with respect to the physiological activity of the bacteria in their respective habitat.

When analyzing the gene expression of two stress-induced genes, specific induction of these genes was detected reproducibly via the labeled mRNA after separation. Incorporation of DIG-11-UTP in the RNA was found to be directly proportional to the induction of the genes investigated.

For commercialization of the method developed, separation was automated using the chemagic Prepito™.

The method of *in vivo* labeling and separation of bacterial RNA serves for a better understanding of biofilm development in natural and technical systems. It can be used to label, separate, and analyze both mRNA and rRNA from unknown bacteria in natural habitats. Hence, this method provides in-depth information on the regulation, function, and stress reaction of bacterial biofilms. Automation of the method allows for a high throughput and, hence, for an analysis of very large transcriptomes of natural habitats.

## Inhaltsverzeichnis

Erklärung

Danksagung

Zusammenfassung

Abstract

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	- 1 -
1.1. Motivation der Arbeit .....	- 1 -
1.2. Kenntnisstand .....	- 2 -
1.2.1. Herausforderung der Analyse bakterieller RNA .....	- 2 -
1.2.2. Isolierung von mRNA für Transkriptomanalysen .....	- 4 -
1.2.3. Markierung von Nukleinsäuren .....	- 7 -
1.2.4. Genexpressionsanalyse von Transkriptomen .....	- 11 -
1.2.5. Taxonomieanalysen .....	- 15 -
1.2.6. Biofilmforschung .....	- 16 -
1.2.7. Magnetseparation im Bereich der Biotechnologie .....	- 19 -
1.2.8. Aufgabenstellung .....	- 26 -
2. Material und Methoden .....	- 29 -
2.1. Geräte und Materialien .....	- 29 -
2.2. Bakterien .....	- 30 -
2.2.1. Wachstumsbedingungen für Referenz-Bakterien in Flüssigkultur ..	- 30 -
2.2.2. Induktion der Genexpression von <i>rpoS</i> in <i>P. aeruginosa</i> und von <i>vanA</i> in <i>E. faecium</i> B7641 .....	- 30 -
2.2.3. Bestimmung des Bakterientiters in einer Flüssigkultur .....	- 31 -
2.2.4. Bakterielle Biofilme aus natürlichen Habitaten .....	- 32 -
2.2.5. Markierung von Bakterien aus Flüssigkultur und aus natürlichen Biofilmen .....	- 32 -
2.3. RNA Isolierung .....	- 33 -
2.3.1. Materialvorbereitung .....	- 33 -
2.3.2. Gesamt RNA-Isolierung .....	- 33 -

2.4.	RNA Quantifizierung.....	- 35 -
2.5.	Nachweis der RNA Markierung im Dot Blot Verfahren .....	- 36 -
2.6.	DNase / RNase Assay.....	- 38 -
2.7.	Separation Digoxigenin markierter RNA.....	- 39 -
2.8.	rRNA Isolierung mittels Capture-Hybridisierung .....	- 39 -
2.9.	Agarosegel- und Agarose-Formaldehydgelelektrophorese .....	- 41 -
2.10.	Primer.....	- 43 -
2.11.	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	- 43 -
2.11.1.	Herstellung von DNA Amplikons für Kontrollexperimente .....	- 45 -
2.12.	Reverse Transkription .....	- 45 -
2.13.	Populationsanalyse von Bakterien .....	- 46 -
2.13.1.	PCR für die DGGE .....	- 48 -
2.13.2.	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE).....	- 49 -
2.13.3.	Sequenzierung .....	- 50 -
2.14.	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) .....	- 53 -
2.15.	Messung von Zeta-Potential und isoelektrischem Punkt.....	- 55 -
3.	Ergebnisse und Diskussion .....	- 57 -
3.1.	Auswahl eines zur Separation geeigneten Markierungsmoleküls..	- 57 -
3.2.	<i>In vivo</i> Markierung bakterieller RNA.....	- 59 -
3.2.1.	Methodenentwicklung und Markierungsprotokoll.....	- 59 -
3.2.2.	Anwendung und Bewertung des Markierungsprotokolls für unterschiedliche Habitate .....	- 61 -
3.2.3.	Spezifität der Markierung.....	- 66 -
3.3.	Verfahren zur Separation Digoxigenin markierter RNA.....	- 68 -
3.3.1.	Magnetpartikel vermitteltes Separationsverfahren .....	- 68 -
3.3.2.	Anwendung des DIG-RNA Separationsprotokolls und Ausbeute der Separationen.....	- 79 -
3.3.3.	Zusätzliche molekularbiologische Validierung der Spezifität der Separation .....	- 81 -
3.4.	Partikelvermittelte Capture-Hybridisierung zur Abtrennung markierter rRNA .....	- 86 -
3.4.1.	Entwicklung eines Verfahrens zur Separation von DIG markierter rRNA und mRNA.....	- 87 -
3.5.	Taxonomieanalysen aus unterschiedlichen Habitaten .....	- 89 -

3.6.	Erprobung des Separationsverfahrens in Expressionsanalysen ....	- 95 -
3.6.1.	Methodik der Expressionsanalyse mit den Referenzbakterien.....	- 95 -
3.6.2.	Vergleich der Expressionsprofile des <i>rpoS</i> Gens in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und des <i>vanA</i> Gens in <i>Enterococcus faecium</i> .....	- 97 -
3.7.	Übertragung des Verfahrens auf den chemagic Prepito™ .....	- 100 -
3.7.1.	Anpassung des Separationsverfahrens .....	- 101 -
3.7.2.	Anwendung des automatisierten Protokolls zur Isolierung DIG- markierter RNA .....	- 102 -
3.8.	Weiterführende Charakterisierung und Optimierung der Separation DIG markierter RNA.....	- 104 -
3.8.1.	Charakterisierung der magnetischen Trägermaterialien .....	- 105 -
3.8.2.	Optimierung der Pufferzusammensetzung.....	- 107 -
3.8.3.	Alternative Sorbentien.....	- 108 -
3.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	- 115 -
4.	Ausblick.....	- 117 -
5.	Literatur.....	- 121 -
6.	Anhang.....	- 130 -
6.1.	Computerprogramm für chemagic Prepito™ .....	- 130 -
6.2.	Sequenzvergleich Capture-Separation .....	- 138 -
6.2.1.	Distinkte Bande der Capture-Separation im DGGE-Gel .....	- 138 -
6.3.	Sequenzvergleich der 16S rRNA Capture-Oligonukleotide.....	- 141 -
6.3.1.	16S-1 Capture-Oligonukleotid .....	- 141 -
6.3.2.	16S-2 Capture-Oligonukleotid .....	- 146 -
6.3.3.	16S-3 Capture-Oligonukleotid .....	- 150 -
	Tabellenverzeichnis .....	- 155 -
	Abbildungsverzeichnis .....	- 156 -



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
AGE	Allyl-Glycidyl-Ether
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C6	Cyclohexyl-Rest
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxiribonuklease
CoCl <sub>2</sub>	Cobaltchlorid
Ct	Threshold Cycle
D	Deutschland
Δ	Delta
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DIG-11-UTP	Digoxygenin-11-Uridin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Etrazelluläre polymere Substanz
ESEM	Environmental Sample Electron Microscopy
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Forward primer bzw. Vorwärtsprimer
g	Erd-Gravitationsbeschleunigung (9,81/sec <sup>2</sup> )
G	Guanin
GAC	Aktivkohle ( <i>granulated activated carbon</i> )
GB	Großbritannien
gesRNA	Gesamt-RNA
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HCl	Salzsäure
HDL	High denaturing liquid
IF	Induktionsfaktor
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDL	Low denaturing liquid
LU	Light Units
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min.	Minuten

MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
M-PVA	Magnetit-Polyvinyl-Alkohol
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MW	Mittelwert
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>3</sub> -Citrat*2 H <sub>2</sub> O	Trinatriumcitrat-Dehydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>2</sub>	Amino-Rest
NTP	Nukleosidtriphosphat
n.u.	nicht untersucht
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuclease
RP	Reverse primer bzw. Rückwärtsprimer
rRNA	ribosomale RNA
16S rRNA	Ribosomale RNA der 16S-Einheit
23S rRNA	Ribosomale RNA der 23S-Einheit
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion
SAV	Streptavidin
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sek.	Sekunden
sp.	Spezies
SSC	Sodium salt citrate
β-ME	β-Mercaptoethanol
T	Thymin
TAE	RIS Base Acetat EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TdT	Terminale Transferase
TE	Tris-HCL EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	Vollentionisiertes Wasser

## **1. Einleitung**

### **1.1. Motivation der Arbeit**

Mikroorganismen sind in den meisten Habitaten die vorherrschende Lebensform und kommen in planktonischer oder häufig in adhärenter Form als Biofilme vor. In der Biotechnologie werden Mikroorganismen vom Abbau umweltschädigender Substanzen bis hin zur Herstellung verschiedenster Pharmaka eingesetzt. Neben diesen nützlichen Anwendungen verursachen zum Beispiel bakterielle Biofilme aber auch Probleme in industriellen, medizinischen und ökologischen Prozessen (Stanley und Lazazzera, 2004). Die Kontrolle bakterieller Biofilme auf allen Ebenen von der Adhäsion über das Wachstum, bis hin zur Ablösung wäre dementsprechend wünschenswert. Generell könnten biotechnologische Prozesse somit zielgerichteter gesteuert und die Hygiene im Nahrungs- und Medizinbereich verbessert werden.

Hierfür ist jedoch ein tiefgreifendes Verständnis der bakteriellen Regulationsmechanismen und der Interaktionen der unterschiedlichen Bakterienspezies eines Biofilms notwendig. Der Schlüssel für ein detailliertes Verständnis von bakteriellen Biozönosen liegt in der Analyse der bakteriellen Genexpression unter gleichzeitiger Erfassung ihrer Taxonomie. Ribonukleinsäure (RNA) basierte Expressionsanalysen dienen dabei der Identifikation von Genen und der Aufklärung von physiologischen Signalwegen. Damit ermöglichen sie auch die Erforschung der Interaktionen, Funktionen und spezifischen Antworten auf Umweltstimuli von Bakterien in natürlichen Gemeinschaften. Gerade die eingehende Untersuchung von bakteriellen Stressantworten in natürlichen Biofilmen und von stressinduzierten Verschiebungen der Populationszusammensetzung kann helfen, Wege zu deren Vermeidung oder Manipulation zu finden. Bisher aber konnten Expressionsanalysen nur für bekannte Gene oder einzelne Bakterienspezies angewendet werden. Dagegen war eine parallele Erforschung der rRNA basierten Taxonomie und des mRNA basierten Transkriptoms von prokaryontische Biozönosen unbekannter Zusammensetzung bisher nicht möglich. Ebenso konnten keine Gene unbekannter Sequenz und genetischer Funktionalität in diese Analysen mit einbezogen werden.

Der problematische Schritt für eine parallele Taxonomie und Transkriptionsanalyse ist die Isolierung der mRNA, da sie weniger als 5% der Gesamt-RNA ausmacht. Ferner sind für Prokaryonten keine einfachen Methoden zur Separation und Amplifikation der mRNA bekannt, da ihr im Gegensatz zu Eukaryonten eine stabile Polyadenylierung fehlt (Jacobsen *et al.* 2004). Dies macht speziell die Separation und speziesunabhängige, unspezifische Amplifikation unbekannter mRNA Sequenzen sehr kompliziert und aufwendig. Die rRNA nimmt dagegen 80% der gesamten RNA in Anspruch und kann wegen ihrer stark konservierten Sequenz verhältnismäßig einfach isoliert werden. Eine Unterscheidung zwischen bereits vorhandener und *de novo* synthetisierter RNA ist sowohl für mRNA, als auch für rRNA bei heutigem Stand der Technik nur durch radioaktive Markierungsexperimente möglich.

Aus diesem Grund war die Entwicklung einer einfachen, speziesübergreifenden Methode zur Isolierung, Reinigung und Identifizierung von *de novo* synthetisierter mRNA (Transkriptom), bei gleichzeitiger Betrachtung der rRNA (Taxonomie), Ziel dieser Doktorarbeit.

## **1.2. Kenntnisstand**

### **1.2.1. Herausforderung der Analyse bakterieller RNA**

Ribonukleinsäuren (RNA) sind ein essentieller Bestandteil jeder lebenden Zelle und nehmen eine Schlüsselposition während der Proteinbiosynthese ein. *In vivo* besteht die Aufgabe der RNA darin, die gespeicherte Erbinformation der DNA umzusetzen, dabei gibt es verschiedene RNA Varianten. Die messenger-RNA (mRNA), ein direktes Transkript exprimierter Gensequenzen, dient als Matrize der Ribosomen bei der Proteinsynthese und kann damit zur Analyse der Genexpression eingesetzt werden. Die ribosomale-RNA (rRNA) hingegen ist eine strukturbildende und katalytische Komponente der Ribosomen und kodiert nicht für funktionelle Gene. Sie wird wegen ihrer stark konservierten Sequenz zur Analyse der Taxonomie herangezogen. Die transfer-RNA (tRNA) schließlich vermittelt den Transport der Aminosäuren zum Ribosom und kodiert ebenfalls keine genetische Information.

Ein generelles Problem bei der Erforschung von RNA liegt darin, dass sie in natürlicher Umgebung sehr schnell abgebaut wird. Die Degradation erfolgt dabei durch ubiquitäre RNA spezifische Nukleasen, die RNasen. RNasen sind sehr temperaturstabil und eine Zerstörung ist nur unter sehr harschen Bedingungen z.B. durch eine Behandlung mit 0,5%iger SDS Lösung möglich.

In ihrer natürlichen Umgebung, also *in vivo*, beträgt die durchschnittliche Halbwertszeit bakterieller mRNA nur wenige Minuten. Der Grund für diesen schnellen Abbau liegt nicht in der mangelnden Stabilität der RNA, sondern in der Robustheit der RNasen und ihrem ubiquitären Vorkommen. Durch diesen schnellen Abbau können Bakterien in sehr kurzer Zeit eine große Bandbreite an Genprodukten herstellen. Unter Stress ist es Bakterien jedoch möglich, die Halbwertszeit bestimmter mRNA Moleküle zu verändern. Dies betrifft vor allem mRNA's von Genprodukten, die in verschiedenen Stressantworten des Bakteriums eine Rolle spielen. Da so eine große Bandbreite an möglichen genetischen Reaktionen bereit steht, können sich die Bakterien schneller an einen spezifischen Stressstimulus adaptieren (Singh *et al.* 2009). Die Halbwertszeit der rRNA, als strukturbildende Komponente ist dagegen mit bis zu 48 Stunden sehr lang (Rauhut und Klug, 1999). Die Stabilität von mRNA in einer RNase-freien Umgebung ist hingegen mit der von rRNA vergleichbar und beträgt bis zu 3 Tage (Fuchs *et al.* 1998). Aus diesem Grund ist es wichtig, bei der Analyse von RNA darauf zu achten, dass RNasen beim Zellaufschluss inhibiert werden und die erste Isolierung der Gesamt-RNA nur wenig Zeit in Anspruch nimmt.

### RNA spezifische Analysen

RNA basierte Analysemethoden bieten die Möglichkeit, die Funktionsweise und Regulation von Organismen besser zu verstehen. Im Gegensatz dazu können durch die Untersuchung der DNA z.B. in Metagenomanalysen, nur Aussagen über die generellen genetischen Fähigkeiten einer Zelle getroffen werden (Steele und Streit, 2005). Die Analyse der DNA führt damit zu keiner Aussage über die Reaktion eines Organismus auf einen Umweltstimulus und deren Regulation. Solche Aussagen sind nur möglich, wenn die unter bestimmten Umständen transkribierten Gene untersucht werden, wozu die RNA herangezogen werden muss. So ist die RNA basierte Forschung heute ein integraler Bestandteil der

modernen Molekularbiologie mit weitreichenden Anwendungen. Sie reichen von der taxonomischen Analyse mikrobieller Populationen mittels rRNA bis hin zur Quantifizierung der Genexpression in Biofilmen und biotechnologischen Prozessen mittels mRNA (Meckenstock *et al.* 1998, Rasmussen und Givskov 2006).

Eine Methode der taxonomischen Untersuchung auf Ebene der rRNA ist die Polymerase-Kettenreaktion in Kombination mit einer Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese (PCR-DGGE). Setzt diese Methode rRNA als Ausgangsbasis ein, so untersucht sie lediglich die lebenden Mikroorganismen in einem Habitat. Sie nutzt also den relativ schnellen Abbau der RNA *in vivo* als Vitalitätsmarker (Tannock *et al.* 2004).

Bei Expressionsanalysen steht die Analyse von Gentranskripten im Fokus, um die Reaktion von Organismen auf exogene Stimuli zu untersuchen. Wird dabei nicht nur die Expression einzelner Gene analysiert, sondern die einer ganzen Zelle oder sogar von Zellverbänden, wie z.B. Biofilmen, so wird das Transkriptom analysiert. Das Transkriptom bezeichnet also die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt von DNA in RNA transkribierten Gene.

### **1.2.2. Isolierung von mRNA für Transkriptomanalysen**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus einer Population ist heute sehr einfach durchführbar. Hierfür kann entweder eine Phenol-Chloroform-Fällung oder ein kommerzielles Verfahren eingesetzt werden, das Gesamt-RNA in hoher Ausbeute und Reinheit liefert. Die meisten kommerziellen Verfahren nutzen chromatographische Methoden zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Die Bindung zwischen Festphase und Nukleinsäure kann dabei auf drei verschiedenen Wechselwirkungen basieren: (1) Bindung über Wasserstoffbrückenbindungen an eine hydrophile Oberfläche wie z.B. Silika-Partikel (Breadmore *et al.* 2003); (2) Bindung der in wässriger Lösung negativ geladenen Nukleinsäuren an einen Anionen-Austauscher (Endres *et al.* 2003); (3) Größenausschluss in einer Gelfiltration (Vogelstein und Gillespie, 1979). Bei solchen Isolierungen ist lediglich darauf zu achten, dass die Gesamt-RNA schnell in gereinigter RNase freier Form vorliegt, um ihren Abbau zu verhindern.

### Unterschied zwischen prokaryontischer und eukaryontischer mRNA

Der entscheidende Schritt für Transkriptionsanalysen ist die Isolierung der mRNA. Für eukaryontische Organismen sind viele Methoden zur mRNA Separation kommerziell erhältlich, die hohe Ausbeuten und Reinheiten liefern. Durch eine stabile Polyadenylierung am 3'-Ende kann eukaryontische mRNA affinitätschromatographisch leicht aufgereinigt werden. Eine Hybridisierung an festphasengebundene PolyT-Nukleotide und eine selektive Elution erlauben dabei eine schnelle und einfache Separation der eukaryontischen mRNA (Jacobsen *et al.* 2004). Im Gegensatz zu Eukaryonten bilden prokaryontische Zellen mRNA ohne eine solch stabile PolyA-Verlängerung und eine Methylierung am 5' Ende (5'-cap-Sequenz). Dies macht eine Separation und nachfolgende Amplifikation von mRNA sehr kompliziert und aufwendig. Der Unterschied zwischen prokaryontischer und eukaryontischer mRNA ist nochmals in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

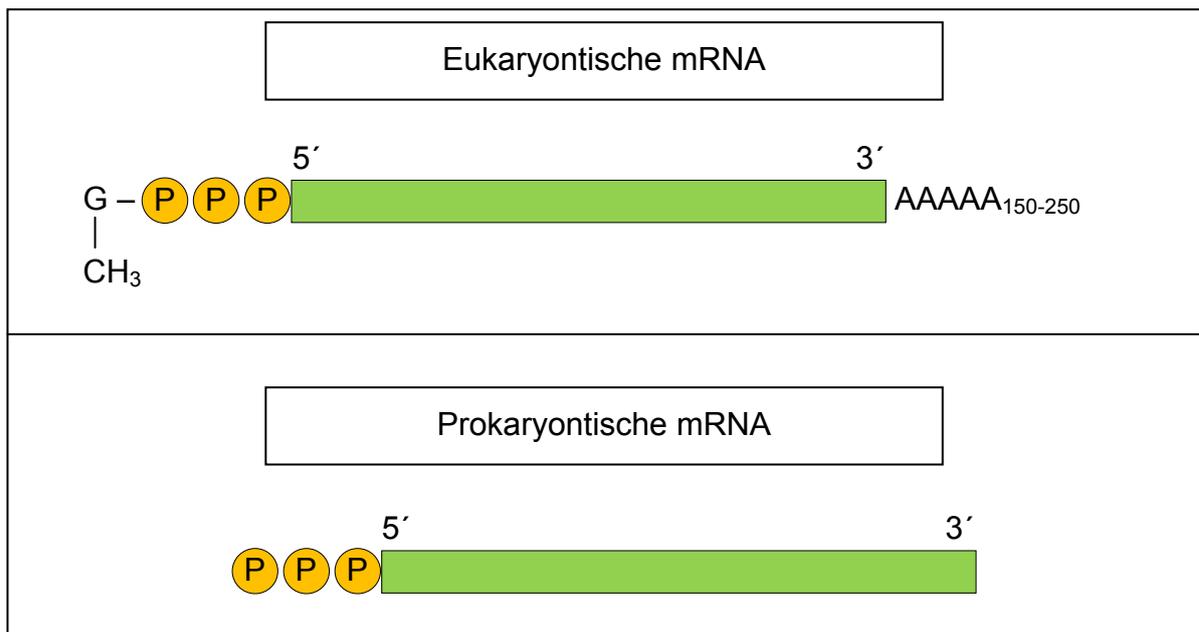


Abbildung 1: Unterschied zwischen prokaryontischer und eukaryontischer mRNA.

Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit verschiedene Verfahren zur Isolierung bakterieller mRNA entwickelt. Eine dieser Methoden fügt eine künstliche Polyadenylierung am 3'-Ende der bakteriellen mRNA an, wozu eine *Escherichia*

*coli* (*E. coli*) eigenen Poly(A) Polymerase verwendet wird. Diese Modifikation der mRNA wird in mechanisch aufgeschlossenem Zellrohextrakt durchgeführt und konnte nur auf wenige andere Bakterienarten angewendet werden (Wendisch *et al.* 2001). Ein weiteres Problem dieses Verfahrens kann darin liegen, dass die mRNA in einem Rohextrakt sehr schnell abgebaut wird, da er viele intrazelluläre RNasen enthält. Dieser Einwand wird dadurch unterstützt, dass gezeigt wurde, dass mRNA mit einem Poly(A) Anhang am 3'-Ende verstärkt durch bakterielle 3'-Exonukleasen abgebaut wird. Eine Polyadenylierung ist somit in Bakterien eher ein Signal für den verstärkten Abbau einer so markierten mRNA, als für dessen Stabilität (Mohanty *et al.* 2004).

#### Ausschluss der rRNA zur mRNA Reinigung

Ein weiteres Verfahren zur Isolierung reiner bakterieller mRNA basiert auf der Aneinanderreihung enzymatischer Schritte, die die 16S und 23S rRNA in der Gesamt-RNA Lösung abbauen. Hierfür werden eine Reverse Transkriptase und spezifische Primer für die 16S und 23S rRNA eingesetzt. Nach der Synthese der komplementären DNA (cDNA) werden die rRNA Moleküle durch RNase H abgebaut, die spezifisch die RNA eines RNA-DNA-Hybrids erkennt. Die verbleibende cDNA wird anschließend durch DNase I zerstört, so dass lediglich mRNA zurückbleibt, die nochmals gereinigt und aufkonzentriert werden muss (Rosenow *et al.* 2001). Diese Methode ist wegen der zusätzlichen Reinigungsschritte recht schwierig handhabbar und führt außerdem zu relativ großen Verlusten an mRNA.

Eine häufig eingesetzte Methode zur Isolierung von spezifischen mRNA Molekülen ist die Capture-Hybridisierung. Hierbei wird die RNA durch eine Hybridisierung an komplementäre Oligonukleotide an eine Festphase gebunden und separiert. Als Festphase werden dabei sowohl Chromatographiesäulen, als auch Magnetpartikel eingesetzt. Mit dieser Methode konnte beispielsweise die mRNA einer bekannten Protease aus *Bacillus cereus* aus einem Rohextrakt aufgereinigt werden (Bach *et al.* 1999). Sie ist somit sehr gut für die Separation von RNA Molekülen bekannter Sequenz geeignet. Aus diesem Grund nutzt eine weitere Anwendung zur Aufreinigung bakterieller mRNA ebenfalls eine Capture-Hybridisierung, bei der sie die rRNA aus der Gesamt-RNA Lösung abtrennt. Die rRNA Moleküle können aufgrund ihrer stark konservierten Sequenz durch komp-

lementäre Oligonukleotide gebunden und separiert werden, wohingegen die mRNA in der Lösung verbleibt (Pang *et al.* 2004). Eine Abtrennung von tRNA und anderen kleinen RNA Molekülen kann mit dieser Methode jedoch nicht realisiert werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren zur Reinigung bakterieller mRNA für Genexpressionsanalysen ist die Capture-Hybridisierung schnell und einfach durchzuführen und unterdrückt eine RNA-Degradation durch zelleigene und fremde RNasen.

Eine weitere kostengünstige und einfache Methode zur Isolierung bakterieller mRNA aus einer Gesamt-RNA Lösung ist der Größenausschluss in einer Agarosegelelektrophorese. Die mRNA wird dabei aus denjenigen Regionen des Agarosegels isoliert, die zwischen den drei distinkten Banden der 5S-, 16S- und 23S rRNA liegen. Dieses Verfahren wurde für die Transkriptomforschung in Bodenproben entwickelt (McGrath *et al.* 2008). Diese Methode weist jedoch die Gefahr auf, dass solche mRNA Moleküle nicht erfasst werden, die eine ähnliche Größe wie die rRNA aufweisen.

Sind also Transkriptomanalysen von Bakterienpopulationen unbekannter Zusammensetzung das Ziel der mRNA Isolierung, so ist es sehr wichtig, die mRNA aller Bakterien der betrachteten Biozönose zu isolieren. Diesbezüglich weisen diejenigen Methoden, die eine Hybridisierung an komplementäre Nukleotidsequenzen zur Isolierung der mRNA verwenden, eine Schwäche auf. Diese liegt in der Gefahr, unbekannte Spezies wegen einer nicht komplementären Sequenz auszuschließen.

Da Prokaryonten also keine stabile Polyadenylierung am 3'-Ende oder eine andere Modifikation der mRNA synthetisieren, existiert bei heutigem Stand der Technik kein einfaches und schnelles Verfahren zur Isolierung von mRNA unbekannter Bakterien, das hohe Ausbeuten und Reinheiten liefert.

### **1.2.3. Markierung von Nukleinsäuren**

Die Markierung von Nukleinsäuren findet in der Molekularbiologie eine weit verbreitete Anwendung, die von der Untersuchung des Metabolismus über die Gensonden-Herstellung bis hin zur Analyse der Genexpression reicht (McCreery, 1997). Dabei findet die Markierung entweder außerhalb des betrachteten Organismus, *in vitro*, oder im lebenden Organismus, *in vivo*, statt. Die Markierung

kann sowohl radioaktiv, mit Fluoreszenzfarbstoffen als auch mit Haptenen durchgeführt werden (Sambrook *et al.* 1989). Zumeist wird die Markierung dabei über Nukleotidanaloga in die Zielstruktur eingefügt.

### In vivo Markierung

Bei einer *in vivo* Markierung von Nukleinsäuren findet die Kopplung von radioaktiven und nicht-radioaktiven Markierungsmolekülen und Nukleinsäuren innerhalb einer lebenden Zelle statt.

Für eukaryontische Zellen wurde der Austausch radioaktiver- gegen nicht-radioaktive Markierungen auf dieser Ebene ab dem Jahr 1990 beschrieben werden. Als Ersatz für eine radioaktive Markierung lebender eukaryontischer Zellen werden zumeist Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt (Aglietta *et al.* 1991). Eine solche nicht-radioaktive *in vivo* Markierung wurde aber bisher ausschließlich für Organismen aus dem biologischen Reich der Eukaryota und nicht für solche aus dem der Prokaryota beschrieben. Für Eukaryonten wurde unter anderem ein Verfahren beschrieben, bei dem 2,4-Di-Thiouracil von der zelleigenen Uracil-Phosphoribosyl Transferase erkannt und in die RNA eingebaut wurde. Die auf diese Weise mit einer Thiol-Gruppe ausgestattete RNA kann im Zellaufschluss mit thio-reaktivem Biotin markiert werden. Dadurch kann die zelluläre RNA selektiv markiert und einfach separiert werden (Cleary *et al.* 2005).

Die *in vivo* Markierung von bakteriellen Nukleinsäuren ist im Gegensatz zu Eukaryonten nur schwer speziesübergreifend möglich. So konnte ausschließlich die bakterielle DNA durch den Einsatz von Bromodesoxyuridin (BrdU) markiert und anschließend mittels eines Antikörpers isoliert werden (Urbach *et al.* 1998).

Eine *in vivo* Markierung von bakterieller RNA ist hingegen ausschließlich mit radioaktiven oder schweren Isotopen möglich. Dabei werden die intrazellulären Nukleinsäuren durch den Zusatz eines radioaktiven Substrats wie z.B. [<sup>3</sup>H]-Uridin zum Wachstumsmedium markiert (Baracchini und Bremer, 1987). Durch eine solche radioaktive Markierung kann beispielsweise die RNA Synthese über Autoradiographie verfolgt werden. Der Einsatz von radioaktiven Substraten wie z.B. [<sup>14</sup>C]-Bicarbonat wurde darüber hinaus genutzt, um zwischen rRNA Molekülen aktiver und inaktiver Bakterien unterscheiden zu können (Adamczyk *et al.* 2003). Die radioaktive Markierung dient aber ausschließlich der *in situ* Detektion aktiver

Mikroorganismen. Eine Separation über radioaktive Isotope ist dagegen nicht möglich.

Als Alternative zum Einsatz einer radioaktiven Markierung, können auch mit schweren Isotopen hergestellte Substrate, wie z.B. [<sup>13</sup>C]-Methanol eingesetzt werden. Eine solche „stabile Isotopenbeobachtung (SIP)“ bietet den Vorteil, dass die markierten RNA Moleküle nicht radioaktiv sind und in einer Dichtegradienten-Zentrifugation separiert werden können. Mit dieser SIP Methode konnten in der Vergangenheit Verschiebungen von bakteriellen Populationen in Bodenproben beobachtet werden (Lueders *et al.* 2004). Diese isotopenbasierte Methode erlaubt jedoch neben der Abtrennung der RNA, keine direkte, antikörpervermittelte Detektion der markierten RNA Moleküle. Daneben ergibt sich für alle isotopenmarkierten Substrate das Problem hoher Beschaffungskosten. Für radioaktive Isotope ist außerdem die kostenintensive Entsorgung zu beachten.

#### In vitro Markierung

Die Markierung von Nukleinsäuren *in vitro* ist dagegen einfacher durchführbar. DNA kann beispielsweise in einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) leicht markiert werden. Dabei werden modifizierte Einzelnukleotide in die neu synthetisierten Oligonukleotide beliebiger Länge eingebaut. Die Nukleotid-analoga werden durch die DNA Polymerase kovalent in das PCR-Produkt eingebaut. In der Vergangenheit wurden vermehrt radioaktive Markierungen eingesetzt. Diese werden seit Beginn der 1990'er Jahre zunehmend durch Fluoreszenzfarbstoffe oder die in Abbildung 2 dargestellten Haptene, wie Digoxigenin oder Biotin ersetzt (Gauthier *et al.* 2003).

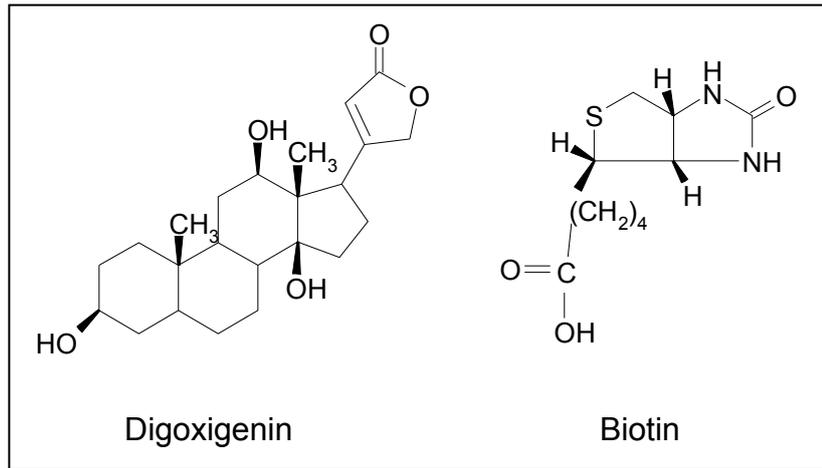


Abbildung 2: Strukturformeln der Haptene Digoxigenin und Biotin

Eine alternative *in vitro* Markierung, die auch für RNA eingesetzt werden kann, ist eine enzymatische End-Markierung. Die Markierung von RNA oder DNA Molekülen wird durch die T4 RNA Ligase oder die Terminalen Desoxynukleotid Transferase katalysiert. In beiden Fällen erfolgt die Kopplung an das 3'-Ende eines bestehenden Nukleotids, wobei die Terminale Transferase einzelne Nukleotide anhängt. Die T4 RNA Ligase dagegen koppelt, durch die T4 Polynukleotid Kinase aktivierte Oligonukleotide, an das 3'-Ende des Ziel-Oligonukleotids (Hilario, 2004, Weber *et al.* 1989, England und Uflenbeck, 1978, Harrison und Zimmerman 1986). Auch durch eine *in vitro* Transkription mittels RNA Polymerase können Oligonukleotide mit dem Hapten Digoxigenin gekoppelt werden (McCreery, 1997). Neben solchen enzymkatalysierten Markierungsverfahren kann die *in vitro* Markierung von RNA auch durch eine chemische Modifikation erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist die Platin katalysierte kovalente Kopplung von Cyanofarbstoffen an mRNA Moleküle. Diese können dann nach einer Hybridisierung auf einem Oligonukleotid Microarray nachgewiesen werden (Gupta *et al.* 2003).

Die meisten dieser *in vitro* Markierungsmethoden werden zur Herstellung von Gensonden genutzt, die danach entweder in Microarray Analysen der Genexpression oder für *in situ* Hybridisierungen eingesetzt werden. Solche *in situ* Hybridisierungen werden in der Literatur häufig als Methode der *in vivo* Markierung dargestellt. Eine solche Darstellung ist jedoch irreführend, da diese fixierten und permeabilisierten Zellen nicht mehr lebensfähig sind (Smith *et al.* 2005).

#### 1.2.4. Genexpressionsanalyse von Transkriptomen

Die Untersuchung der unterschiedlich starken Expression verschiedener Gene erlaubt Rückschlüsse auf regulatorische Zusammenhänge in einer Population. Analysen, die das Transkriptom betrachten haben zum Ziel, alle in einem Habitat expremierten Gene zu erfassen. Hierfür muss die mRNA der gesamten Population isoliert werden. Durch den Vergleich des Expressionsmusters einer Population bei unterschiedlichen Umweltbedingungen kann die Reaktion der Bakterien auf einen eingebrachten Stimulus untersucht werden. Wegen der geringen Halbwertszeit der mRNA *in vivo* ist es dabei sehr wichtig, dass schnelle Methoden zur RNA Aufarbeitung eingesetzt werden, um alle expremierten Gene zu erfassen. In diesem Zusammenhang spielt aber auch die Behandlung der Zellen vor der RNA Isolierung eine wichtige Rolle, da eine Veränderung der Umgebungsbedingungen eine Anpassung der Genexpression stimulieren kann. Solche Stimuli können beispielsweise das Kühlen der Bakterien, die Ablösung eines Biofilms von seiner Aufwuchsoberfläche oder die Veränderung des Puffers einer Bakteriensuspension sein. Diese Stimuli führen unter anderem zu einer Induktion von Kälte Schock Genen bzw. von Genen der bakteriellen Stressantwort (Hinton *et al.* 2004). Die eingesetzten Methoden sollten die zu untersuchenden Bakterien also möglichst lange in ihrer natürlichen Umgebung halten, um eine ungewollte Veränderung des Expressionsmusters zu vermeiden. Eine schnelle und das Lebensmilieu der Bakterien nicht verändernde Isolierung der RNA ist also ein integraler Bestandteil von Expressionsanalysen. Die Genexpression in der isolierten RNA kann nach einer erfolgreichen mRNA Separation mit unterschiedlichen Methoden analysiert werden. Hierzu zählen qualitative Methoden wie z.B. RNase-Protection Assay, Northern Blot Analyse oder Hochdurchsatzsequenzierung, aber auch quantitative Verfahren wie Microarray Analysen oder quantitative PCR, die im Folgenden näher erläutert werden.

#### Microarray Technologie

Analysen von Transkriptomen und deren Vergleich bei verschiedenen Umweltbedingungen, werden in den meisten Fällen mit Hilfe der Microarray Technologie durchgeführt. Diese erlaubt die parallele Untersuchung des Expressionsniveaus tausender Gene auf einem einzigen Microarray. Hierzu werden Gensonden be-

kannter Sequenz auf einem Microarray immobilisiert. Die isolierte mRNA aus der untersuchten Probe und der Referenzkultur werden vor dem Nachweis auf dem Microarray revers transkribiert und mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Danach werden sie auf dem Microarray an die Sonden bekannte Sequenzen hybridisiert und durch eine laservermittelte Anregung detektiert. Durch den Vergleich der Bindungsmuster der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNA's können Gene identifiziert werden, deren Expressionsniveau sich zwischen den betrachteten Stadien verändert hat (Pollock, 2002, Dennis *et al.* 2003). Der schematische Ablauf einer Genexpressionsanalyse mittels Microarray ist in Abbildung 3 dargestellt.

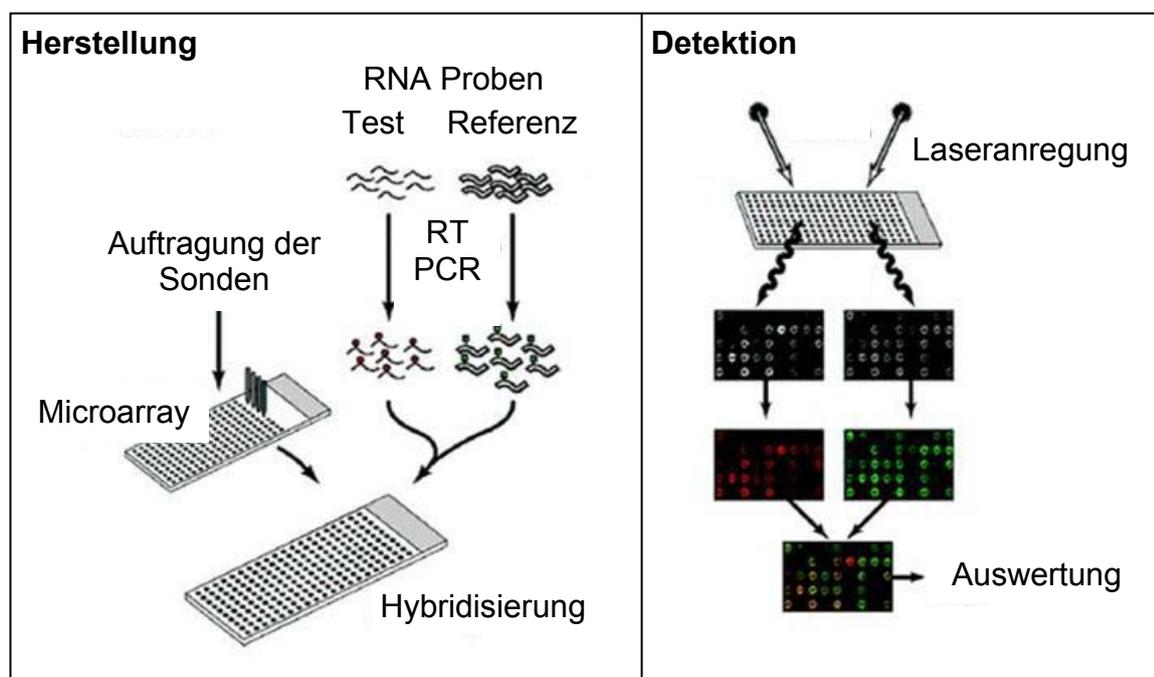


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genexpressionsanalyse mittels Microarray Technologie

Aufgrund der hohen Sondenanzahl auf einem Microarray (bis zu 250.000 Sonden) erlaubt diese Technologie die Analyse der Expressionsniveaus ganzer Transkriptome. Sie ist jedoch auf bekannte Gene mit beschriebener Sequenz oder bekannte Mikroorganismen festgelegt. So konnten beispielsweise mittels einer Microarray basierten Untersuchung Efflux-Pumpen Gene in *Pseudomonas*

*aeruginosa* (*P. aeruginosa*) identifiziert werden, die zur Antibiotikaresistenz dieses Bakteriums beitragen (Muller *et al.* 2007).

### Hochdurchsatzsequenzierung

Die Sequenzierung von RNA im Hochdurchsatz, das so genannten „Pyrosequencing“, ist eine weitere Methode, die für die Analyse der bakteriellen Genexpression eingesetzt werden kann. Hierzu müssen die isolierten RNA Moleküle, mittels Random-Hexamer Primern, sequenzunspezifisch in cDNA umgeschrieben werden. Die anschließende Sequenzierung erfolgt in einer weiteren sequenzspezifischen PCR nach dem Sanger-Prinzip. Bei der 454-Sequenzierung werden beispielsweise die cDNA Moleküle von Adaptersequenzen eingerahmt, in hochverdünnter Lösung separat an Magnetpartikel gebunden und in einer Pikotiterplatte sequenziert (Margulies *et al.* 2006).

Auf diese Weise konnte das von Wendisch *et al.* (2001) entwickelte Verfahren zur *in vitro* Polyadenylierung bakterieller mRNA (siehe Kapitel 1.2.2), zur Expressionsanalyse von marinen Bakterien angewendet werden (Frias-Lopez *et al.* 2008). Um das Meta-Transkriptom einer Population zu erfassen, kann die aus Umweltproben isolierte Gesamt-RNA auch direkt nach einer reversen Transkription im Hochdurchsatz sequenziert werden (Urich *et al.* 2008). Diese Methoden weisen jedoch den Nachteil auf, dass Verluste an bestimmten RNA Molekülen nicht quantifiziert werden können. Außerdem kann mit diesem Verfahren nicht zwischen kurzlebigen und stabilisierten mRNA Molekülen unterschieden werden. Die Stabilisierung von bestimmten mRNA Transkripten spielt speziell bei der bakteriellen Stressantwort eine wichtige Rolle (Singh *et al.* 2009).

### Quantitative PCR

Eine sehr genaue Methode zur Bestimmung der Menge einer spezifischen RNA ist die quantitative PCR (qPCR). Diese ermöglicht die Beobachtung der Amplifikation in Echtzeit und wird häufig als real time PCR bezeichnet. Sie basiert auf der Messung von Fluoreszenz, die direkt proportional mit der Amplifikat-Menge zunimmt. Das Fluoreszenzsignal wird direkt durch einen Detektor aufgenommen und verrechnet. Dabei wird beobachtet, in welchem PCR Zyklus die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, der sich deutlich von der des Hinter-

grundes unterscheidet. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation in einer PCR kann über eine Kalibration oder den relativen Vergleich zweier Proben die RNA Menge in der Probe nach Pfaffl (2001) bestimmt werden. Die Hauptanwendung dieser Methode ist die Messung der Induktion einzelner Gene. (Sharkey *et al.* 2004).

#### „Laser Capture Microdissection Microscopy“ (LCMM)

Ein neues Verfahren zur Analyse der Genexpression an einzelnen Stellen eines Biofilms basiert auf der „Laser Capture Microdissection Microscopy“ (LCMM). Diese erlaubt es, Teile von Geweben oder Biofilmen in einem Mikroskop zu beobachten und gleichzeitig mittels eines Lasers zielgenau herauszuschneiden. Aus den Proben kann danach die RNA isoliert und für Analyse der Genexpression in einer quantitativen PCR (qPCR) genutzt werden (Curran *et al.* 2000). Die Untersuchung der Expression von verschiedenen Genen eines *P. aeruginosa* Modell-Biofilms zeigte, dass die Expressionsaktivität sehr heterogen verteilt ist. An unterschiedlichen Stellen des Biofilms werden demnach verschiedene Gene exprimiert (Lenz *et al.* 2008). Auch wenn diese Methode lokalisierte Genexpressionsstudien erlaubt, so kann sie nicht für eine globale Analyse der Genexpression einer Population genutzt werden. Um Rückschlüsse auf die regulatorischen Netzwerke in Biofilmen ziehen zu können, muss diese Methode mit transkriptomweiten Ansätzen kombiniert werden.

#### Metagenomanalysen

Die Metagenomanalyse ist ein wichtiges Verfahren zur Erforschung des Leistungsvermögens von bakteriellen Gemeinschaften (Schmeisser *et al.* 2003, Szajani *et al.* 1991). Das direkte Klonieren von isolierter DNA aus Umweltproben in Genbibliotheken erlaubt die Detektion und das Screening ganzer Metagenome bakterieller Populationen. Die Analyse von rDNA liefert dabei Informationen über die Zusammensetzung der Population. Außerdem können potentielle Gene der jeweiligen bakteriellen Biozönose nach ihrer Klonierung und Expression auf unbekannte biokatalytische Aktivitäten hin untersucht werden. Mit Metagenom-Analysen ist es also möglich, die Zusammensetzung und die gesamte Breite der genetischen Fähigkeiten ganzer Populationen, unabhängig von der Kultivierbar-

keit der darin vorkommenden Mikroorganismen zu untersuchen (Steele und Streit, 2005). Sie kann aber keine Daten für Expressionsanalysen liefern, da die Metagenom-Forschung ihren Fokus auf die gesamte DNA legt, die aus einem Habitat isoliert werden kann und nicht auf die RNA aktiv exprimierter Gene.

### **1.2.5. Taxonomieanalysen**

Die moderne Analyse der Taxonomie ist heute ein wichtiger Bestandteil der mikrobiellen Ökologie. Sie hat zum Ziel, die Verwandtschaft zwischen unterschiedlichen Organismen zu erforschen und sie bestimmten Gattungen zuzuordnen. Heute wird diese Zuordnung nicht mehr aufgrund morphologischer und biochemischer Daten, sondern mittels der rDNA Sequenz mikrobieller Genome getroffen. Im Laufe der Evolution veränderte sich die Sequenz vieler Gene durch Mutationen, die teilweise die Fähigkeiten eines Organismus verändern, so dass sich neue Arten bilden. Dabei ist die Mutationsrate in funktionellen Genen höher, als in der für die Ribosomen codierenden rDNA. Der Grund dafür ist, dass Ribosomen für das Überleben eines Organismus essentiell sind und eine Veränderung selten einen evolutiven Vorteil erbringt. Damit verändert sich die Sequenz der rDNA nur sehr langsam, sie ist damit hochkonserviert. Die Zahl der unterschiedlichen Basen in der rDNA Sequenz zeigt, wie nahe verwandt zwei Arten zueinander sind. Je weniger sich ihre Sequenzen unterscheiden, desto näher ist Ihre Verwandtschaft (Woese, 2000). Um herauszufinden, welche Bakterien in einem bestimmten Habitat vorkommen, wird häufig die 16S rDNA genutzt. Die Amplifikation der 16S rDNA mittels zu den konservierten Bereichen komplementären Primern macht diese DNA für molekularbiologischen Analysen zugänglich (Muyzer et al. 1993). Eine Analyse der Taxonomie kann in einer Hochdurchsatzsequenzierung (siehe Kapitel 1.2.4) der 16S rDNA mit einem nachgeschalteten Sequenzvergleich erfolgen.

### **Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese**

Ein anderer Ansatz zur Erforschung der taxonomischen Diversität eines Biofilms ist die mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion gekoppelte Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (PCR-DGGE), mit deren Hilfe es möglich ist, die dynamischen Änderungen der Bakterienpopulation zu beobachten. Mit dieser

Technik können nämlich rDNA oder rRNA basierte Fingerabdruckmuster von Populationen erzeugt werden, wobei jede Bande des erhaltenen Musters einer Bakterienspezies entspricht. Die Anzahl der Banden zeigt somit die Biodiversität eines Biofilms (Muyzer et al. 1993, Rieder *et al.* 2008). Durch die Ermittlung des Soerensen Index kann ferner die Ähnlichkeit von Populationen untersucht werden. Auch Veränderungen von Populationszusammensetzungen als Folge exogener Stimuli oder der Reifung eines Biofilms können wichtige Informationen zur Biofilmentstehung liefern (Girvan *et al.* 2003). Durch die Isolierung und Sequenzierung einzelner Banden, können sie bestimmten Bakterienspezies zugeordnet werden. Die PCR-DGGE erlaubt im Gegensatz zur Metagenom Analyse eine schnelle Beobachtung von Populationsveränderungen in bakteriellen Biofilmen. So konnte mit dieser Technik die Veränderung der Populationszusammensetzung in Flusswasserbiofilmen auf Keramik-Coupons in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit untersucht werden (Besemer *et al.* 2007). Diese Methode ist jedoch durch die verwendeten Primer limitiert, da nur diejenigen rDNA Moleküle amplifiziert werden, die komplementär zu den verwendeten Primer sind. Das in dieser Arbeit verwendete Primersystem GC341F, 907R ist beispielsweise für Eubakterien spezifisch, kann aber keine 16S rDNA beispielsweise aus *Archea* amplifizieren.

### **1.2.6. Biofilmforschung**

Die vorliegende Arbeit ist in die Biofilmforschung der Abteilung Mikrobiologie natürlicher und technischer Grenzflächen am Institut für Funktionelle Grenzflächen eingebunden. Das entwickelte Verfahren wird in Zukunft für die Erforschung natürlicher bakterieller Biofilme genutzt werden. Ziel dieser Forschung ist es, sowohl die Regulation einzelner Bakterien, als auch die Interaktion der unterschiedlichen Bakterien in einem Biofilm zu verstehen. Um diese dynamischen Prozesse erforschen zu können, sind sowohl taxonomische- als auch Genexpressionsdaten notwendig. Bakterielle Biofilme entstehen durch die Besiedlung einer Oberfläche, dies geschieht schon binnen weniger Stunden, nachdem beispielsweise ein Probensträger in einem Oberflächengewässer ausgebracht wurde (Costerton *et al.* 1987). Bei der Besiedlung von Oberflächen durchläuft ein Biofilm verschiedene Stadien, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Zu Anfang der Kolonisierung

einer Aufwuchsfläche, lagern sich erste Bakterien auf der Oberfläche an und beginnen eine extrazelluläre Polymermatrix auszubilden (Abb. 4, Nr. 1, 2). Diese extrazelluläre Matrix erleichtert die Anlagerung von Wachstumssubstraten und anderen Bakterien (Cooksey und Wigglesworth-Cooksey, 1995). Im Rahmen von Tagen entsteht auf der gesamten Oberfläche ein mehr oder weniger geschlossener Biofilm (Abb. 4, Nr. 3), der sich durch das Wachstum einzelner Populationen im Biofilm und die Einwanderung neuer Spezies in den Biofilm und die Freisetzung einzelner Zellen weiter entwickelt (Abb. 4, Nr. 4, 5) (Jackson et al. 2001).

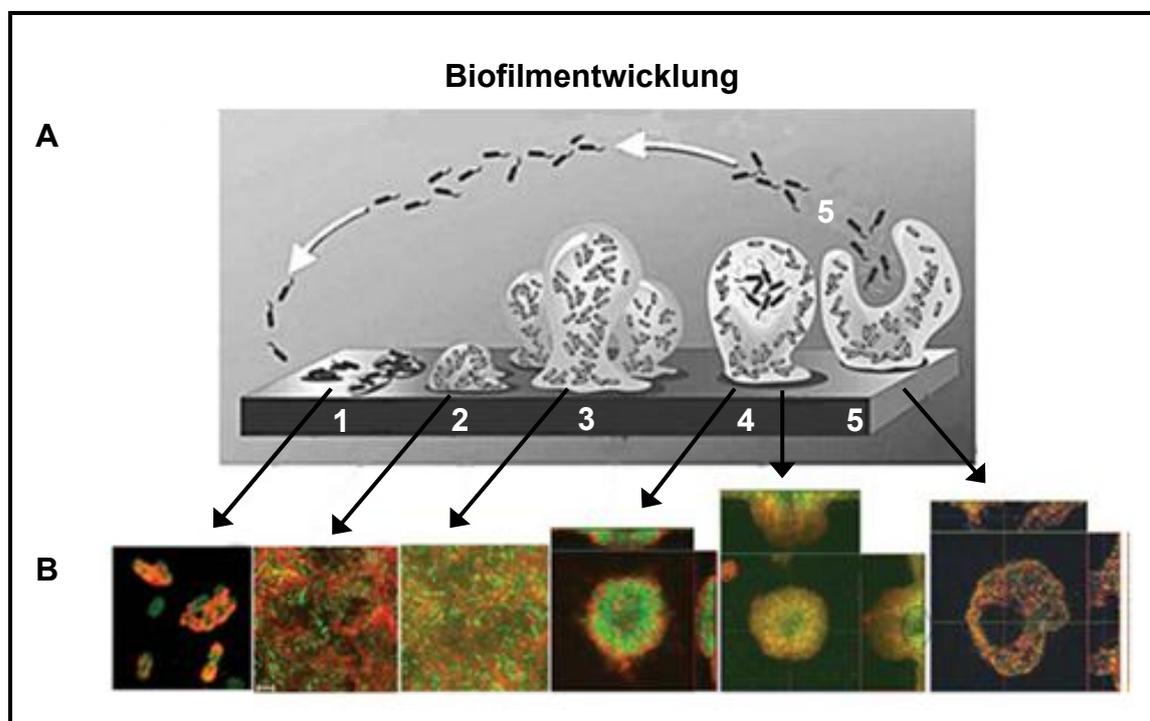


Abbildung 4: Entwicklung eines *P. aeruginosa* Psl Biofilms. (A): Schematische Entwicklung in 5 Schritten (Stoodley *et al.* 2002). (B) Korrespondierende mikroskopische Bilder der Biofilmbildung: extrazelluläre Matrix (rot), GFP markierter *P. aeruginosa* Psl (grün), bei Nr. 4 und 5 zusätzliche Seitenansicht (Ma *et al.* 2009).

Die in der Abbildung dargestellten Reifephase lassen sich in Modellbiofilmen klar voneinander abgrenzen. In natürlichen Biofilmen ist dies wegen der hohen dynamischen Veränderung dagegen nur schwer möglich. Ein reifer natürlicher Biofilm zeichnet sich jedoch immer dadurch aus, dass kontinuierlich neue Organismen hinzukommen und bisher vorhandene Spezies verdrängen. Auch das

Absterben und die Freisetzung von Zellen gehören zur Dynamik eines Biofilms (Jenkinson und Lappin-Scott, 2001). Um solche Veränderungen erfassen und verstehen zu können, sind die molekularbiologischen Analysen von Taxonomie und Genexpression gut geeignet. Aber auch die Mikroskopie ist, als eine der Basistechniken der Biologie, für die Beobachtung der Biofilmarchitektur sehr wichtig. Gerade durch die Anwendung der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie konnte die Reifung von Biofilmen und ihre Reaktion auf Umweltstimuli optisch untersucht werden (Parsek and Tolker-Nielsen, 2005).

Ein wichtiges Ziel der Biofilmforschung ist es, bakterielle Stressantworten besser zu verstehen. Diese spielen in natürlichen- und technischen Prozessen eine wichtige Rolle. So ist bekannt, dass Biofilmbakterien resistenter gegen eine große Bandbreite an natürlichen und technischen Stressfaktoren sind, als planktonisch lebende Zellen. Eine erhöhte Resistenz gegen Biozide, kann beispielsweise Probleme bei der Reinigung von Prozesswassersystemen verursachen. Die erhöhte Stabilität der Biofilme kann mit der großen Varianz an Stressantworten begründet werden. Beispiele für weitere stressinduzierende Bedingungen sind Desinfektion, Hitze- und Kältebehandlung, Nährstofflimitierung oder die Behandlung mit Antibiotika (Muller *et al.* 2007, Fux *et al.* 2005). Auch bei der Trinkwasserdesinfektion mittels UV Licht konnte ein dämpfender Effekt durch eine bakterielle Stressantwort gezeigt werden. Das UV Licht induziert einen DNA Dunkel-Reparaturmechanismus, der die UV geschädigte DNA repariert und ein Überleben der Bakterien im geschlossenen Trinkwasserverteilungssystem ermöglicht. Diese Stressantwort vermindert also die Abtötungsrate der UV-Desinfektion und gefährdet die Hygiene des Trinkwassers (Jungfer *et al.* 2007).

So können also Bemühungen zur Zerstörung, Inhibierung oder Manipulation von Biofilmen und ihrem Wachstum zu Stressantworten führen, die den gewünschten Effekt dämpfen oder verändern. Die Steuerung von Bakterien in natürlichen Habitaten kann dabei helfen, technische Prozesse zu optimieren. Damit bietet sich die Chance, die Qualität biotechnologischer Produkte zu verbessern oder eine Kolonisierung von technischen Systemen durch Biofilme zu regulieren. Solch eine Steuerung natürlicher bakterieller Biofilme erfordert ein detailliertes Wissen über die Zusammensetzung, Funktionen, Interaktionen und Stressantworten der Bakterien während der Entstehung, des Wachstums und des Fortbestehens von Biofilmen.

Bei der Erforschung der bakteriellen Stressantworten fehlt jedoch bis heute eine Methode, die alle aktiven Organismen einer Population erfasst. Somit ist eine Analyse der Genexpression auf RNA Ebene bei gleichzeitiger Erfassung der Taxonomie auf rRNA Ebene nur schwer möglich. Das in dieser Doktorarbeit entwickelte Verfahren versucht, dieser Problematik mit einer *in vivo* Markierung und einer schonenden und schnellen Separation der markierten RNA zu begegnen.

### 1.2.7. Magnetseparation im Bereich der Biotechnologie

Die Magnetseparation wird seit dem 19. Jahrhundert als essentieller Bestandteil diverser Industriezweige eingesetzt. Sie ist heute in unterschiedlichen Bereichen wie Stahlproduktion, Abwasserbehandlung, Lebensmittelindustrie bis hin zur Biotechnologie anzutreffen. Gerade für biotechnologische Anwendungen in chargenweisen Ansätzen ist die Magnetseparation heute ein wichtiges Verfahren. Sie wird vor allem für die Aufreinigung von Proteinen oder Nukleinsäuren aus komplexen Gemischen verwendet. Im Labormaßstab werden meist schwache Permanentmagneten eingesetzt, da hier in sehr geringen Volumina gearbeitet wird. Ein schwaches Magnetfeld reicht dabei für eine ausreichend schnelle Separation der magnetischen Träger aus (Yavuz *et al.* 2009).

Da Biomoleküle als organisches Material nur im Ausnahmefall magnetisch sind, nutzt die Biotechnologie oberflächenfunktionalisierte Magnetpartikel zur Separation der Zielmoleküle. Die Bindung der Moleküle kann sowohl durch unspezifische- als auch durch spezifische Wechselwirkungen vermittelt werden (Yavuz *et al.* 2009).

#### Partikelherstellung

Magnetpartikel, die in Bioseparationen eingesetzt werden, bestehen in der Regel aus kolloidalem Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), das zur Erhöhung der Kapazität beispielsweise silanisiert und mit Carboxylgruppen derivatisiert werden kann (Hawkins *et al.* 1994). Die Magnetit Kolloide können aber auch in eine Polymermatrix eingebettet werden. Die Synthese solcher magnetischen Polymerpartikeln erfolgt beispielsweise in einem Einschlussverfahren während der Polymerisation der Partikel. Im alternativen Coatingverfahren werden die Magnetit-Partikel dagegen mit einem Polymer beschichtet (Bozhinova, 2004). Das Verfahren des Einschlusses von

Magnetpartikeln in eine Polymermatrix ist der einfachste und bis heute am meisten angewendete Prozess zur Herstellung der Grundpartikel für magnetische Sorbentien. Die Synthese kann beispielsweise durch Suspensions- oder Dispersionspolymerisation erfolgen (Lagaly *et al.* 1997). Für die Herstellung magnetischer Sorbentien mittels Suspensionspolymerisation wurden in der Vergangenheit zahlreiche Polymere eingesetzt, z.B. Polyvinylalkohol (Oster *et al.* 2001), Polyvinylacetat-Divinylbenzol (Zheng *et al.* 2003) oder Polymethylmetacrylat (Bozhinova *et al.* 2004). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Polyvinylalkohol Magnetpartikeln ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die so entstehenden magnetischen Polymerpartikel sollten sich im Idealfall durch eine hohe mechanische und chemische Stabilität auszeichnen. Für eine spätere Funktionalisierung sollten die Polymerpartikel eine hohe Dichte an reaktiven Gruppen auf ihrer Oberfläche besitzen (Adachi *et al.* 1997). Alle auf diese Weise hergestellten Grundpartikel können in weiteren Reaktionen an den reaktiven Gruppen der Polymere funktionalisiert werden. Die jeweilige Funktionalisierung richtet sich nach der späteren Separationsanwendung und der angestrebten Wechselwirkung zum Zielmolekül.

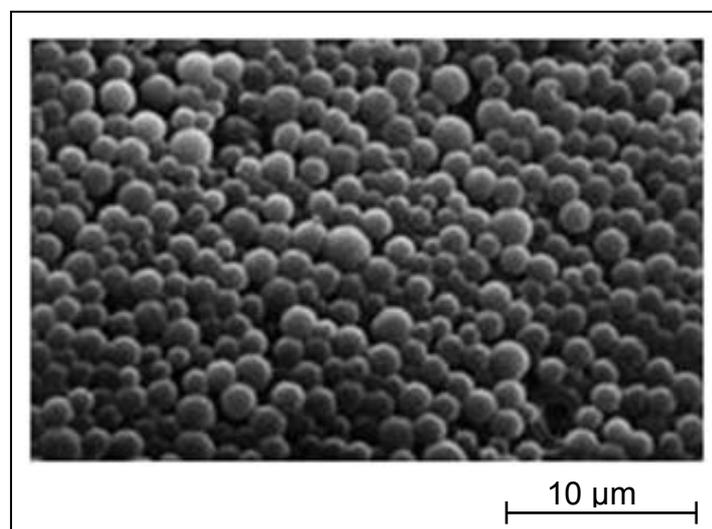


Abbildung 5: ESEM-Aufnahme von magnetischen Polyvinylalkohol Partikeln (M-PVA 012) der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG. Mittlerer Partikeldurchmesser 2 µm (chemagen Biopolymer Technologie AG, Baesweiler, D, 2009).

### Magnetpartikel zur Nukleinsäureseparation

Für die Nukleinsäureseparation wurden in der Vergangenheit diverse Polymermagnetpartikel hergestellt, wobei zu deren Synthese unter anderem die zuvor beschriebenen Methoden eingesetzt wurden. Zum Einschluss des Magnetits in Magnetpartikel wurden synthetische Polymere, wie beispielsweise Silan (Melzak *et al.* 1996), Polystyren (Ugelstad *et al.* 1992), Polyacrylamid (Elaissari *et al.* 2001), Polyvinyl-Alkohol (Oster *et al.* 2001) eingesetzt. Daneben ist aber auch der Einsatz von biologischen Polymeren wie beispielsweise Agarose, Chitosan oder Alginat (Levison *et al.* 1998) beschrieben worden. In wässriger Lösung binden diese Polymer-Magnetpartikel die negativ geladenen Nukleinsäuren, aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen sowie aufgrund der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen.

Die ersten magnetischen Mikropartikel aus Magnetit und hydrophobem Polystyren, die eine enge Größenverteilung und eine sphärische Form aufwiesen, wurden von Ugelstad *et al.* (1992) hergestellt. In diversen biomedizinischen Anwendungen zeigte sich jedoch, dass sie wegen ihrer stark hydrophoben Oberfläche die unspezifische Bindung von Proteinen fördern.

Alternativ hierzu wurden von Melzak *et al.* (1996), mittels Coating, silanisierte Magnetpartikel hergestellt. Diese Partikel wurden unter anderem für die Separation bakterieller Plasmid DNA eingesetzt. Eine detaillierte Untersuchung der dominanten Bindungskräfte der DNA Adsorption zeigte, dass sie durch einen Entropiezuwachs angetrieben wird. Dabei konnten neben den zwei Bindungskräften identifiziert werden, die hauptsächlich zur Adsorption beitragen: (1) intermolekulare Elektrostatische Kräfte und (3) intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der DNA und der Silika-Kontaktschicht (Melzak *et al.* 1996).

Die in dieser Arbeit zumeist verwendeten Polyvinylalkohol Magnetpartikel binden die DNA in Anwesenheit von polyvalente Kationen und in der Abwesenheit von chaotropen Salzen sehr effizient und mit nur geringen Proteinverunreinigungen (Oster *et al.* 2001).

Die Separation von Nukleinsäuren mit den bisher vorgestellten Partikeln basiert auf deren Adsorption an der Partikeloberfläche. Dabei werden DNA und RNA mit den gleichen Partikeln separiert. Um am Ende nur eine der beiden Nukleinsäuren

zu isolieren, wird die störende Komponente in einer spezifischen Reaktion mittels DNase oder RNase abgebaut.

### Funktionalisierung für die Separation spezifischer Nukleinsäuren

Magnetische Polymerpartikel adsorbieren Nukleinsäuren unspezifisch und sind von daher nicht dazu geeignet, bestimmte Nukleinsäuren selektiv zu binden. Dieses Problem einer spezifischen Aufreinigung stellt sich z.B. bei der Separation eukaryontischer mRNA aus einem Gesamt-RNA Extrakt. Um die benötigte Selektivität erreichen zu können, müssen die Partikel mit spezifischen Liganden, wie z.B. Nukleinsäuren, funktionalisiert werden. Im Fall der Separation eukaryontischer mRNA, die eine stabile Polyadenylierung an ihrem 3'-Ende aufweist, werden Poly-(T) Oligonukleotide als kovalente Liganden eingesetzt, die die mRNA in einer Hybridisierungsreaktion binden. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen, sollte darüberhinaus das Polymer entsprechend ausgewählt werden. Bei einer spezifischen Separation von negativ geladenen Nukleinsäuren bieten sich demnach Polymerpartikel mit einer negativ geladenen Oberfläche an. Diese vermeiden eine unspezifische elektrostatische Interaktion von Nukleinsäure und Partikel.

Für die Immobilisierung des Liganden müssen die reaktiven Gruppen auf der Polymerpartikeloberfläche aktiviert werden. Dabei ist zu beachten, dass die Aktivierungsmethode mit der Matrix und dem Liganden kompatibel ist (Hermanson *et al.* 1992). Beispielsweise werden Carbodiimid aktivierte Hydroxylgruppen von Polyvinyl-Alkohol Partikeln mit 5'-Amino-funktionalisierten Poly-(T) Oligonukleotiden funktionalisiert (Oster *et al.* 2001). Modifikationen der Polymerpartikeloberfläche können aber nicht nur zur Funktionalisierung genutzt werden, sondern auch um unspezifische Bindungen unerwünschter Nukleinsäuren an die Oberfläche zu unterbinden.

Neben der zuvor beispielhaft beschriebenen kovalenten Funktionalisierung, können spezifische Biomoleküle auch nichtkovalent über Affinitätsliganden an magnetische Polymerpartikel gebunden werden. Diese aus der Proteinaufreinigung gut bekannte Technik nutzt die biospezifische Wechselwirkung des Liganden mit einem bestimmten Zielmolekül. Für Anwendungen in der Nukleinsäureseparation spielen monospezifische Affinitätsliganden eine wichtige Rolle. Zu diesen zählen

biologische Makromoleküle wie z.B. Proteine oder spezifische Antikörper (Labrou und Clonis, 1994).

Ein Beispiel für einen spezifischen Proteinliganden ist das bakterielle Protein Streptavidin, das das Hapten Biotin (Vitamin B7) hochspezifisch bindet. In seiner nativen Form ist Streptavidin ein Tetramer, das vier Biotinmoleküle binden kann. Die Bindung von Biotin und Streptavidin wird dabei über elf Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt (Wilchek 1990, Livnah *et al.* 1993). Diese große Anzahl von Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Molekülen führt zu der stärksten bisher in der Natur bekannten Bindungskonstante ( $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ). Die Nutzung von Streptavidin als Affinitätsligand ist demnach sehr effektiv. Um aber auch nicht natürlich biotinylierte Moleküle binden zu können, müssen sie mit Biotin gekoppelt werden. Eine Biotinylierung von Nukleotiden kann in einer chemischen Reaktion durchgeführt werden. Hierzu werden beispielsweise Uridin-Triphosphat Nukleotide chemisch zu 5-(3-Amino)Allyluridin umgesetzt, um anschließend an Biotin gebunden zu werden. Diese Nukleotide können dann in einer PCR vermittelten Synthese von Oligonukleotiden eingesetzt werden (Langer *et al.* 1981). Zur Biotinylierung von Proteinen wird ein Biotinyl-*N*-Hydroxy-Succinimid-Ester eingesetzt, der an die Amino-, Hydroxyl- oder Sulphydryl-Gruppen von Proteinen bindet. Das Ausmaß der Biotinylierung kann über die Biotinkonzentration in der Reaktion eingestellt werden (Bayer *et al.* 1976, Houen und Jensen, 1995).

Wird also das eigentliche Zielmolekül biotinyliert, so ist dessen Bindung an streptavidinfunktionalisierte Magnetpartikel unabhängig von seiner eigenen Struktur möglich. Da eine Biotinylierung an viele Biomoleküle gekoppelt werden kann, ist dieses Tag-Ligand-Paar für die biotechnologische Anwendung sehr gut geeignet. Auch in der Nukleinsäureseparation wird es eingesetzt, beispielsweise zur Bindung von biotinylierten Oligo-(T) Nukleotiden an streptavidinfunktionalisierte Magnetpartikel.

Der Einsatz der Magnetseparation ist heute ein integraler Bestandteil der Biotechnologie und für eine Vielzahl von Biomolekülen einsetzbar. Die Grundlage hierfür bilden der Einsatz von Adsorptionsverfahren an Polymermagnetpartikel, oder die spezifische Bindung über einen Liganden. Die Voraussetzung für eine

Separation ist dabei, dass die Funktionalisierung der Magnetpartikel und das Zielmolekül aneinander binden (Yavuz *et al.* 2009).

In dieser Arbeit wurden streptavidinfunktionalisierte Polyvinylalkohol Magnetpartikel (M-PVA SAV) der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG als Standardpartikel eingesetzt. Das Streptavidin wurde bei diesen 2 µm großen Partikeln über Carbodiimid aktivierte Hydroxylgruppen gebunden. Diese Partikel weisen eine hydrophile Oberfläche auf und können biotinylierte Moleküle binden.

### Automatisierung magnetischer Nukleinsäureseparationen

Für viele Anwendungen, wie z.B. der RNA Separation mittels magnetischer Partikel sind bereits automatisierte Verfahren entwickelt worden. Diese werden zur Separation von genomischer DNA, Gesamt-RNA oder eukaryontischer mRNA eingesetzt. Diese Geräte wurden für den Einsatz von Magnetpartikel basierten Separations-Kits entwickelt. Beispiele für solche Geräte sind der chemagic Prepito™ der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG für Separations-Kits der selben Firma, der Tecan Freedom EVO® der Firma Tecan Group Ltd. für Dynabeads® der Firma Invitrogen und der BioRobot® M48 der Firma QIAGEN GmbH für Separations-Kits der selben Firma.

Der BioRobot® M48 erlaubt die direkte automatische Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Zellmaterial. Er kann 48 Proben prozessieren, wobei die Separationsprotokolle jeweils für 6 Proben parallel durchgeführt werden. Zentrale Bauteile sind hierbei eine Pipettiereinheit und ein Permanentmagnet. Die Separationsansätze werden in den Pipettenspitzen als Reaktionsraum bearbeitet. Durch eine Applikation der Pipettenspitzen an den Permanentmagneten können die Partikel beim Pufferwechsel im Reaktionsraum zurückgehalten werden. Die Volumina für Binde-, Wasch- und Elutionsschritte liegen zwischen 25 und 1000 µl.

Der Tecan Freedom EVO® kann ebenso für die Separation von Nukleinsäure eingesetzt werden, wobei dieses Gerät nur Zellrohextrakte verarbeiten kann. Dafür kann es für Hochdurchsatz-Separationen angewendet werden. Hierzu findet eine parallele Behandlung von 96 Proben statt. Eine Separation nimmt dabei nur 23 Minuten in Anspruch. Der Tecan Freedom EVO® nutzt Permanentmagneten zur Separation und tauscht wie der BioRobot® M48 die Lösungen in den Kavitätä-

ten mittels einer Pipettiereinheit aus. Auch dieses Gerät ist in der Lage Flüssigkeitsvolumen von bis zu 1000 µl zu verarbeiten.

Auch der in dieser Doktorarbeit verwendete chemagic Prepito™ separiert Nukleinsäuren mittels magnetischer Träger und kann 12 Proben parallel verarbeiten. Wie beim BioRobot® M48 können auch bei diesem Gerät Zellen direkt zur Separation der darin enthaltenen Nukleinsäuren eingesetzt werden. Dieses Gerät unterscheidet sich jedoch in der Funktionsweise des Magnetseparators stark von den beiden zuvor beschriebenen Verfahren. Dieser besteht aus 12 magnetisierbaren Nadeln und einem darüber angebracht, stabförmigen Permanentmagneten (siehe Abbildung 6). Die Magnetisierung der Nadeln kann durch die Drehung des Magnetzylinders gesteuert werden, da das magnetische Feld nur in Richtung der Polarisierung wirkt. Bei waagrecht ausgerichteten Polen sind die Nadeln unmagnetisch. Wird der Magnetzylinder um 90° gedreht weist seine Polarisierung in Richtung der Nadeln und sie werden aufmagnetisiert. Auf diese Weise können die Magnetpartikel separiert und an den Nadeln haftend in einen anderen Puffer überführt werden. Die über Zahnräder mit einem Elektromotor verbundenen Nadeln können um ihre Längsachse in schnelle Rotation versetzt werden. Durch Abschalten des Magnetfeldes (erreicht durch eine erneute 90° Drehung des Magnetzylinders) und gleichzeitige Rotation der Nadeln werden die Magnetpartikel im umgebenden Puffer vollständig resuspendiert. Bei Verfahrensschritten mit längerer Inkubationsdauer können die Nadeln somit auch als Rührer eingesetzt werden, um eine Sedimentation der Magnetpartikel zu verhindern. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen werden die Nadeln des Magnetseparators durch Einwegkunststoffspitzen ummantelt (Franzreb und Wohlgemuth, 2001). Nach der automatischen Vorlage der Puffer transferiert der chemagic Prepito™ die Magnetpartikel in verschiedene Reaktionsräume einer 96 Kavitäten Mikrotiterplatte. Durch die Inkubation der Magnetpartikel in einem bestimmten Puffer können Äquilibrierungs-, Wasch-, Bindungs- und Elutionsschritte durchgeführt werden. Durch das Umsetzen der Magnetpartikel in jeweils neue Kavitäten wird darüberhinaus die Aufreinigung verbessert, da kaum Flüssigkeitsreste des vorhergehenden Puffers transferiert werden. Der chemagic Prepito™ kann dabei Volumina zwischen 100 und 600 µl prozessieren und eine Separation von genomischer DNA dauert nur ca. 30 Minuten.

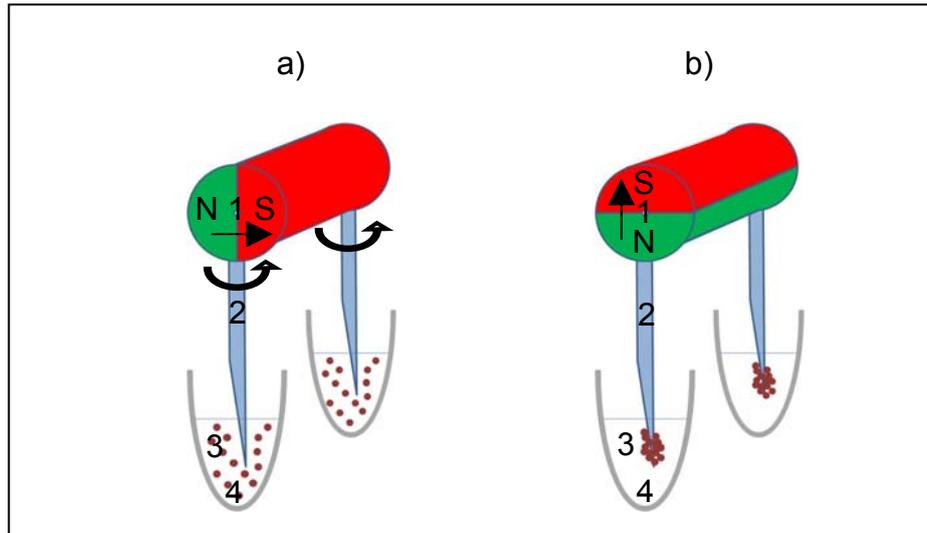


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise des chemagic Prepito™. a): Separatornadeln (2) sind unmagnetisch, da die Polarisierung des Magnetzylinders (1) im 90° Winkel zu der Längsachse der Separatornadeln steht. Durch die zusätzliche Drehung der Separatornadeln bleiben die Magnetpartikel (3) im Puffer (4) resuspendiert. b): Durch Drehung des Magnetzylinders (1) werden die Separatornadeln (2) aufmagnetisiert, da das Magnetfeld in Richtung der Nadeln wirkt. Hierdurch kommt es zur Separation der Magnetpartikel (3) an den Separatornadeln (2).

### 1.2.8. Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit war es, ein Verfahren zu entwickeln, dass die Erforschung der Zusammensetzung, Aktivität und Funktionalität von natürlichen bakteriellen Populationen erleichtert. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde das in Abbildung 7 dargestellte Vorgehen gewählt.

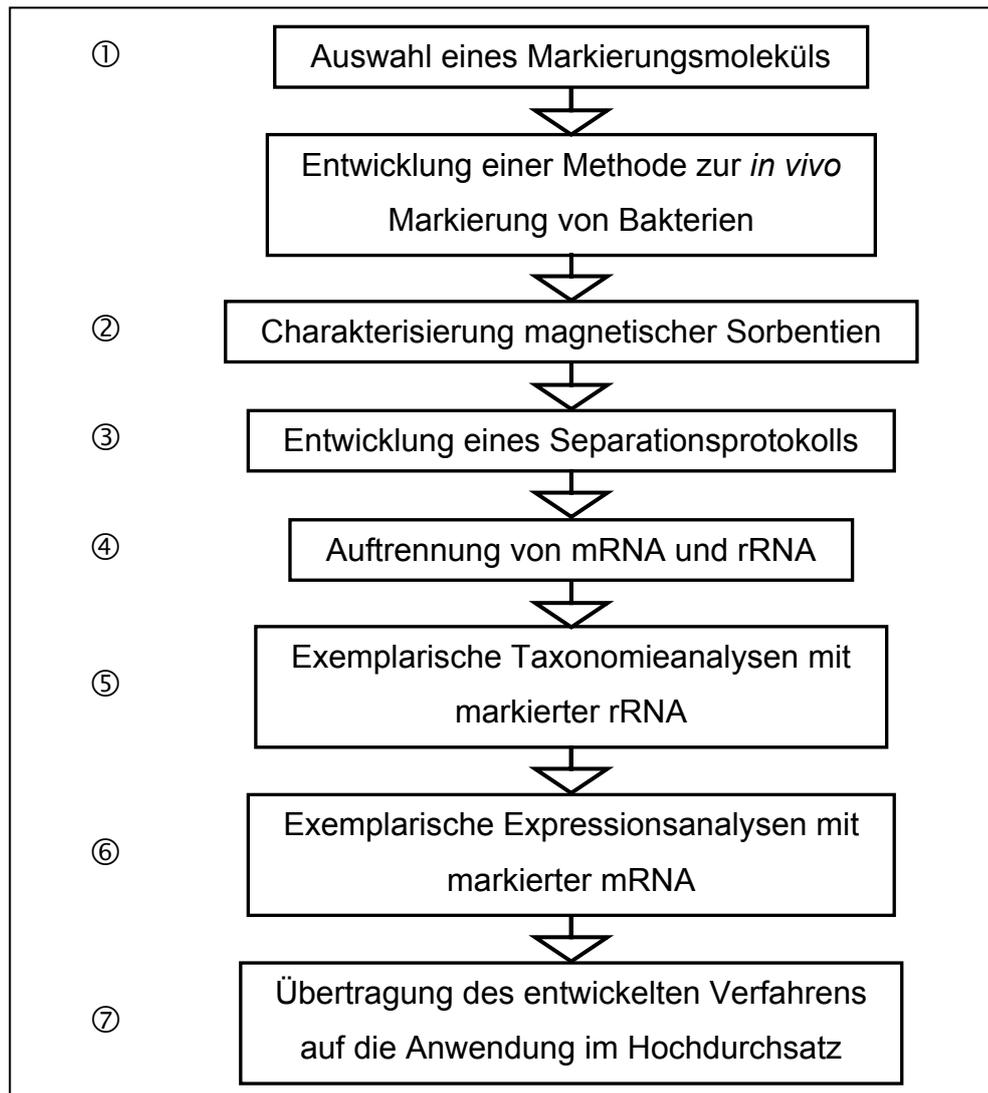


Abbildung 7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verfahrensschritte (Ziffer ① – ⑦), die in dieser Arbeit zu verwirklichen waren.

Zuerst sollte ein geeignetes Nukleotidanalogen ausgewählt werden, das durch die intakte Zelle aufgenommen und in die *de novo* synthetisierte RNA eingebaut wird. Dieses Molekül sollte die neu synthetisierte RNA *in vivo* markieren ①, so wie dies bisher nur *in vitro* möglich war, und zugleich eine spezifische Separation der markierten RNA über magnetische Sorbentien ermöglichen ②. Mit dem entwickelten Separationsverfahren sollte die markierte Ziel-RNA aus einem Gesamt-RNA Extrakt effizient und spezifisch aufgereinigt ③ und anschließend in einer Capture-Separation in eine mRNA und eine rRNA Fraktion aufgeteilt werden ④.

Nachfolgend sollte die Anwendbarkeit der isolierten markierten RNA sowohl für Taxonomieanalysen ⑤ als auch für Expressionsanalysen ⑥ gezeigt werden. Dabei sollte das entwickelte Verfahren nicht nur für Reinkulturen eingesetzt, sondern auch auf natürliche Biofilme unbekannter Zusammensetzung übertragen werden.

In Kooperation mit der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG sollte abschließend die Eignung dieses Verfahrens für eine Anwendung im Hochdurchsatz getestet werden ⑦.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte und Materialien

Die hier aufgeführten Geräte und Materialien wurden für viele unterschiedliche Methoden eingesetzt. Speziell für ein Verfahren eingesetzte Geräte sind im jeweiligen Kapitel aufgeführt.

Geräte:

*Autoklav Dampfsterilisator Varioklav (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D)*

*Mikrowelle (Bosch, Stuttgart, D)*

*Lumi-Imager T1<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Magnetrührer MR 3001 (Heidolph, Schwabach, D)*

*pH-Meter 766 Calimatic (Knick, Berlin, D)*

*Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, D)*

*Vortexer (Bibby Sterilin, Staffs, GB)*

*Zentrifuge Biofuge pico (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D)*

*Analysen-Waage Laboratory LC 220 S (Sartorius, Göttingen, D)*

*Magnetic Particle Concentrator for eppendorf microtubes (Invitrogen, Karlsruhe, D)*

Materialien:

*Duran Flaschen und Bechergläser 50 bis 2000 ml (Schott, Mainz, D)*

*Nitril Handschuhe (Ansell Health Care, Brüssel, B)*

*Pinzetten, Reaktionsgefäß-Halterungen (VWR, Darmstadt, D)*

*Research<sup>®</sup> Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10000 µl (Eppendorf, Hamburg, D)*

*Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, D)*

*Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht, D)*

*Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, D)*

## 2.2. Bakterien

Es wurden die folgenden Referenzbakterien verwendet:

*Pseudomonas aeruginosa* # 154 (Umweltisolat)

*Enterococcus faecium* B7641 (Umweltisolat)

Beide verwendeten Bakterien lagen in Glycerinkulturen (50% Glycerin (Merck Darmstadt, D)) vor.

Neben diesen Referenzbakterien wurden Biofilme auf Stahlcoupons in Trinkwasser, auf Kieselsteinen in Flusswasser und aus Seesediment eingesetzt.

### 2.2.1. Wachstumsbedingungen für Referenz-Bakterien in Flüssigkultur

R2A-Agar (Merck Darmstadt, D)

Cetremid-Agar (Merck Darmstadt, D)

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar (Merck Darmstadt, D))

Herz-Hirn-Bouillon (Brain Heart Infusion, BHI-Medium (Merck Darmstadt, D))

Vancomycin Stammlösung 3,2 mg/ml [10µl = 0,032 mg] (Sigma-Aldrich, München, D)

Das Bakterium *P. aeruginosa* #154 wuchs auf R2A Agar, auf Cetremid-Agar (Selektiv für *Pseudomonas* sp.) und in BHI-Medium bei 37°C. Das Bakterium *E. faecium* B7641 wuchs auf R2A-Agar, KAA-Agar (Selektiv für *Enterococcus* sp.) und in BHI-Medium bei 37°C. Die Zellen wurden den Glycerinkulturen entnommen, auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie als Übernachtskultur in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen angeimpft und konnten am darauffolgenden Tag für weiterführende Versuche eingesetzt werden.

### 2.2.2. Induktion der Genexpression von *rpoS* in *P. aeruginosa* und von *vanA* in *E. faecium* B7641

Der Sigmafaktor  $\sigma^S$ , der von dem Gen *rpoS* des Gram-negativen Bakteriums *P. aeruginosa* kodiert wird, ist Teil der bakteriellen Stressantwort. Er wird bei Nährstofflimitierung und hohen Zelldichten induziert, was zu einer verstärkten

Transkription in der stationären Wachstumsphase führt (Murakami *et al.* 2005). Zur Induktion des *rpoS* Gens wurden Kulturen des Gram-negativen Bakteriums *P. aeruginosa* unterschiedlicher optischer Dichte untersucht. Die nicht induzierte Kultur wurde bis zur mittleren exponentiellen Phase ( $OD_{600} = 0,6$ ) inkubiert. Die Kultur mit dem induzierten *rpoS* Gen wurde dagegen bis in die späte stationäre Phase ( $OD_{600} = 2,6$ ) hinein wachsen gelassen. Nach einer Gesamt-RNA Isolierung (Kapitel 2.3) konnte die Induktion anhand der vorhandenen mRNA Menge in einer quantitativen PCR bestimmt werden.

Die Vancomycin-Resistenz des Gram-positiven Referenzbakteriums *E. faecium* wird durch das *vanA* Gen vermittelt. *VanA* ist dabei der dominante Resistenzfaktor in Enterokokken und kodiert für eine Ligase, welche die Affinität der bakteriellen Zellwand für Vancomycin, einem Glykopeptidantibiotikum, stark vermindert (Arthur *et al.* 1996). Die Induktion des *vanA* Gens dieser Bakterien ist von der Vancomycin-Konzentration im Wachstumsmedium abhängig, wobei ab 32  $\mu\text{g/ml}$  eine starke Induktion zu beobachten ist. In den Expressionsversuchen wurde Vancomycin dem Medium zu einer Endkonzentration von 32  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Bei den induzierten Bakterien wurde das Vancomycin dem Medium schon während der Anzucht der Bakterien in der Lag-Phase ( $OD_{600} = 0,02$ ) zugegeben. Wohingegen die nicht induzierten Zellen die ganze Zeit über in Vancomycinfreiem Medium kultiviert wurden. Alle Zellen wurden in der mittleren exponentiellen Phase ( $OD_{600} = 0,6$ ) geerntet. Nach einer Gesamt-RNA Isolierung (Kapitel 2.3) konnte die Induktion anhand der vorhandenen mRNA Menge in einer quantitativen PCR bestimmt werden.

### **2.2.3. Bestimmung des Bakterientiters in einer Flüssigkultur**

*Aquamate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D)*

*BHI-Medium (Merck Darmstadt, D)*

Zur Beobachtung des Wachstums von Bakterien, wird die optische Dichte einer Bakteriensuspension bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Bei dieser Messung wird die Lichtdurchlässigkeit einer Flüssigkeit für monochromatisches Licht von 600 nm Wellenlänge gemessen. Die Menge des absorbierten Lichts ist für Werte zwischen 0,1 und 1 direkt proportional zur Keimzahl in der Bakteriensuspension.

Eine  $OD_{600}$  von 1 entspricht dabei ca.  $10^8$  Bakterien pro ml Suspension. Die Messung erfolgt gegen bakterienfreies BHI-Flüssigmedium.

#### **2.2.4. Bakterielle Biofilme aus natürlichen Habitaten**

*Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht, D)*

*Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, D)*

*Pinzetten, Reaktionsgefäß-Halterungen (VWR, Darmstadt, D)*

Die Biofilme wurden aus drei unterschiedlichen Habitaten isoliert. Diejenigen aus Trinkwasser wuchsen während sechsmonatiger Inkubation auf sterilen Stahlcoupons. Hierzu wurden sie in einem Trinkwasser befüllten Durchflussreaktor mit regelmäßigem Wasseraustausch inkubiert. Die Biofilme aus Flusswasser wurden durch die Sammlung von Kieselsteinen aus dem ufernahen Flusssediment des Rheins bei Eggenstein Leopoldshafen beschafft. Die Biofilme aus Seesediment wurden durch die Beprobung des Oberflächensediments des Baggersees Eggenstein erhalten. Alle drei Aufwuchssubstrate wurden während der Markierungsexperimente in Wasser ihres Habitats aufbewahrt.

#### **2.2.5. Markierung von Bakterien aus Flüssigkultur und aus natürlichen Biofilmen**

*Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Steriles Wasser*

*Alternative PBS (1x): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g  $KH_2PO_4$ , 1,44 g  $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ , pH 7,3, mit VE- $H_2O$  ad 1000 ml (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*RNA-Protect-Lösung (QIAGEN, Hilden, D)*

Zur Markierung der Referenzbakterien aus Flüssigkulturen wurde ein Aliquot der jeweiligen Übernachtskultur verwendet. Die zu markierende Kultur wurde mit einer  $OD_{600}$  von 0,02 in BHI- Flüssigmedium angeimpft. In der mittleren exponentiellen Phase wurden die Zellen für die Markierung geerntet.

Die natürlichen Biofilme dagegen wurden zur Markierung weder von ihrer Aufwuchsoberfläche entfernt, noch aus ihrer natürlichen Umgebungsflüssigkeit ent-

fernt. Die Markierung wurde also im natürlichen Habitat in einem 2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt.

Das detaillierte Protokoll der *in vivo* Markierung ist im Ergebniskapitel 3.2.1 dargestellt, da es sich dabei um eine zentrale Entwicklung dieser Doktorarbeit handelt.

## **2.3. RNA Isolierung**

### **2.3.1. Materialvorbereitung**

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorkehrungen, da sie durch ubiquitär verbreitete RNasen sehr leicht abgebaut wird. Um im Labor ein RNase freies Milieu zu schaffen, ist es erforderlich, bei allen Arbeitsschritten Handschuhe zu tragen. Außerdem müssen alle wiederverwendbaren Gefäße und Apparaturen vor Arbeitsbeginn 20 Minuten in 0,5%iger SDS-Lösung inkubiert und anschließend mit VE-H<sub>2</sub>O gespült werden. Das VE-H<sub>2</sub>O wurde vor seiner Verwendung auf eine RNase Aktivität hin untersucht. In diesem Wasser konnte jedoch auch nach mehreren Tagen kein Abbau zugegebener RNA festgestellt werden. RNase freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen. Um garantiert RNase freies Wasser herzustellen wurde VE-H<sub>2</sub>O mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (Kurz: DEPC-H<sub>2</sub>O). DEPC inhibiert RNasen irreversibel, da es kovalent an primäre und sekundäre Amine der Histidin-Seitenketten im aktiven Zentrum dieser Enzyme bindet. 1000 ml VE-H<sub>2</sub>O wurden 1 ml DEPC zugesetzt und 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei wird das DEPC über H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser abgebaut. Nach dem Autoklavieren konnte das DEPC-H<sub>2</sub>O direkt eingesetzt werden.

### **2.3.2. Gesamt RNA-Isolierung**

*RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN, Hilden, D)*

*TE-Puffer (1x): 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA-2Na\*2H<sub>2</sub>O, pH 8,0, mit VE-H<sub>2</sub>O ad 1000 ml (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*Lysozym-Stammlösung: 100 mg/ml Lysozym in TE-Puffer (Sigma-Aldrich, München, D)*

*β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, D)*

*Ethanol 100% (Roth, Karlsruhe, D)*

*RNase free DNase (QIAGEN, Hilden, D)*

Die Gesamt RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit, einem RNA Isolierungs-Kit der Firma QIAGEN durchgeführt.

Zur Zellyse wurden 100 µl Lysozym-TE-Puffer-Lösung zu den Zellpellets der *in vivo* markierten Bakterien gegeben. Für Gram-negative Bakterien wurde eine 0,4 mg/ml und für Gram-positive Bakterien eine 3 mg/ml Lysozym-Lösung verwendet. Die Lyse-Reaktionsansätze wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Protokoll wurde nach Herstellerangaben mit einer 20 minütigen Inkubation in DNase I durchgeführt, um den Gehalt an DNA in der isolierten RNA zu senken.

Für die Gesamt-RNA-Isolierung aus den untersuchten Biofilmen wurde das Herstellerprotokoll wie folgt angepasst:

**a) Trinkwasser-Biofilme und Biofilme aus Flusswasser:**

Zur Lyse der Zellen wurden jeweils 300 µg Lysozym in 100 µl TE-Puffer zugegeben, 30 Sekunden gevortext und 15 Sekunden bei 16,0 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Probe seitwärts rollend bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. 350 µl RLT-β-Mercaptoethanol-Puffer wurden zupipettiert, 1 Minute gevortext und 15 Sekunden bei 16,0 g zentrifugiert. Die Biofilme auf den Kieselsteinen wurden zusätzlich 15 Sekunden gevortext und 15 Sekunden bei 16,0 g zentrifugiert. 250 µl 100%iges Ethanol wurden zugegeben und der Biofilm mit einer Pipettenspitze abgeschabt, um eine möglichst hohe RNA-Ausbeute zu erzielen.

**b) Biofilme auf Seesedimenten:**

Die Zellen wurden mit 750 µg Lysozym in 250 µl TE-Puffer inkubiert, 30 Sekunden gevortext und für 1 Stunde bei Raumtemperatur über Kopf geschüttelt. Es wurden 350 µl RLT-β-Mercaptoethanol-Puffer zugegeben, 1 Minute gevortext und 250 µl 100%iges Ethanol zupipettiert. Das Sediment wurde 15 Sekunden gevortext und 1 Minute bei 9,5 g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde in beiden Fällen auf die RNeasy Mini Spin Columns überführt und es wurde weiter nach Herstellerangaben mit DNase I Behandlung verfahren.

Für alle Proben wurde die RNA zwei Mal von der Säule mit je 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zu ihrer weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

#### 2.4. RNA Quantifizierung

*NanoDrop ND 1000 Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen, D)*

*DEPC-H<sub>2</sub>O*

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden mittels des Spektralphotometers NanoDrop ermittelt. Vor der Messung wurde das Probenhaltesystem für 20 Minuten in einer 0,5%iger SDS-Lösung inkubiert um RNase-Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Bestimmung der RNA Konzentration und der RNA Reinheit wird die Absorption der Probelösung bei 260 und 280nm gegen eine RNA freie Vergleichslösung gemessen. Dabei liegt das Absorptionsmaximum von RNA bei 260 nm. Da jede Base einen eigenen molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  aufweist, ist er von der Sequenz und der Länge eines RNA Moleküls abhängig (dATP 15400 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, dCTP 9000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, dGTP 13700 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, UTP 10000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Er müsste somit für jedes Molekül einzeln berechnet werden. Dies ist jedoch für Gesamt-RNA aus beliebigem Probenmaterial, wegen der mangelnden Kenntnis der Sequenz, nicht möglich. Für die Quantifizierung von RNA ist heute generell akzeptiert, dass eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 40 ng/µl entspricht (Sambrook *et al.* 1989). Basierend auf diesem Wert berechnet die Software des NanoDrop ND 1000 die RNA Konzentration.

Die Reinheit der RNA Probe ergibt sich durch die Division der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm. Dabei liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm, so dass dieser Wert eventuelle Proteinverunreinigungen widerspiegelt. Liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,1 so liegt die RNA in reiner Form vor (Reinheit:  $\text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280}$ ).

## 2.5. Nachweis der RNA Markierung im Dot Blot Verfahren

*Bio-Dot Apparatur (Bio-Rad, München, D)*

*Vakuumpumpe MPC 301Z (ILMVAC, Ilmenau, D)*

*CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, Cambridge, GB)*

*Enviro-Genie<sup>®</sup> (Scientific Industries, Bohemia, USA)*

*Lumi-Imager F1<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Nylon-Membran, positiv geladen (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Bio-Dot SF Filter Papier (Bio-Rad München, D)*

*Blocking Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments 150 U (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*CPD-Star, ready-to-use (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*DEPC-H<sub>2</sub>O*

*Puffer 1: 11,6 g Maleinsäure, 8,8 g NaCl, mit NaOH ad pH 7,5, mit VE-H<sub>2</sub>O ad 1000 ml (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*Puffer 2: 10 ml 10%ige Blocking-Stammlösung in H<sub>2</sub>O mit Puffer 1 ad 100 ml (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Puffer 3: 15,76 g Tris-HCl; 5,84 g NaCl und 10,17 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, mit NaOH ad pH 9,5, mit VE-H<sub>2</sub>O ad 1000 ml (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*Antikörperlösung: Anti-DIG-AP Fab-Fragment 1:10.000 in Puffer 2 verdünnt (Roche Diagnostics, Mannheim, D)*

*Waschpuffer: 0,3 ml Tween 20 mit 100 ml Puffer 1 verdünnt (Merck Darmstadt, D)*

Vor der Benutzung wurde die Dot-Blot Apparatur für 20 Minuten in 0,5%igem SDS in DEPC-H<sub>2</sub>O inkubiert und wie in Abbildung 8 dargestellt aufgebaut: Auf die Gummidichtung wurden zwei dünne Whatman-Filter-Papiere aufgelegt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O befeuchtet. Darauf wurde eine positiv geladene Nylonmembran platziert, die ebenfalls befeuchtet wurde. An die vollständig zusammengebaute Apparatur wurde Vakuum angelegt und jede Kavität mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurden die Proben aufgetragen, mittels Vakuum auf die Membran transferiert und die Kavitäten mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Das Trocknen der Membran erfolgte für 30 Minuten unter der Sterilbank. Die RNA wurde durch Bestrah-

lung mit UV-Licht im UV Crosslinker für 2 Minuten kovalent auf der Membran fixiert.

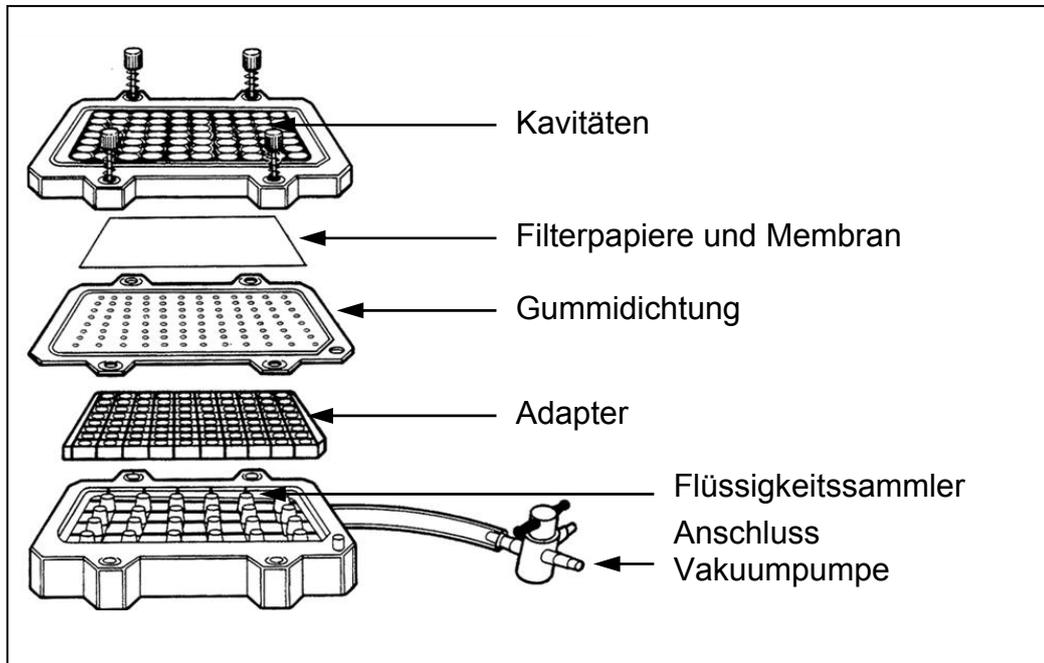


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Dot-Blot Apparatur.

Die Detektion der immobilisierten DIG markierten RNA erfolgte immunologisch. Sie wurde durch einen Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper (Anti-DIG-AP-Antikörper) detektiert, der nach der Umsetzung des CPD-Star Substrats zu einem Chemilumineszenzsignal führte. Hierzu musste der Blot entwickelt werden und wurde mit folgenden Pufferlösungen in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen, bei Raumtemperatur unter drehen im Enviro-Genie® Inkubator gehalten:

- 5 min. Puffer 1
- 30 min. Puffer 2
- 60 min. Antikörperlösung
- 15 min. Waschpuffer
- 2x 15 min. Puffer 1
- 5 min. Puffer 3

Die Membran wurde anschließend in eine Plastikhülle transferiert, mit CDP-Star Substratlösung (enthält 1,2-Dioxetan-Phosphat) überschichtet und bei 37°C für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Bei dieser Nachweisreaktion wird das in die RNA

eingebaute Digoxigenin durch den Anti-DIG-AP-Antikörper nachgewiesen. Die konjugierte alkalische Phosphatase setzt dabei das Chemolumineszenz-Substrat, CDP-Star, in einer enzymkatalysierten Dephosphorylierung um. Die Dephosphorylierung des 1,2-Dioxetan-Phosphat (CDP) resultiert in einem instabilen Phenolat-Anion, das sehr schnell zerfällt. Die dabei frei werdende Energie wird in Form von Licht emittiert, die als Chemilumineszenzsignal detektiert werden kann. Dieses Lichtsignal wurde 15 Minuten mittels CCD-Kamera im Lumi-Imager detektiert. Die einzelnen Signale konnten mit der Software des Lumi-Imagers in Light Units (LU) quantifiziert werden.

## **2.6. DNase / RNase Assay**

*DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN, Hilden)*

*RNase-free DNase I (QIAGEN, Hilden)*

*RNase A (QIAGEN, Hilden)*

Zur Überprüfung und Quantifizierung des Einbaus von DIG-11-UTP in die RNA wurde die isolierte Gesamt-RNA mit DNase und RNase verdaut.

Die DNase-Behandlung wurde nach der Zugabe von 1/10 Volumen RDD-Puffer mit 1/40 Volumen RNase freier DNase (Konzentration: 2,73 Units/ $\mu$ l) durchgeführt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die DNase anschließend durch Erhitzen auf 70°C für 5 Minuten inaktiviert.

Der RNase-Verdau wurde, mit einer Endkonzentration von 20  $\mu$ g/ml, in PBS-Puffer durchgeführt. Nach der Zugabe der RNase, wurde die Probe, 15 Sekunden pulsartig gevortext, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Sekunden gevortext. Die RNase wurde thermisch bei 70°C inaktiviert.

Nach der enzymatischen Behandlung wurden die Versuchsansätze mit dem DyeEx Kit der Firma QIAGEN (QIAGEN, Hilden) gereinigt. Durch diesen Schritt sollten die Einzelnukleotide von den hochmolekularen Nukleinsäuren abgetrennt werden.

## 2.7. Separation Digoxigenin markierter RNA

*Magnetic Particle Concentrator for Eppendorf microtubes (Invitrogen, Karlsruhe, D)*

*Diverse Magnetpartikel (chemagen Biopolymer Technologie AG, Baesweiler, D)*

*Mouse monoclonal [BT.21H8] to Digoxigenin (Biotin) (ab419) (abcam, Cambridge, GB)*

*20x SSC (Stammlösung): 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat, pH 7,0 (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*0,5x SSC: 75 mM NaCl; 7,5 mM Na<sub>3</sub>Citrat, pH 7,0 (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*0,5x SSC pH 11,5: 75 mM NaCl, 7,5 mM Na<sub>3</sub>Citrat, 12,5 mM NaOH  
DEPC-H<sub>2</sub>O (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

*Isolierte Gesamt-RNA aus DIG markierten Proben*

*IS-DNA (Internr Standard) Amplicon des tuf Gens*

Das detaillierte Protokoll der Separation *in vivo* markierter RNA ist im Ergebniskapitel 3.3.1 dargestellt, da es sich dabei um eine zentrale Entwicklung dieser Doktorarbeit handelte.

## 2.8. rRNA Isolierung mittels Capture-Hybridisierung

Bei der Capture-Hybridisierung werden Nukleinsäuren bekannter Sequenz, durch Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotiden, an eine Festphase gebunden und separiert. Diese Methode wurde zur Abtrennung von rRNA aus einem Gesamt-RNA-Extrakt eingesetzt, da die Sequenz der rRNA speziesübergreifend stark konserviert ist. Um die Capture-Separation für möglichst viele Bakterien-spezies anwenden zu können, muss die Sequenz der Oligonukleotide zu den konservierten Bereichen der rRNA aller Bakterien homolog sein. Durch den Einsatz von 5S-, 16S- und 23S rRNA-komplementäre Oligonukleotiden ist es möglich, die gesamte rRNA aus einer bakteriellen Gesamt-RNA abzutrennen. Das Verfahren wurde nach einem von Pang *et al.* (2004) publizierten Protokoll durchgeführt. In Tabelle 1 sind die Sequenzen der verwendeten Capture Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 1: Sequenzen der eubakteriellen Oligonukleotide, die über einen Spacer mit 14 Thymin Nukleotiden biotinyliert waren.

Name	Sequenz [5'-Biotin (T) <sub>14</sub> nach 3']
5S-1	TCGTTTCACTTCTGAGTTCGGCATGGGAT
16S-1	TCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC
16S-2	TTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGT
16S-3	TTTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAG
23S-1	TTTGCGACTTTCCAGACGCTTCCACTAACA
23S-2	TTCATTAGTCGGTTCGGTCCTCCAGTTAGTGT
23S-3	TTTCAACATTAGTCGGTTCGGTCCTCCAGT
23S-4	TTCATTCGCACTTCTGATACCTCCAGCAAC
23S-5	TTATTCGCACTTCTGATACCTCCAGCAACCC

Die 5S, 16S und 23S Oligonukleotide wurden in 100 µl 0,5x SSC aufgenommen, 5 Minuten bei 90°C denaturiert und 3 Minuten im Eisbad abgekühlt. Es wurden jeweils 0,25 mg M-PVA SAV2 Magnetpartikel mit einem äquimolaren Gemisch an Capture Oligonukleotiden von zusammen 250 pmol eingesetzt.

Vor der Separation wurden die M-PVA SAV2 Magnetpartikel in ein Reaktionsgefäß überführt, in den Magnetseparator eingesetzt und die überstehende Lösung verworfen. Die Partikel wurden drei Mal mit 200 µl 0,5x SSC gewaschen, danach wurde der Oligo-Mix zu den Magnetpartikeln pipettiert. Die Bindung der biotinylierten Oligos an die streptavidinfunktionalisierten Partikel erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter gelegentlichem Schütteln per Hand. Anschließend wurden die Oligonukleotid-funktionalisierten Partikel im Magnetseparator separiert, der Überstand wurde verworfen und die Partikel wurden zwei Mal in 100 µl 0,5x SSC gewaschen.

Parallel dazu wurde die RNA in 200 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen, bei 70°C für 5 Minuten denaturiert, 3 Minuten auf Eis gekühlt und zu den mit Oligonukleotiden funktionalisierten Partikeln gegeben. Die Hybridisierungsreaktion zwischen rRNA und Capture-Oligos wurde bei 68°C für 30 Minuten unter gele-

gentlichem Mischen per Hand durchgeführt. Danach wurden die Magnetpartikel an einem Permanentmagneten separiert, wobei der Sorptionsüberstand die mRNA enthielt, die zur weiteren Analyse aufbewahrt wurde. Die Partikel wurden dann mit 100 µl 0,5x SSC gewaschen (Waschfraktion). Die an die Partikel gebundene rRNA wurde in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O durch einminütiges Erhitzen auf 80°C und unter Schütteln bei 850 upm eluiert (Elutionsfraktion). Dieser Schritt wurde ein Mal wiederholt.

Die einzelnen Proben der Separation wurden zur Analyse in einem Formaldehyd-Agarosegel oder in einer rRNA gerichteten PCR-DGGE eingesetzt. Sollte auch der Sorptionsüberstand in eine reverse Transkription eingesetzt werden, so wurde er zuvor mit dem RNeasy Micro Kit (Protokoll Cleanup) entsalzt, um die Enzymreaktion nicht zu inhibieren.

## **2.9. Agarosegel- und Agarose-Formaldehydgelelektrophorese**

*Horizontale Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt, D)*

*Power Pack Basic (Bio-Rad, München, D)*

*QA Agarose TM Multipurpose, Q-BIOGENE (Merck Darmstadt, D)*

*37% (v/v) Formaldehyd in VE-H<sub>2</sub>O*

*Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München, D): Stammlösung 10 mg/ml in VE-H<sub>2</sub>O*

*MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure): Nach Herstellerangaben in VE-H<sub>2</sub>O (Merck Darmstadt, D)*

*TAE-Puffers (50x): 242,2 g (4 M) Tris, 41,0 g (1 M) Natriumacetat, 18,6 g (0,1 M) EDTA, pH mit Eisessig exakt auf 8,0 einstellen, ad 1000 ml mit VE-Wasser auffüllen (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D).*

*1x TAE Puffer: TAE-Puffers (50x) mit VE-H<sub>2</sub>O 1:50 verdünnen*

*DNA Größenstandard 100 bp DNA Ladder XIV (Roche)*

*Ladepuffer: EDTA 50 mM pH 8,0, 20% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen-Cyanol-> 0,4 g Ficoll, 5mg Bromphenolblau, 5 mg Xylen-Cyanol+ 2 ml EDTA (alle Chemikalien Merck Darmstadt, D)*

Beide Agarosegelelektrophorese-Methoden basieren auf dem gleichen Prinzip und unterscheiden sich lediglich in Pufferzusammensetzung und der Zugabe von Formaldehyd.

Doppelsträngige DNA Moleküle, die beispielsweise in einer PCR erzeugt werden, können in einem 1%igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese ist dagegen eine Methode zur Auftrennung von 16S und 23S-rRNA. Da einzelsträngige RNA durch intra- und intermolekulare Basenpaarung verstärkt Sekundärstrukturen ausbildet, weisen identische Moleküle in einer Gelelektrophorese ein unterschiedliches Laufverhalten auf. Um dies zu verhindern, wird dem Agarosegel Formaldehyd zugegeben, da es diese Sekundärstrukturen denaturiert. Diese Methode wurde angewandt, um nach der Capture-Hybridisierung zu überprüfen, ob alle rRNA Moleküle gebunden und eluiert werden konnten.

Für das Agarosegel mussten 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt werden. Zur Herstellung 1%iger Formaldehyd-Agarosegele wurden 0,4 g Agarose in 38 ml MOPS-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden 2 ml 37%ige Formaldehydlösung zugesetzt.

Die Gele wurden in eine entsprechende Apparatur gegossen und der Kamm für die Geltaschenbildung eingesetzt. Je 10 µl der DNA bzw. RNA Proben wurden mit 1 µl Ladepuffer versetzt und 15 Minuten bei 70°C inkubiert, um ihre Sekundärstruktur zu zerstören. Nach der Aushärtung des Gels wurde es in eine mit Puffer befüllte Elektrophoresekammer gegeben. Der Laufpuffer für das Agarosegel ist 1x TAE-Puffer, der für das Formaldehyd-Agarosegel 1x MOPS-Puffer. DNA und RNA Proben wurden, ebenso wie 3 µl Größenstandard in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophoresekammer wurde an die Stromversorgung angeschlossen und die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Sobald der farbige Ladepuffer das untere Drittel des Gels erreichte, hatten sich die Banden im Gel weit genug aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte im Lumi-Imager durch 2 Sekunden Belichtung im UV-Bereich mit einer Anregungswellenlänge von 600 nm. Das in die Nukleinsäure interkalierende Ethidiumbromid stellte dabei sicher, dass die Banden detektiert werden konnten.

## 2.10. Primer

In dieser Arbeit wurden für die verschiedenen PCR Ansätze unterschiedliche Primer verwendet, die in Tabelle 2 aufgeführt sind

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer

Primer	Organismus	Zielgen	Sequence (5' → 3')	Reference
PaRpoSF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>rpoS</i>	AGAGCAACCTGCGGTTGGT	Nicht publiziert
PaRpoSR		<i>rpoS</i>	GGGACAGTCCGCGATTGA	
Pa23FP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23S rRNA	TCCAAGTTTAAGGTGGTAGGCTG	Volkman <i>et al.</i> 2007
Pa23RPb		23S rRNA	ACCACTTCGTCATCTAAAAGACGAC	
Paer-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>regA</i>	TGCTGGTGGCACAGGACAT	Lee <i>et al.</i> 2006
Paer-R		<i>regA</i>	TTGTTGGTGCAGTTCCTCATTG	
vana3FP	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>vanA</i>	CTGTGAGGTCGGTTGTGCG	Volkman <i>et al.</i> 2004
vana3RP		<i>vanA</i>	TTTGGTCCACCTCGCCA	
ECST	<i>Enterococcus faecium</i>	23S rRNA	AGA AAT TCC AAA CGA ACT TG	Frahm <i>et al.</i> 1998
ENC 854R		23S rRNA	CAG TGC TCT ACC TCC ATC ATT	
Ent1tuf618	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG	Ke <i>et al.</i> 1999
Ent2tuf729		<i>tuf</i>	AACTTCGTCACCAACGCGAAC	
GC341F	Eubacteria	16S rDNA	*CCTACGGGAGGCAGCAG*	Green <i>et al.</i> 2005
907R		16S rDNA	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	

\*GC clamp:

5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCGCCCCCGCCCC-3'

## 2.11. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Sterile Reaktionsgefäße, 0,2 ml DNA frei (Eppendorf, Hamburg, D)

10x PCR-Puffer, einschließlich 15 mM MgCl<sub>2</sub> (QIAGEN, Hilden, D)

*dNTP Set, 100 mM Lösungen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (QIAGEN, Hilden, D) Endkonzentration 10 mM*

*Vorwärts- und Rückwärts-Primer, je 10 mM (Applied Biosystems, Foster City USA)*

*HotStar-Taq<sup>TM</sup> Polymerase 5 Units/ $\mu$ l (QIAGEN, Hilden, D)*

*LiChroSolv PCR-Wasser*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und effektive Methode zur *in vitro* Amplifikation (Vermehrung) von spezifischen DNA-Abschnitten. Die Amplifikation erfolgt in drei Schritten mittels einer hitzestabilen DNA Polymerase: Denaturieren der doppelsträngigen DNA durch Hitze, Anlagern (Annealing) der Primer und Neusynthese des jeweiligen neuen Gegenstrangs aus Nukleotidbausteinen. Diese drei Schritte werden 30 – 40 mal wiederholt. Bei den Primern handelt es sich um kurze Nukleotidsequenzen, die zu bestimmten Regionen der DNA komplementär sind und als Erkennungsstruktur für die DNA Polymerase dienen.

Ein 50  $\mu$ l-Ansatz einer PCR-Reaktion enthielt:

- 5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, einschließlich 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1  $\mu$ l dNTP-Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)
- 1,5  $\mu$ l Vorwärts- und Rückwärts-Primer (je 10 mM)
- 0,25  $\mu$ l HotStar-Taq<sup>TM</sup> Polymerase (5 units/ $\mu$ l, Qiagen)
- 1-10  $\mu$ l Template-DNA
- ad 50  $\mu$ l mit PCR-Wasser

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 mit folgendem Temperaturprofil:

	95°C	15:00 min.	einleitende Aktivierung der Polymerase
	94°C	0:30 min.	Denaturierung
35 Zyklen:	50°C	0:30 min.	Annealing
	72°C	1:00 min.	Elongation
	72°C	10:00 min.	abschließende Extension
	4°C	$\infty$	Herunterkühlen

Dieses Temperaturprogramm wurde für alle in der PCR verwendeten Primer eingesetzt. Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.9) aufgetrennt und am Lumi-Imager ausgewertet.

### 2.11.1. Herstellung von DNA Amplikons für Kontrollexperimente

Sowohl für den DNase/RNase Assay, als auch für die Analyse der Separationsspezifität wurden DNA Amplikons benötigt. Diese Fragmente wurden in einer PCR, nach dem in Kapitel 2.11 aufgeführten Reaktionsansatz und Temperaturprofil durchgeführt. Als Template wurde genomische DNA der Referenzbakterien eingesetzt. Diese wurde zuvor mit dem QIAGEN Genomic Kit (QIAGEN, Hilden, D) nach dem Herstellerprotokoll isoliert.

Als interner Standard für die Analyse der Separationsspezifität wurde ein 111 bp langer Teil des *tuf* Gens aus *E. faecium* amplifiziert. Dieses Gen kodiert für den Elongationsfaktor EF-tu dieses Organismus. Die Amplifikation wurde mit den Primern Ent1tuf618, Ent2tuf729 und mit genomischer DNA aus *E. faecium* als Template durchgeführt.

Für den DNase/RNase Assay musste ein Digoxigenin markiertes DNA Fragment hergestellt werden. Hierzu wurde der in Kapitel 2.11 aufgeführte Reaktionsansatz durch die Zugabe von 0,1 nmol Digoxigenin-11 2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat (Roche Diagnostics, Mannheim, D) ergänzt. Das Temperaturprofil konnte für diese PCR beibehalten werden. Für den DNase/RNase Assay wurde ein 100 bp langes DIG markiertes Amplifikat des *regA* Gens aus *P. aeruginosa* hergestellt. Dieses Gen kodiert für einen Regulator der ToxinA Synthese dieses Organismus. Die Amplifikation wurde mit den Primern Paer-F, Paer-R und mit genomischer DNA aus *P. aeruginosa* als Template durchgeführt.

## 2.12. Reverse Transkription

*TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City USA): enthält 10x TaqMan RT Puffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 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, Foster City USA)*

Während einer reversen Transkription wird einzelsträngige RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese Reaktion wird durch die Reverse Transkriptase katalysiert und kann mit spezifischen Primern für bestimmte Gene durchgeführt werden. Durch den Einsatz von Random Hexamer Primern ist es

aber auch möglich, die gesamte in einer Probe vorhandene RNA unspezifisch in cDNA umzuschreiben. Da die RNA einen komplementären Strang zum codogenen Strang der DNA darstellt und in 5' – 3'-Richtung synthetisiert wird, kann die Transkription nur mit Primern durchgeführt werden, die in ihrer Sequenz dem codogenen Strang entsprechen. In der reversen Transkription werden somit komplementäre RNA Kopien des Gens transkribiert. Die gebildete cDNA dient als Template für die nachfolgende PCR-DGGE Analysen und qPCR Untersuchungen.

Ein 50 µl-Ansatz der Reversen Transkription enthält:

- 5 µl 10x TaqMan RT Puffer
- 11 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 µl desoxyNTPs Mixture
- 2,5 µl Rückwärts-Primer (2,5 µM)
- 1,0 µl RNase Inhibitor
- 1,25 µl MultiScribe (Applied Biosystems)
- ad 50 µl mit PCR-Wasser

Bei der Untersuchung von Separationen wurden alle Fraktionen auf das gleiche Volumen eingestellt. Von jeder Probe wurden 10 µl in der reversen Transkription eingesetzt. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die umgeschriebenen Mengen an cDNA denen in den Separationsfraktionen entsprachen.

Der Temperaturverlauf der reversen Transkription im Thermocycler lautet:

25°C	10:00 min.	einleitende Aktivierung der Polymerase
48°C	30:00 min.	reverse Transkription
95°C	5:00 min.	Inaktivierung der Polymerase
4°C	∞	Herunterkühlen

### **2.13. Populationsanalyse von Bakterien**

Eine molekularbiologische Methode zur Darstellung der mikrobiellen Diversität komplexer Ökosysteme ist die Auftrennung durch PCR vervielfältigter 16S rDNA-Fragmente in der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE). Die DGGE zählt zu den hochauflösenden DNA-Elektrophoresetechniken unter Verwendung einer Polyacrylamid-Gelmatrix.

Durch die Wahl der Primer und Reaktionsbedingungen in der PCR ist es möglich, gezielt 16S rDNA-Fragmente von Mikroorganismen zu vervielfältigen. Die Amplifikate sind gleichlange Fragmente der 16S rDNA mit unterschiedlicher, artspezifischer Basenzusammensetzung. Das Trennprinzip der DGGE basiert auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von DNA-Fragmenten gleicher Länge. Dieses unterschiedliche Schmelzverhalten wird durch die Basen-Sequenz der DNA-Fragmente hervorgerufen. So bilden die Basen Guanin (G) und Cytosin (C) in einem Doppelstrang drei Wasserstoffbrückenbindungen aus, wohingegen Adenin (A) und Thymin (T) nur über 2 Brückenbindungen verbunden sind. Wegen der geringeren Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen weist die Bindung von A und T einen geringeren Schmelzpunkt als die von C und G auf. Demnach hängt der Schmelzpunkt eines doppelsträngigen DNA-Fragments direkt von der Menge an GC-reichen Sequenzen ab. Ein Aufschmelzen eines Doppelstrangs kann aber nicht nur durch erhöhte Temperatur erreicht werden, sondern auch durch den Zusatz von chemischen Denaturierungsmitteln. Bei der DGGE werden Harnstoff und Formamid als chemische Denaturierungsmittel eingesetzt. Durch den Gradienten im DGGE-Gel, der parallel zur Elektrophoreserichtung verläuft, werden bei diesem Verfahren die DNA Fragmente nach ihrer Sequenz aufgetrennt. Die zunehmende Konzentration an Denaturierungsmittel sorgt für ein gradientenabhängiges Aufschmelzen der DNA Fragmente. Das Aufschmelzen der DNA zu Einzelsträngen führt zu einer sterischen Hinderung der Migration der Fragmente im Gel. Somit können die denaturierten DNA-Fragmente nicht weiter wandern und es kommt zur Ausbildung von DNA-Banden. Durch die Einführung GC-reicher Sequenzen (GC-clamp) über die PCR-Primer, kann die Trennschärfe der Banden verbessert werden. Die 30-40 Basen langen GC-reichen Sequenzen schmelzen im DGGE-Gel nicht auf und wirken wie ein Anker, der die beiden aufgeschmolzenen DNA-Stränge nach Denaturierung zusammenhält. Dies behindert die Migration im Gel zusätzlich, so dass sich schärfere Banden ausbilden.

In dieser Arbeit wurden die Biofilm-Populationen mittels rRNA gerichteter denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) charakterisiert. Die zu untersuchende RNA Probe wurde hierzu in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde in einer PCR ein Abschnitt der revers transkribierten 16S rRNA spezifisch amplifiziert. Das spezifische PCR-Produkt dieser

cDNA wurde in einem Agarosegel überprüft und bei sehr schwachen Signalen nochmals in eine PCR eingesetzt. Anschließend wurden diese PCR-Produkte für die DGGE verwendet, ausgewählte Banden ausgeschnitten und für die Sequenzierung vorbereitet.

### 2.13.1. PCR für die DGGE

*Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*

*Sterile Reaktionsgefäße, 0,2 ml, DNA frei (Eppendorf, Hamburg, D)*

*10x PCR-Puffer, einschließlich 15 mM MgCl<sub>2</sub> (QIAGEN, Hilden, D)*

*dNTP Set, 100 mM Lösungen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (QIAGEN, Hilden, D), Endkonzentration 10 mM*

*GC341F, 907R Primer, je 10 mM (Applied Biosystems, Foster City, USA)*

*HotStar-Taq<sup>TM</sup> Polymerase 5 Units/μl (QIAGEN, Hilden, D)*

*LiChroSolv PCR-Wasser*

Die cDNA wurde in einer PCR eingesetzt, wobei mit jedem Zyklus die Annealingtemperatur um 1°C gesenkt wurde. Durch diese zunehmend unspezifische Anlagerungstemperatur wurden möglichst viele unterschiedliche Bakterien erfasst. Für diese PCR wurde das folgende Temperaturprogramm nach Emtiazi *et al.* (2004) angewandt.

	95°C	15:00 min.	einleitende Aktivierung der Polymerase
	94°C	1:00 min.	Denaturierung
10 Zyklen:	65°C *	2:00 min.	Annealing
	72°C	1:30 min.	Elongation
	94°C	1:00 min.	Denaturierung
20 Zyklen:	55°C	1:00 min.	Annealing
	72°C	1:30 min.	Elongation
	72°C	7:00 min.	abschließende Extension
	4°C	∞	Herunterkühlen

\* Temperaturemniedrigung um 1°C je Zyklus

Die 50 μl-Ansätze dieser PCR-Reaktionen wurden wie in Kapitel 2.11 beschrieben angesetzt, wobei 16S rRNA-spezifische Primer für Eubakterien verwendet

wurden. PCR-Wasser diente als Negativkontrolle, als Positivkontrolle wurde DNA aus *P. aeruginosa* herangezogen. Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.9) überprüft. Waren nach dieser PCR zu geringe Mengen an PCR-Produkt vorhanden, so wurden diese Proben in einer zusätzlichen PCR eingesetzt. Dafür wurde dasselbe Volumen (10 µl), das zur Überprüfung auf ein Agarosegel aufgetragen wurde, an PCR-Reagenzien zugegeben (0,5µl HotStarTaq DNA Polymerase, 2 µl PCR Puffer, 5 µl dNTP Mix, 2,5 µl PCR-Wasser).

### 2.13.2. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

*DCode System<sup>TM</sup> (Bio-Rad, München, D)*

*Power Pack Basic (Bio-Rad, München, D)*

*UV-Tisch (Fröbel Labortechnik, Lindau, D)*

*50x TAE-Puffer, pH 8,5: 242,0 g TRIS Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O; auf pH 8,5 einstellen, autoklavieren*

*0,5 M EDTA: 18,61 g EDTA, ad 100 ml mit VE-H<sub>2</sub>O; pH auf 8,0 einstellen*

*10% APS-Lösung: 0,1 g Ammoniumpersulfat, ad 1 ml mit VE-H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, München, D)*

*TEMED (Sigma-Aldrich, München, D)*

*Denaturierende Lösungen: 15 min. im Ultraschallbad entgasen, Lagerung in abgedunkelten Flaschen bei +4°C*

*70% denaturierende Lösung (HDL): 18,8 ml 40% Acrylamid/Bis 37,5:1, 2,0 ml 50x TAE-Puffer, 28 ml deionisiertes Formamid, 29,4 g Harnstoff, ad 100 ml mit VE-H<sub>2</sub>O*

*40% denaturierende Lösung (LDL): 18,8 ml 40% Acrylamid/Bis 37,5:1, 2,0 ml 50x TAE-Puffer, 16 ml deionisiertes Formamid, 16,8 g Harnstoff, ad 100 ml mit VE-H<sub>2</sub>O*

*0% denaturierende Lösung: ml 40% Acrylamid/Bis 37,5:1, 2,0 ml 50x TAE-Puffer, ad 100 ml mit VE-H<sub>2</sub>O*

*Ladepuffer*

Für die Herstellung eines DGGE Gels wurden zwei Glasplatten mit Isopropanol gereinigt, Spacer dazwischen gelegt, ausgerichtet und mittels Schraubleisten fixiert. Die Unterkanten dieser Apparatur mussten völlig plan sein, um ein Auslaufen des Gels zu verhindern. Diese Apparatur wurde in den Gießstand gestellt. Es

wurden Gele mit einem denaturierenden Gradienten von 40 bis 70% Harnstoff angefertigt. Dazu wurde eine „High Denaturing Liquid“ (HDL) und eine „Low Denaturing Liquid“ (LDL) angesetzt, die beim Gießen mit Hilfe eines Gradientenerzeugers gemischt wurden. Nach dem Gießen des Trenngels wurde es mit Isopropanol überschichtet, damit es während der Polymerisation nicht austrocknete. Vom auspolymerisierten Gel wurde das Isopropanol dekantiert und das Sammelgel mit einer Pipette gegossen. Es setzte sich aus 2,5 ml 0% denaturierender Lösung, 80 µl Ladepuffer, 45 µl 10% APS und 4,5 µl TEMED zusammen. Ein eingesetzter Kamm bewirkte das Ausbilden der Geltaschen.

Der Elektrophorese-Tank wurde mit ausreichend 1x TAE-Puffer (pH 8,5) befüllt und auf 60°C vorgeheizt. Das auspolymerisierte Gel wurde in den Halter eingesetzt und in den Tank gehängt. Der Kamm wurde entfernt, die Geltaschen mit Puffer gut gespült und mittels Hamiltonspritze beladen. Es wurden 5-15 µl Probe mit 3 µl Ladepuffer versetzt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die gesamte Elektrophorese-Einheit in eine Isolierbox überführt und Pumpe samt Rührer eingeschaltet. Der Elektrophoreselauf erfolgte für 16 bis 17 h bei 70 V und 60°C.

Das DGGE-Gel wurde mit SYBR Gold in 1x TAE-Puffer (pH 8,0) für 10 Minuten im Dunkeln gefärbt. Die Auswertung erfolgte im Lumi-Imager bei 2 Sekunden Belichtung mit 520 nm. Banden die für eine Sequenzierung genutzt werden sollten, wurden auf dem UV-Tisch ausgeschnitten.

### **2.13.3. Sequenzierung**

*UV-Tisch (Fröbel Labortechnik, Lindau, D)*

*Skalpell (VWR, Darmstadt, D)*

*Thermo mixer compact (Eppendorf, Hamburg, D)*

*Nanodrop ND 1000 (Peqlab, Erlangen, D)*

*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, Foster City USA)*

*Polymer POP4 (Applied Biosystems, Foster City USA)*

*Puffer 10x mit EDTA (Applied Biosystems, Foster City USA)*

*LiChroSolvWasser (VWR, Darmstadt, D)*

*ABI PRISM® Genetic Analyser 310 (Applied Biosystems, Foster City USA)*

*Glaskapillare (47 cm x 50 µm; Applied Biosystem, Foster City USA)*

*Software Sequencing Analysis (Applied Biosystems, Foster City USA)*

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. Die Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten ddNTPs werden dabei spezifisch durch einen Laser detektiert.

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 wurden die Banden des DGGE-Gels auf dem UV-Tisch 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 NanoDrop ND 1000 photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.4).

Die Sequenzier-Reaktionen wurden in 20 µl Ansätzen durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 4 µl Premix, 3 - 10 µg DNA-Template, 10 pmol Vorwärts- oder Rückwärts-Primer, aufgefüllt auf 20 µl Gesamtvolumen mit dH<sub>2</sub>O.

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

	96°C	5:00 min.	einleitenden Aktivierung der Polymerase
25 Zyklen:	96°C	0:10 min.	Denaturierung
	60°C	0:05 min.	Annealing
	60°C	1:00 min.	Elongation
	4°C	∞	Herunterkühlen

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 (nach Herstellerangaben, QIAGEN). Hierbei wurde das Produkt auf eine Gelmatrix in einem Spin-Säulchen pipettiert und mit der Tischzentrifuge Biofuge Pico bei 0,75 g für 3 Minuten 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 der folgenden Programmierung durchgeführt:

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

Die Auswertung der Sequenzierreaktionen wurde mit Hilfe der Sequencing Analysis-Software durchgeführt. Ein Vergleich der Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen wurde über eine frei zugängliche NCBI-Datenbank durchgeführt.

## 2.14. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

*ABI Prism 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City USA)*

*96-Well-Platte (optical reaction plate) (Applied Biosystems, Foster City USA)*

*Optische Folie (optical adhesive covers) (Applied Biosystems, Foster City USA)*

*Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix: enthält SYBR<sup>®</sup> Green I Farbstoff Ampli Taq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase (LD), dNTPs, passiv Referenz, Pufferkomponenten. (Applied Biosystem, Foster City USA)*

*Alternativ QuantiTect SYBR Green PCR Kit: enthält SYBR<sup>®</sup> Green I Farbstoff, HotStar Taq DNA Polymerase, dNTPs, passiv Referenz, Pufferkomponenten (QIAGEN, Hilden, D)*

*Primer; 5 µM (Applied Biosystem, Foster City USA)*

In der quantitativen PCR (qPCR) wird die Amplifikation einer bestimmten Zielsequenz in „Echt-Zeit“ während der PCR-Zyklen erfasst. Diese Methode wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrometer gekoppelten Thermocycler der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Messgerät erfasst für jeden PCR-Zyklus die Fluoreszenz, die direkt proportional mit der Amplifikat-Menge zunimmt. Das Fluoreszenzsignal wird direkt durch einen Detektor aufgenommen und verrechnet. Dabei wird beobachtet in welchem PCR Zyklus die Fluoreszenz einen bestimmten Grenzwert übersteigt, der sich deutlich von der des Hintergrundes unterscheidet. So ergibt sich ein  $C_t$  Wert (threshold cycle), der ein Maß für die eingesetzte Templatmenge darstellt. Je früher die Fluoreszenz-Intensität ( $\Delta R_n$ ) den Schwellenwert (threshold) erreicht, umso mehr Kopien des Ziel-Templates waren in der Probe vorhanden. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation in einer PCR kann über eine Kalibration oder den relativen Vergleich zweier Proben die RNA Menge in der Probe nach Pfaffl (2001) bestimmt werden. Ein  $\Delta C_t$  Wert von 3,3 zwischen zwei Proben, in denen die gleiche Zielsequenz untersucht wurde, entspricht einem Konzentrationsunterschied von einer Zehnerpotenz. In dieser Arbeit wurde dieses Nachweissystem für Expressionsanalysen und zur Quantifizierung der markierten RNA in den Separationsexperimenten genutzt. Die Menge

der RNA entspricht dabei der Menge an cDNA, die nach einer reversen Transkription einer Probe in einer qPCR gemessen wurde. Ein exemplarischer Amplifikationsverlauf einer solchen qPCR ist in Abbildung 9 zu sehen.

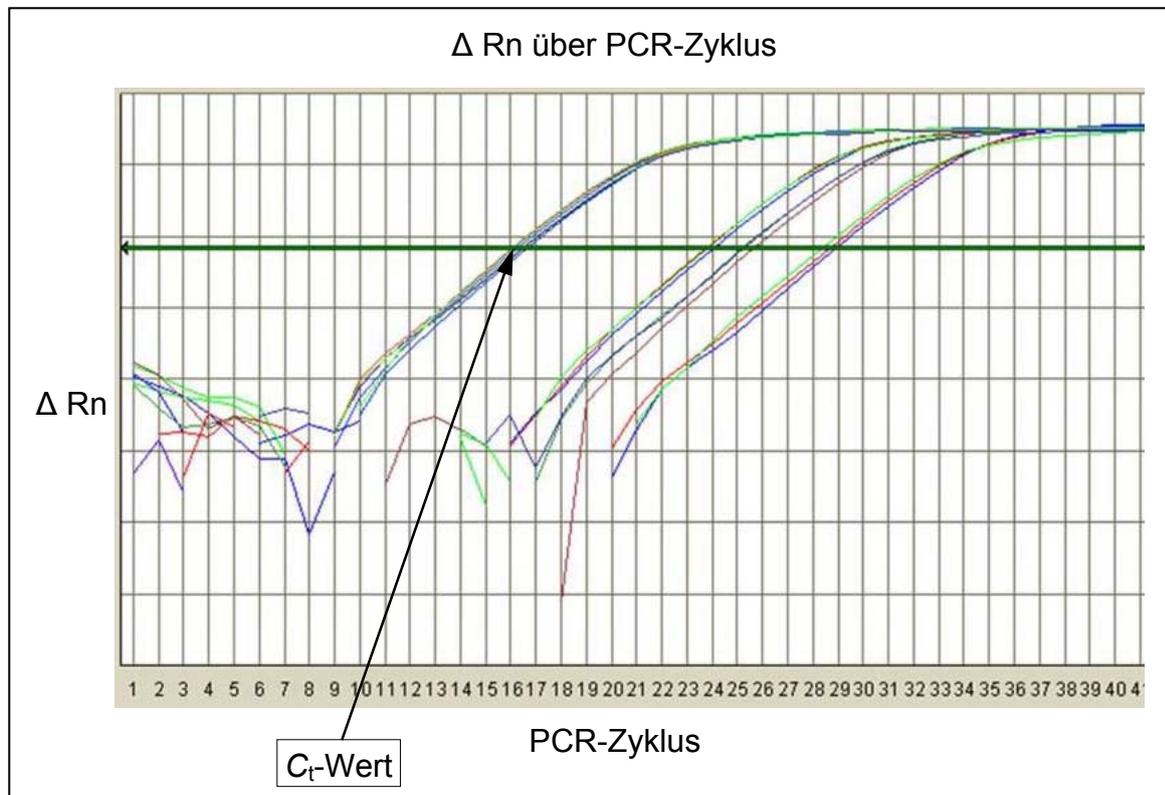


Abbildung 9: Amplifikationsverlauf bei einer qPCR

In dieser Arbeit wurde ein Power SYBR<sup>®</sup> Green Mastermix in der qPCR eingesetzt. Dieser enthält den Cyanin-Farbstoff SYBR Green, der nur dann ein Fluoreszenz-Signal emittiert, wenn er in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA interkaliert. Damit ist das Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Amplifikationsmenge. Nach der Amplifikationsreaktion wurde zusätzlich eine Schmelzkurve aufgenommen, um die Reinheit des Amplifikats und damit die Zuverlässigkeit der Daten beurteilen zu können. Während des Aufschmelzens der DNA nimmt das Fluoreszenzsignal ab, da die DNA ab ihrem Schmelzpunkt einzelsträngig vorliegt und SYBR Green nicht mehr interkalieren kann. So weist jedes Amplifikat eine für seine Sequenz spezifische Schmelztemperatur auf. Ist in der Schmelzkurve nur ein einziger Fluoreszenztiefpunkt vorhanden, so liegt ein reines Amplifikat vor.

In einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu\text{l}$  wurden die folgenden Reagenzien eingesetzt:

- 12,5  $\mu\text{l}$  2x Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix
- 1,5  $\mu\text{l}$  Vorwärts-Primer (5  $\mu\text{M}$ )
- 1,5  $\mu\text{l}$  Rückwärts-Primer (5  $\mu\text{M}$ )
- 5  $\mu\text{l}$  Template (cDNA aus dem RT-Ansatz)
- ad 25  $\mu\text{l}$  PCR-Wasser.

Für die qPCR wurde folgendes Temperaturprogramm mit Schmelzkurve durchlaufen:

	50°C	2:00 min.	Inkubationsschritt
	95°C	10:00	einleitende Aktivierung der Polymerase
45 Zyklen:	95°C	0:15 min.	Denaturierung
	60°C	0:30 min.	Annealing
	60°C	0:30 min.	Elongation
	95°C	0:15 min.	Denaturierung
	60°C	0:35 min.	Schmelzkurve, Temperatur jede Sekunde um 1°C ansteigend
	95°C	0:15 min.	

Die Auswertung der qPCR Versuche wurde mit der 7300 System SDS RQ Study Software durchgeführt.

## 2.15. Messung von Zeta-Potential und isoelektrischem Punkt

*ZetaSizer 5000 (Malvern, Herrenberg, D)*

*1 M NaOH (Merck Darmstadt, D)*

*1 M HCl (Merck Darmstadt, D)*

Als Zeta-Potential wird das elektrische Potential eines Partikels an der hydrodynamischen Scherebene bezeichnet, das sich mit dem pH-Wert der umgebenden Lösung verändert. Ist es positiv, so wirkt der Partikel nach außen hin elektrisch positiv, ist es dagegen negativ, wirkt er nach außen hin elektrisch negativ geladen. Am isoelektrischen Punkt erscheint er elektrisch neutral, da seine Nettoladung Null ist.

Das Zeta-Potential wurde im ZetaSizer 5000 nach Vorgaben des Gerätehandbuchs gemessen. Hierfür wurden 1 mg Magnetpartikel im Reaktionsgefäß in VE-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mittels 1 M NaOH auf einen pH-Wert größer 12 eingestellt. In 18 Einzelschritten wurde dieser mittels 1 M HCl bis auf pH 2 titriert. An jedem dieser Einzelschritte wurde das Zeta-Potential als fünffach Bestimmung aufgenommen.

Die Signale wurden von der Gerätesoftware verarbeitet und konnten in EXCEL ausgewertet werden, wobei eine polynomische Regression vierten Grades bestimmt wurde. Der Wert für ein Zeta-Potential von Null, also den Isoelektrischen Punkt, wurde mit einem Online-Kalkulator errechnet (<http://www.arndtbrunner.de/mathe/scripts/polynome.htm> (Oktober 2008)).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Auswahl eines zur Separation geeigneten Markierungsmoleküls

Voraussetzung für die Entwicklung einer *in vivo* Markierung mit anschließender Separation war die Auswahl eines geeigneten Markierungsmoleküls. Für diese Arbeit waren dabei nur Strukturen geeignet, die drei Anforderungen erfüllten: (i) spezifischer Einbau in die RNA, (ii) Detektierbarkeit in einer Nachweisreaktion und (iii) Bindung an einen spezifischen Liganden. Das gewählte Molekül sollte somit die neu synthetisierte RNA markieren und als Tag in einem Separationssystem verwendet werden können. Wird ein solches Tag-Ligand Separationssystem in einer Festphasen-Separation eingesetzt, so ist das funktionalisierte Sorbent der Ligand, und die Markierung der RNA ist die Tag-Struktur bzw. das Sorbat.

Ein spezifischer Einbau in die RNA kann durch die Verwendung von Uridin-Triphosphat (UTP) Derivaten erreicht werden. Das Nukleotid UTP kommt ausschließlich in RNA Molekülen eines jeden Organismus vor. Als Tag Molekül wurde Digoxigenin, ein Hapten, das von der Fingerhutpflanze *Digitalis sp.* synthetisiert wird, ausgewählt, da es für die *in vitro* Markierung von DNA Sonden gut etabliert ist. Außerdem wird es von Bakterien nicht synthetisiert und ist als Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat (DIG-11-UTP) kommerziell erhältlich (Schmitz, 1991). In Abbildung 10 ist die Strukturformel dieses Nukleotidanalogs dargestellt. Soll dieses Hapten als Tag in einer Detektions- oder Separationsreaktion gebunden werden, so sind hierfür verschiedene, spezifische Antikörper-Konjugate als Ligand kommerziell erhältlich. Als Sorbent wurden im Rahmen dieser Arbeit streptavidinfunktionalisierte Magnetpartikel (M-PVA SAV2) von der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG verwendet. Ein starker Bindungspartner für das Protein Streptavidin ist das Vitamin B7, Biotin. Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist, mit einer Bindungskonstante von  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ , die stärkste bekannte biologische Wechselwirkung (Wilchek 1990).

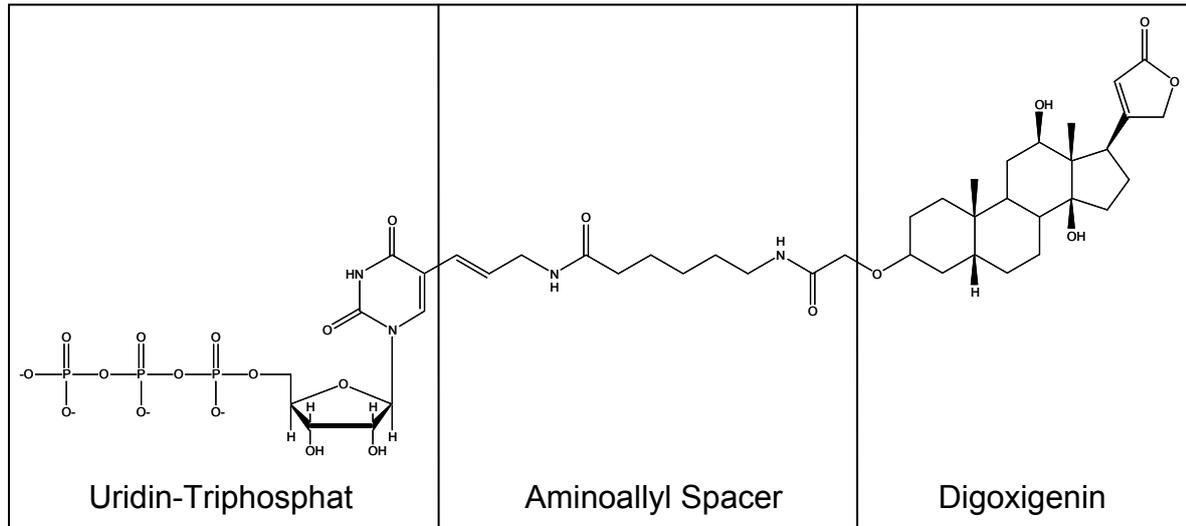


Abbildung 10: Strukturformel des Nucleotidanalogs DIG-11-UTP (Digoxigenin-3-O-Methylcarbonyl-ε-Aminocaproyl-[5-(3-aminoallyl)-Uridin-5'-Triphosphat])

Dementsprechend wurde DIG-11-UTP (kurz DIG), zur *in vivo* Markierung der bakteriellen RNA verwendet. Die Digoxigenin markierte RNA sollte, wie in Abbildung 11 dargestellt, über einen biotinylierten Anti-DIG Antikörper an streptavidin-funktionalisierte Magnetpartikel gebunden werden.

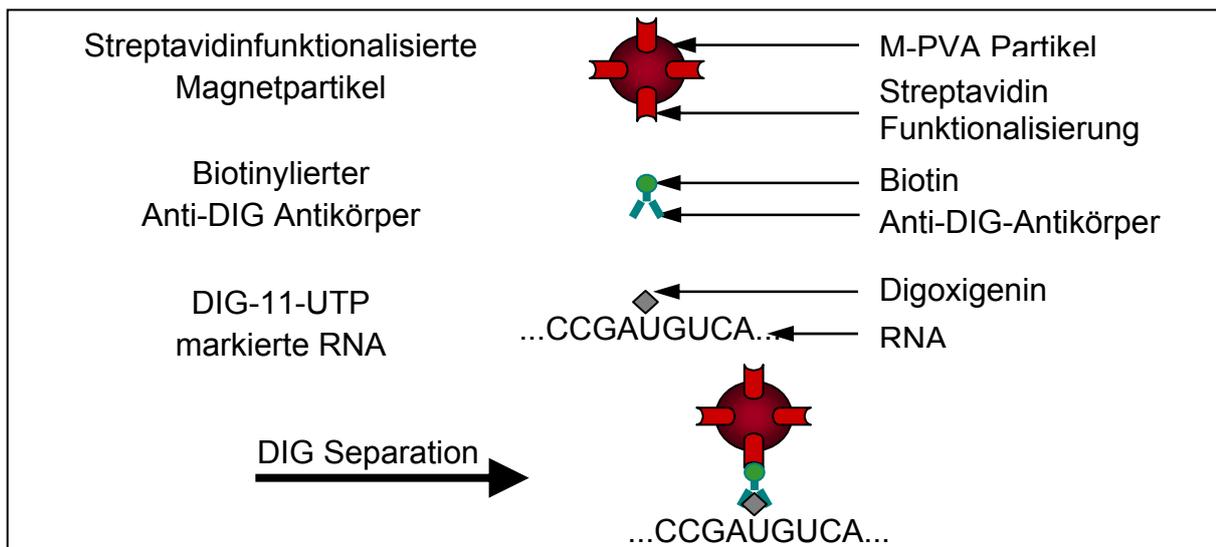


Abbildung 11: Darstellung der Bindung von DIG markierter RNA und streptavidin-funktionalisierten Magnetpartikeln mittels biotinyliertem Anti-DIG Antikörper.

### **3.2. *In vivo* Markierung bakterieller RNA**

Der wissenschaftlich neue Schritt zur Umsetzung des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens ist der *in vivo* Einbau eines nicht radioaktiven Nukleotidanalogs in bakterielle RNA. Hierbei soll die neu synthetisierte RNA physiologisch aktiver Bakterien durch Zugabe und Aufnahme des RNA spezifischen Nukleotidanalogs DIG-11-UTP während der Transkription markiert werden.

#### **3.2.1. Methodenentwicklung und Markierungsprotokoll**

Zur Entwicklung einer Markierungsmethode wurden Reinkulturen von Umweltisolaten des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* #154 und des Gram-positiven *Enterococcus faecium* B7641 mit unterschiedlichen Zellzahlen verwendet. Da in der zu entwickelnden Methode das Nukleotidanalogon DIG-11-UTP von Bakterienzellen aufgenommen werden muss, orientierte sich die Entwicklung des verwendeten Protokolls zunächst an für Bakterien gut etablierten Transformationsprotokollen. Diese beinhalten zumeist Bedingungen, wie Hitze, Kälte oder Detergenz-Behandlung, die zwar die Aufnahme rate an Fremd-DNA erhöhen, aber auch die Genexpression der Bakterien verändern (Song *et al.* 2007). Bei einer Methode, die vorwiegend zur Analyse der bakteriellen Genexpression verwendet werden sollte, waren solche Einflüsse unerwünscht. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll erarbeitet, dass unter möglichst physiologischen Bedingungen und mit möglichst wenigen Inkubationsschritten durchgeführt werden konnte und eine Markierung der RNA gewährleistete. Vergleichende Analysen wurden zwischen dem entwickelten Protokoll und Markierungsexperimenten mit Transformationsmethoden durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach der Zugabe des Nukleotidanalogs in einem Ultraschallbad inkubiert. Diese Behandlung führte jedoch zu keiner signifikanten Steigerung der Einbaurates von DIG-11-UTP in die RNA (ohne Abbildung).

Für alle nachfolgenden Experimente mit Referenzbakterien wurde das folgende Markierungsprotokoll verwendet:

- Flüssigkulturen auf eine  $OD_{600}$  von ca. 0,02 animpfen und bis in die mittlere exponentielle Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ ) wachsen lassen,
- 1 ml Aliquots aus Flüssigkultur entnehmen und Zellen bei 4,7 g, 5 Minuten durch Zentrifugation pelletieren,
- Zellpellets in 1 ml sterilem Wasser waschen und bei 4,7 g, 5 Minuten durch Zentrifugation pelletieren,
- Zellpellets in 100  $\mu$ l sterilem Wasser resuspendieren,
- Der Zellsuspension 2 nmol DIG-11-UTP zu einer Endkonzentration 2  $\mu$ M zusetzen,
- 60 Minuten bei RT inkubieren,
- Zellen bei 16,0 g, 3 Minuten durch Zentrifugation pelletieren,
- Zellpellets bzw. Aufwuchsmaterial zweimal mit je 250  $\mu$ l RNA-Protect waschen, durch Zentrifugation pelletieren und
- Zellpellets bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagern.

Der in diesem Protokoll aufgeführte Waschschrift in RNA-Protect (QIAGEN, Hilden, D) dient der Stabilisierung der bakteriellen Gesamt-RNA. Dabei stoppt dieses Reagenz sowohl die RNA Synthese, als auch den RNA Abbau. Laut Herstellerangaben enthält dieses Reagenz Tetradecyl-Trimethyl-Ammonium Bromid als reaktive Komponente.

Die Biofilmproben wurden demselben Markierungsprotokoll wie die Reinkulturen der Referenzbakterien unterzogen. Als Umweltproben wurden natürliche Biofilme auf rostfreien Edelstahl-Coupons ( $1,25 \text{ cm}^2$ ) in Trinkwasser vier Monate angezogen, von Kieselsteinen aus Flusswasser oder aus Baggersee-Sediment entnommen. Als Inkubationsmedium wurde bei den Biofilmproben kein steriles Wasser, sondern Wasser aus dem jeweiligen Habitat für die Markierungs- und Waschschrift verwendet. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Bakterien auch während der Markierung im Wasser ihres jeweiligen Habitats, also *in situ*, vorlagen. Ferner wurde die *in vivo* Markierungsreaktion in 300  $\mu$ l mit einer DIG-11-UTP Endkonzentration von 0,7  $\mu$ M über Nacht (17 h) durchgeführt, ohne die Biofilmbakterien von ihrer Aufwuchsoberfläche zu entfernen.

### 3.2.2. Anwendung und Bewertung des Markierungsprotokolls für unterschiedliche Habitate

Zur Analyse des Einbaus von DIG-11-UTP in die bakterielle RNA wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die Konzentration der RNA wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum aufweisen, bestimmt (Kapitel 2.4). Die Ausbeuten variierten in Abhängigkeit von Probenmaterial und optischer Dichte der eingesetzten Kulturen. Aus einer 1 ml Kultur ( $OD_{600} = 0,6$ ) des Gram-negativen Bakteriums *P. aeruginosa* wurden durchschnittlich 25 µg Gesamt-RNA isoliert. Aus dem Gram-positiven Bakterium *E. faecium* hingegen erhielt man bei gleicher optischer Dichte durchschnittlich 10 µg Gesamt-RNA. Diese im Vergleich zweieinhalbfach geringere Menge ist mit der unterschiedlichen Dicke der Mureinschicht und dem Aufbau der Zellmembran Gram positiver und -negativer Bakterien zu erklären. Diese erschwerten den Zellaufschluss von *E. faecium* und verminderten die Ausbeuten an RNA. Die Reinheit der isolierten RNA, angegeben als Quotienten der Absorptionen  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  ( $A_{260}/A_{280}$ ), war für alle Reinkulturproben mit einem Wert von 1,9 bis 2,1 sehr hoch. Eine Zusammenfassung der durchschnittlichen Mengen und Reinheiten der isolierten Gesamt-RNA ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Menge und Reinheitsgrad der nach der Markierung isolierten Gesamt-RNA als Durchschnittswerte der durchgeführten Experimente.

Probe	Versuchsanzahl	gesRNA [µg]	Reinheitsgrad [ $A_{260}/A_{280}$ ]
<i>P. aeruginosa</i> #154	50	25 ± 5	2,1
<i>E. faecium</i> B7641	50	10 ± 2	1,9
Biofilm Flusswasser	10	0,14 ± 0,02	1,4
Biofilm Trinkwasser	8	0,08 ± 0,04	1,5
Biofilm Seesediment	4	0,10 ± 0,03	1,4

Im Gegensatz zu den Reinkulturen wurden aus den Biofilmproben der unterschiedlichen Habitate nur sehr geringe Gesamt-RNA Mengen isoliert, die zudem

Verunreinigungen aufwiesen. Die Trinkwasserbiofilme wuchsen auf 1,75 cm<sup>2</sup> großen rostfreien Edelstahl-Coupons und es konnten durchschnittlich 0,08 µg Gesamt-RNA pro Coupon isoliert werden. Die Flusswasserbiofilme wurden auf Kieselsteinen mit 0,5 cm Durchmesser markiert und lieferten 0,14 µg Gesamt-RNA. Aus dem dritten untersuchten Habitat von 0,3 bis 0,4 cm<sup>3</sup> Seesediment wurden 0,10 µg Gesamt-RNA isoliert. Für alle isolierten Gesamt-RNA Proben aus Biofilmen wurden durchschnittliche  $A_{260}/A_{280}$  Quotienten von ca. 1,4 detektiert. Dieser Wert beschreibt, verglichen mit den Referenzbakterien, eine geringere Reinheit der extrahierten RNA. Die Zellzahl dieser drei verschiedenen Umweltproben wurde nur stichprobenartig mikroskopisch, mittels DAPI-Färbung, bestimmt. Dabei wurden zwischen 10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Bakterien pro Träger gezählt. Die geringen Mengen und die Qualität der isolierten RNA, die aus den natürlichen Biofilmen gewonnen wurden, sind auf die geringe Zahl der Bakterien in diesen oligotrophen Habitaten zurückzuführen.

Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die Gesamt-RNA *in vivo* markierter Bakterien immer ein Gemisch aus DIG markierten und unmarkierten RNA Molekülen ist, da nur die neu transkribierte RNA aktiver Gene markiert wird. Dabei werden rRNA Moleküle, wegen ihrer hohen intrazellulären Stabilität, den Großteil dieser nicht markierten RNA ausmachen.

Im Anschluss an die RNA Isolierung wurde der Einbau des Markierungsmoleküls in die *in vivo* synthetisierte RNA untersucht. Nach dem Transfer definierter RNA-Mengen und deren Bindung an eine Nylonmembran wurde RNA gebundenes Digoxigenin im so genannten Dot-Blot-Verfahren detektiert (siehe Kapitel 2.5). Hierzu wurde ein spezifisches, DIG gerichtetes Antikörperkonjugat mit einer alkalischen Phosphatase verwendet. Die eigentliche Detektion erfolgt über eine enzymkatalysierte Reaktion. Dabei setzt die Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase ein Substrat zu einem chemisch instabilen Zwischenprodukt um, das unter der Emission von Licht weiter reagiert. Die Intensität des entstehenden Chemilumineszenzsignals ist proportional zur Enzymaktivität und damit zur Menge an gebundenem Antikörper. Die Chemilumineszenz wird über eine CCD-Kamera detektiert und Software basiert ausgewertet (siehe Kapitel 2.5).

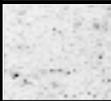
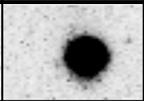
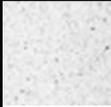
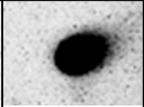
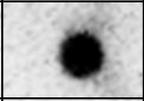
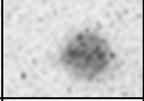
	K	<i>in vivo</i> markiert	gesRNA [µg]
<i>E. faecium</i>			0,4
<i>P. aeruginosa</i>			2,0
Biofilm aus Flusswasser			0,1
Biofilm aus Tinkwasser			0,1
Biofilm aus Seesediment			0,2

Abbildung 12: Detektion Digoxigenin markierter RNA in Gesamt-RNA Extrakten von den Referenz-Bakterien und den Biofilmproben. Die Mengen der aufgetragenen Gesamt-RNA Mengen sind angegeben, unmarkierte Gesamt-RNA wurde als Kontrolle [K] aufgetragen.

Abbildung 12 zeigt den spezifischen Nachweis von DIG markierter RNA in Gesamt-RNA Extrakten von allen untersuchten Bakterienspezies und Biofilmpopulationen. Als Negativkontrolle wurde RNA aus jeweils nicht markierten Bakterien isoliert, die die gleiche Konzentration und Reinheit wie ihre markierte Parallelprobe aufwies. Die Anteile an markierter RNA im Gesamt-RNA Extrakt konnten als Chemilumineszenz Signal sichtbar gemacht werden. Dagegen zeigte die aus den nicht markierten Kontroll-Ansätzen isolierte Gesamt-RNA wie erwartet keine Chemilumineszenz Signale. Dies zeigt die hohe Spezifität dieses Nachweisverfahrens zur Detektion *in vivo* DIG markierter RNA, bei einer sehr geringen Hintergrundchemilumineszenz. Eine Menge von 2 µg Gesamt-RNA, die aus 1 ml markierte *P. aeruginosa* Kultur isoliert wurden, resultierte in einem Lumineszenz Signal von  $34 \times 10^5$  LU (Light Units, aus Software vermittelter Quantifizierung) und 0,4 µg Gesamt-RNA aus *E. faecium* in  $13 \times 10^5$  LU (Abbildung 12). Auch für die Gesamt-RNA, die aus den Biofilmproben isoliert wurde, konnte eine DIG Markierung detektiert werden, doch diese Ergebnisse wiesen Unterschiede zu den analysierten Reinkulturen auf. So lieferten 0,1 µg Gesamt-RNA, die aus

Flusswasser oder Trinkwasserbiofilmen isoliert wurden, Signale von  $7,1 \times 10^5$  LU respektive  $2,8 \times 10^5$  LU.  $0,2 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus Seesediment lieferten  $0,7 \times 10^5$  LU. Vergleicht man die Ergebnisse für die Gesamt-RNA des Flusswasser-Biofilms mit denen von *P. aeruginosa*, so werden die Unterschiede zwischen den Reinkulturen und den Biofilmproben besonders deutlich. Von der Biofilm Gesamt-RNA wurde mit  $0,1 \mu\text{g}$  nur 1/20 der Menge der *P. aeruginosa* Gesamt-RNA auf die Nylonmembran aufgetragen. Diese 20-fach geringere Menge lieferte ein nur 5-mal geringeres Chemilumineszenz-Signal als die markierte *P. aeruginosa* Gesamt-RNA. Diese Ergebnisse lassen auf einen von der Inkubationsdauer abhängigen unterschiedlich starken Einbau von DIG-11-UTP in die RNA der untersuchten Populationen schließen. Die Schlussfolgerung einer unterschiedlich starken Aufnahme und Einbauraten wird durch einen Vergleich der Lumineszenz-Signale der Biofilmproben unterstützt. Hier führten vergleichbare Mengen an RNA und eine identische Dauer der *in vivo* Markierung zu stark unterschiedlichen Ergebnissen. Die Proben aus den wässrigen Habitaten lieferten viel stärkere Signale als die Probe aus dem Sediment-Habitat, was für eine verstärkte Aufnahme und Einbau der modifizierten Nukleotide im wässrigen Milieu spricht.

Die Ergebnisse aus Abbildung 12 haben gezeigt, dass die *in vivo* Markierung vom jeweiligen Habitat und damit vom physiologischen Status der Bakterien abhängig war. Um diese Abhängigkeit näher zu untersuchen, wurden Bakterien in unterschiedlichen Wachstumsphasen in einer Flüssigkultur einer *in vivo* Markierung unterzogen. Die betrachteten Phasen des Bakterienwachstums waren die Lag-Phase ( $\text{OD}_{600} < 0,1$ ), die exponentielle Phase ( $0,1 < \text{OD}_{600} < 1,5$ ) und die stationäre Phase ( $\text{OD}_{600} > 1,5$ ). Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde der Kultur ein Aliquot entnommen und markiert, ohne es weiter im Flüssigmedium zu kultivieren. Damit konnte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Bakterien in der jeweiligen Wachstumsphase DIG-11-UTP in ihre RNA einbauten. Zur Analyse wurden identische Mengen RNA nach einer Gesamt-RNA Isolierung auf eine Membran aufgetragen und im Dot-Blot-Verfahren untersucht. Die Ergebnisse der Quantifizierung der DIG-markierten RNA sind in Abbildung 13 dargestellt.

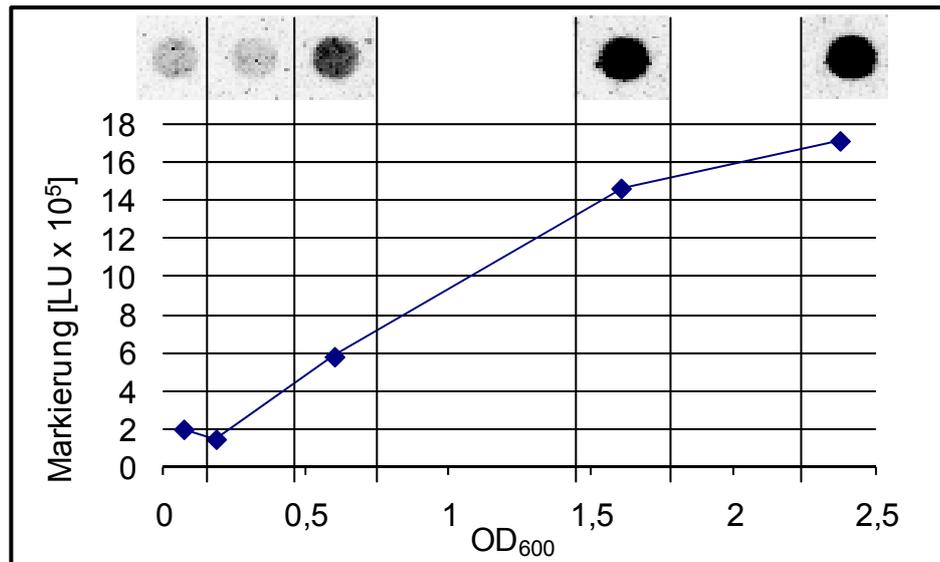


Abbildung 13: Dot-Blot DIG-11-UTP markierter RNA aus *P. aeruginosa*. Markierung der Bakterien in verschiedenen Wachstumsphasen, je 1 µg Gesamt-RNA wurde aufgetragen. Diagramm der Chemilumineszenzsignale als Maß der Markierungsausbeute über der Wachstumsphase als OD<sub>600</sub>.

Die Ergebnisse zeigten einen verstärkten Einbau mit steigender Zelldichte in der Kultur. Daraus ergibt sich, dass der Einbau von DIG-11-UTP in die bakterielle RNA von der Wachstumsphase der Bakterien abhängig ist, wobei der Einbau in der stationären Phase des Kulturwachstums am höchsten war.

Darüberhinaus haben die bisher vorgestellten Daten gezeigt, dass eine *in vivo* Markierung bakterieller RNA durch den Einbau des Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat für Bakterien möglich ist. Es wurden sowohl Gram-positive und Gram-negative Referenzbakterien, als auch Biofilme unbekannter Zusammensetzung markiert. Eine solche Markierung lebender Bakterien wurde bisher nur für radioaktive Isotope beschrieben und genutzt. Dabei wird RNA durch die Zufütterung eines radioaktiv markierten Substrats, wie z.B. [<sup>3</sup>H]-Uridin, markiert (Baracchini und Bremer, 1987). Durch eine solche radioaktive Markierung kann beispielsweise die RNA Synthese verfolgt werden. Sie kann aber, bei heutigem Stand des Wissens, nicht als Zielstruktur für eine spezifische Separation herangezogen werden. Die Möglichkeit zu einer markierungsspezifischen Separation der RNA war jedoch das Ziel dieser Doktorarbeit und konnte durch den Einsatz einer Markierung mit DIG-11-UTP gewährleistet werden. Solch nicht radioaktive

Nukleotidanaloga wurden bisher nur *in vitro*, zur Markierung von Oligonukleotiden mittels terminaler Transferase oder in einer PCR genutzt (Schmitz *et al.* 1991).

### 3.2.3. Spezifität der Markierung

Die Spezifität des Einbaus von DIG-11-UTP in die RNA wurde mittels RNase und DNase Behandlung vorher markierter Gesamt-RNA untersucht (Kapitel 2.6). RNasen sind Nuklease Enzyme, die RNA spezifisch abbauen, während DNasen spezifisch DNA abbauen (Hurt *et al.* 2001). Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die DIG markierte Gesamt-RNA der Referenzbakterien, wie erwartet, durch RNase spezifisch abgebaut wurde. Dies resultierte in einem Verlust des Markierungssignals. Die Inkubation mit DNase dagegen, zeigte keinen Einfluss auf die RNA-spezifische Signalgebung. Als Kontrolle wurde ein *in vitro* synthetisiertes und DIG markiertes 100 bp großes DNA-Fragment des *regA* Gens eingesetzt, das die Synthese von ToxinA in *P. aeruginosa* reguliert (siehe Kapitel 2.11.1). Dieses DNA Kontrollfragment lieferte mit einem Abbau durch DNase, aber nicht durch RNase ein gegenteiliges Ergebnis. Durch dieses Kontroll-Experiment wurde die Spezifität dieses Ansatzes für RNA gezeigt. Vor der Analyse der Versuchsansätze auf einer Nylonmembran wurden sie nach der Enzyminaktivierung, mittels eines DyeEx Kits von einzelnen Nukleotiden, den Abbauprodukten der Nuklease, gereinigt. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass DIG-11-UTP während einer Stunde Inkubationszeit exklusiv in die RNA der Referenzbakterien eingebaut wurde. Die unbehandelten Proben wurden ebenfalls mit dem DyeEx Protokoll aufgereinigt und auch in diesen blieb das Chemilumineszenz-Signal erhalten. Dies zeigt, dass vermehrt intakte, langkettige RNA Moleküle markiert und isoliert wurden, da Einzelnukleotide in der Aufreinigung, vor dem Transfer auf die Membran, entfernt wurden.

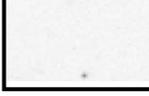
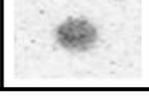
<i>P. aerug.</i> RNA	Flussw. RNA <sub>biofilm</sub>		Kontr. DNA
		unverdaut	
		DNase	
		RNase	

Abbildung 14: RNase and DNase Verdau von isolierter Gesamt-RNA nach der *in vivo* Markierung von *P. aeruginosa* [*P. aerug.*] und eines Flusswasser Biofilms [Flussw.]. 2 µg bzw. 0,1 µg *in vivo* DIG markierte Gesamt-RNA und 0.025 µg *in vitro* markierte Kontroll-DNA (*regA*) [Kontr.] wurden mit DNase I (0.068 units/ml) oder RNase A (20 µg/ml) verdaut.

Derselbe Versuch wurde mit Gesamt-RNA, die aus *in vivo* markierten Biofilmen isoliert wurde, durchgeführt. Er zeigte ein anderes Ergebnis als die Gesamt-RNA der Reinkulturen (Abbildung 14). Im dargestellten Experiment wurde ein Flusswasser Biofilm verwendet, wobei auch dieser Ansatz vor der Auftragung auf die Membran mit einem DyeEx Kit aufgereinigt, d.h. von Einzelnukleotiden befreit wurde. Das starke Signal für die unbehandelte Probe zeigte, dass DIG-11-UTP wiederum in intakte langkettige Nukleotide eingebaut wurde. Beide Nuklease behandelten Proben weisen jedoch einen partiellen Verdau der eingesetzten Gesamt-RNA auf. Quantifiziert man die Chemilumineszenz-Signale der verdauten und der unbehandelten Probe und vergleicht diese, kann der Einbau von DIG-11-UTP in die isolierte Gesamt-RNA näher bestimmt werden. Dabei zeigt sich, dass gemessen am Lumineszenz Signal 60% der eingesetzten markierten RNA durch die RNase abgebaut wurden. Dies weist darauf hin, dass 40% des für die isolierte, markierte Gesamt-RNA detektierten Chemilumineszenz Signals nicht RNA gebunden vorlag. Diese Verunreinigungen können durch einen unvollständigen DNase Verdau während der RNA Isolierung mittels des RNeasy Kits entstanden sein. Die in diesem Versuch durchgeführte DNase Behandlung baute 52% des Chemilumineszenz-Signals ab, was eine DNA Verunreinigung des RNA Gesamtextrakts mit DNA belegt. Eine Quelle dieser DNA Verunreinigung könnte ein möglicher Einbau von DIG-11-UTP in die bakterielle DNA *in vivo* sein. Denn die-

se Signale wurden nur für Biofilmprouben beobachtet, die 17 Stunden mit DIG-11-UTP zur Markierung inkubiert wurden. Ein Einbau von Uridin-Triphosphat in die DNA ist aber wegen der Spezifität der DNA Polymerase nicht möglich. Die einzige Erklärung für die beobachtete DNA-Markierung könnte das Vorhandensein einer für Bakterien beschriebenen intrazellulären Ribonukleotid Reduktase sein (Gon *et al.* 2006). Dieses Enzym könnte das eingesetzte Ribonukleotid Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat in das Desoxyribonukleotid Digoxigenin-11-Thymin-5'-Triphosphat umgewandelt und damit den Einbau in die DNA ermöglicht haben. Da ein solcher Mechanismus *in vivo* bis jetzt jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben wurde, bedürfte es weiterer eingehender Forschungsarbeit, um eine solche interne Umsetzung eines Ribonukleotids eindeutig nachzuweisen zu können.

Für zukünftige Biofilmuntersuchungen ist es daher notwendig, die Inkubationszeit mit DIG-11-UTP hinsichtlich ausreichender RNA-Markierung bei verminderter DNA-Markierung zu optimieren.

### **3.3. Verfahren zur Separation Digoxigenin markierter RNA**

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode war eine Markierung der *de novo* synthetisierten RNA von Bakterien in Reinkulturen und natürlichen Biofilmen möglich. Um jedoch Informationen über die *de novo* expremierten Gene in den untersuchten Bakterienpopulationen zu erhalten, war die Entwicklung einer Separation der DIG markierten RNA aus der gesamten isolierten RNA notwendig.

#### **3.3.1. Magnetpartikel vermitteltes Separationsverfahren**

Zur Separation der DIG-11-UTP markierten RNA aus einem Gesamt-RNA Extrakt wurde ein Magnetpartikel basiertes Verfahren mit dem Ziel entwickelt, die DIG-RNA mit hohen Ausbeuten und hochspezifisch aufzureinigen. Das Grundschemata dieser Separation wurde bereits in Kapitel 3.1 erläutert, da die spätere Separation schon bei der Auswahl eines geeigneten Markierungsmoleküls zu beachten war. Für die Separation wurden streptavidinfunktionalisierte Magnetit-Polyvinylalkohol-Partikel (M-PVA SAV2) der Firma chemagen Biopolymer Tech-

nologie AG, ein biotinylierter Anti-Digoxigenin Antikörper und Digoxigenin markierte RNA eingesetzt. Dabei sollte die Bindung der markierten RNA an die Magnetpartikel durch den Antikörper vermittelt werden.

Für die Protokollentwicklung waren verschiedene Rahmenbedingungen festzulegen: Die eingesetzten Puffersysteme, die Reihenfolge der Wasch-, Äquilibrierungs-, Binde- und Elutionsschritte. Als Puffersysteme wurden RNase freies Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) und 0,5x SSC Puffer, pH 7,0 ausgewählt. Aus *in situ* Hybridisierungs-Experimenten ist bekannt, dass SSC-Puffer die Stringenz der Bindung eines Detektions-Antikörpers erhöht (Larsson *et al.* 1990). Um in der zu entwickelnden Methode eine möglichst spezifische Separation der DIG markierten RNA zu erreichen, wurde 0,5x SSC Puffer als Binde- und Waschpuffer eingesetzt. Ferner ist aus etablierten RNA Isolierungsverfahren bekannt, dass sich Nukleinsäuren gut in Wasser lösen. So wird Wasser häufig als Elutionsmittel verwendet, um RNA von einer Chromatographie-Säule abzulösen.

Der Separation ging in allen Fällen ein Waschen der Magnetpartikel in DEPC-H<sub>2</sub>O voraus, um die Partikel von Natriumazid, BSA und anderen Bestandteilen des Lager-Puffers zu befreien. Diese Bestandteile dienen der Stabilisierung und Haltbarmachung der Magnetpartikel während ihrer Lagerung. Hiernach wurden die Partikel mit dem Binde- und Waschpuffer (0,5x SSC-Puffer) äquilibriert, um eine effiziente Bindung des Antikörpers zu gewährleisten.

#### Kontrolle der Bindungsspezifität von RNA an die Magnetpartikel

In den im Folgenden vorgestellten Versuchsreihen wurde der Aufbau der Bindung von Partikel, Anti-DIG Antikörper und DIG markierter RNA untersucht. Hierdurch sollte gezeigt werden, dass die Bindung, in geordneter Weise, wie in Abbildung 11 dargestellt, zustande kommt. Hierzu wurde zuerst eine Separation ohne biotinylierten Antikörper, nur mit den streptavidinfunktionalisierten Partikeln durchgeführt. Danach wurde die Separation mit einem Anti-DIG Antikörper ohne Biotinylierung vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 15 dargestellt.

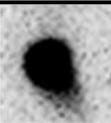
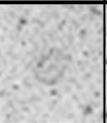
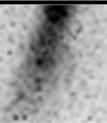
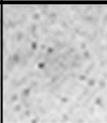
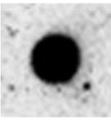
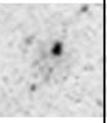
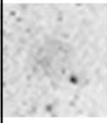
	S	W1	W2	E
<b>A</b> M-PVA SAV2 ohne Anti-DIG-AK				
<b>B</b> M-PVA SAV2 + n-b Anti-DIG AK				

Abbildung 15: Analyse der Bindungsspezifität zwischen M-PVA SAV2 Magnetpartikeln und DIG-RNA. Separation ohne Antikörper und mit biotinfreiem Anti-DIG Antikörper. Es wurden 2 µg *in vivo* markierte Gesamt-RNA und 0,25 mg Partikel eingesetzt [Anti-DIG AK: Anti-DIG Antikörper; n-b: nicht biotinyliert; S: Sorptionsüberstand; W1: Waschfraktion 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschfraktion 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elutionsfraktion in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].

In Separation A in Abbildung 15 wurde kein Antikörper eingesetzt. Unter diesen Bedingungen fand keine unspezifische Bindung DIG markierter RNA an die M-PVA SAV2 Magnetpartikel statt, da die gesamte DIG-RNA im Sorptionsüberstand verblieb. Wurden jedoch 0,4 µg nicht-biotinylierter (n-b) Anti-DIG Antikörper in der Separation (B) eingesetzt, kam es zu einer unspezifischen Bindung von RNA und Antikörper an die Magnetpartikel. Die unspezifisch gebundene DIG-RNA wurde jedoch wie erwartet im zweiten Waschschrift in DEPC-H<sub>2</sub>O ohne Temperaturerhöhung vollständig von den Partikeln entfernt. Unspezifische koordinative Wechselwirkungen von RNA und Partikel wurden somit durch den Antikörper vermittelt, lösten sich aber im Wasser-Waschschrift wieder auf. Dieses Ergebnis zeigte, dass der Waschschrift in Wasser sehr wichtig für die Spezifität der Separation ist. Da also eine unspezifische Bindung der markierten RNA an die Partikel durch den Waschschrift in Wasser unterbunden wurde, konnte das entwickelte Protokoll für die Separation von DIG-RNA eingesetzt werden. Hierzu wurden streptavidinfunktionalisierte Magnetpartikel und ein biotinylierter Anti-DIG Antikörper eingesetzt.

### Einfluss der Bindungs-Abfolge auf die Separation DIG markierter RNA

Bei der weiteren Abfolge der Separation konnten prinzipiell zwei verschiedene Abläufe gewählt werden: (A) Vorherige Bindung des Antikörpers an die M-PVA SAV2 Magnetpartikel und anschließende Bindung der RNA oder (B) vorgeschaltete Bindung des Antikörpers an die RNA und darauffolgende Kopplung an die Magnetpartikel. Im Elutionsschritt der Separation sollte dann die DIG markierte RNA wieder vom Magnetpartikel gelöst werden. Hierzu wurde DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt. Eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C sollte die Elution unterstützen, da bei einer solch hohen Temperatur Antikörper denaturieren. Außerdem ist bekannt, dass die Bindung von Streptavidin und Biotin bei erhöhter Temperatur reversibel gelöst werden kann (Holmberg *et al.* 2005). In den folgenden Untersuchungen wurde die Effizienz der Separation der DIG markierten RNA untersucht. Durch den spezifischen Nachweis der DIG-RNA im Dot-Blot Verfahren (Kapitel 2.5) konnte ihr Anteil in den einzelnen Fraktionen nachverfolgt und somit die Ausbeuten der Separation ermittelt werden.

	gesRNA	S	W1	W2	E
<b>A:</b> 1. AK + RNA (15min) 2. + Part. (10min)					
<b>B:</b> 1. AK + Part. (10min) 2. + RNA (15min)					

Abbildung 16: Separation DIG markierter RNA in unterschiedlicher Bindungsabfolge. A: 1. Bindung des Antikörpers an DIG-RNA, 2. an Magnetpartikel. B: 1. Bindung des Antikörpers an Magnetpartikel, 2. an DIG-RNA. Es wurden 2 µg *in vivo* markierte Gesamt-RNA, 0,25 mg Partikel und 0,4 µg Antikörper eingesetzt [AK: Anti-DIG Antikörper; gesRNA: Gesamt-RNA, S: Sorptionsüberstand nach der Bindung in 0,5x SSC-Puffer; W1: Waschfraktion 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschfraktion 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].

Der in Abbildung 16 gezeigte Dot-Blot resultiert aus zwei Separationsexperimenten, wobei Magnetpartikel, Anti-DIG Antikörper und DIG-RNA in unterschiedlicher Reihenfolge aneinander gekoppelt wurden. In Teil A wurde der Antikörper zuerst an die RNA gebunden und hierfür 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. An-

schließlich wurde dieser Antikörper-RNA-Komplex für 10 Minuten bei Raumtemperatur an die Magnetpartikel gekoppelt. Im zweiten Separationsexperiment (Teil B) wurde der Antikörper zuerst 10 Minuten bei Raumtemperatur an die Magnetpartikel gebunden. Darauf banden diese mit Antikörper sekundärfunktionalisierten Partikel während einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur die markierte RNA. Nach der Sorption und zwei Waschschrritten wurde die DIG-RNA bei 95°C eluiert und anschließend alle Fraktionen im Dot-Blot Verfahren analysiert.

Ein Vergleich der Signale von Gesamt-RNA und der in der Elution separierten DIG markierten RNA (siehe Abbildung 16) zeigt deutlich, dass die markierte RNA in Sorptionsüberstand (S), Waschfraktionen (W1, W2) und Elution (E) wiedergefunden wurde. Damit verblieb also keine RNA irreversibel am Partikel gebunden. Die Quantifizierung der gemessenen Chemilumineszenz in LU ist in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale von Separation B aus Abbildung 16 in LU und Berechnung der Ausbeute der Separation.

Separationsfraktion	gesRNA	S	W1	W2	E
Chemilumineszenz [LU]	92124	8441	764	3289	330311
Ausbeute [% bez. gesRNA]	100	9	1	4	359
Ausbeute [% bez. S+W1+W2+E]		2	0	1	96

Diese Ergebnisse zeigen sogar, dass das Signal der Gesamt-RNA deutlich geringer war als die Summe der Signale in S, W1, W2 und E. Dies kann damit begründet werden, dass in der Gesamt-RNA ein großer Anteil an unmarkierten Nucleinsäuren enthalten ist. Diese nicht markierten Moleküle hemmen wahrscheinlich die Bindung des Detektionsantikörpers sterisch, so dass nicht alle DIG-RNA Moleküle erfasst werden. Die Erhöhung des Chemilumineszenzsignals in der Elutionsfraktion liegt also in der Aufreinigung der markierten RNA begründet. Die Ausbeuten der Separationen wurden dementsprechend aus den Signa-

len der Fraktionen S, W1, W2 und E berechnet und auf die Summe dieser Chemilumineszenzsignale normiert. Auf diese Weise konnte die Ausbeute jeder Separation ohne eine Analyse der Gesamt-RNA bestimmt werden. Da keine DIG markierte RNA am Partikel verblieb, war eine solche Betrachtung gerechtfertigt. Ferner konnte so die gesamte RNA in der Separation eingesetzt werden, ohne eine Gesamt-RNA Probe für die Analyse im Dot-Blot-Verfahren vorhalten zu müssen.

Wurde zuerst die DIG-RNA durch freien Antikörper gebunden (Teil A) ergab sich eine Ausbeute von 76% an DIG markierter RNA in der Elutionsfraktion (E). Die hauptsächlichsten Verluste an DIG-RNA konnten dabei mit 18% im Sorptionsüberstand (S) nachgewiesen werden. Wurden hingegen direkt mit Antikörper sekundärfunktionalisierte Magnetpartikel eingesetzt (Teil B), lag die Ausbeute an DIG-RNA in der Elution bei ca. 90% (siehe Abbildung 16).

Eine mögliche Erklärung für die geringeren Ausbeuten von Separation A könnte die Größe des Antikörper-RNA Komplexes sein, die eine Bindung an die Magnetpartikel sterisch behinderte. Zum anderen war die Gesamtinkubationszeit der RNA bei Raumtemperatur während der Vorabbindung des Antikörpers an die DIG-RNA mit insgesamt 25 Minuten, um 10 Minuten länger als beim alternativen Ansatz. Dabei könnte die RNA wegen ihrer geringen Halbwertszeit degradiert worden sein. Aufgrund der um 20% höheren Ausbeute wurde im weiteren nur mit direkt Antikörper sekundärfunktionalisierten Magnetpartikeln gearbeitet.

#### Einfluss der Elutions-Temperatur und der Antikörper-Konzentration auf die Separation DIG markierter RNA

In einem folgenden Experiment wurde analysiert, ab welcher Temperatur die DIG markierte RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O von den M-PVA SAV2 Partikeln eluiert werden konnte. Hierzu wurde die gebundene DIG-RNA mit steigenden Temperaturen eluiert und anschließend im Dot-Blot-Verfahren analysiert. Durch die Analyse der Chemilumineszenzsignale der verschiedenen Elutionsfraktionen konnte gezeigt werden, dass sich bei Raumtemperatur kaum detektierbare Mengen der gebundenen DIG-RNA lösten. Erst bei einer Temperatur von 40°C wurden ca. 4% der gebundenen RNA abgelöst. 18% bei 60°C, 45% bei 75°C und die restlichen 33% wurden bei 95°C von den Partikeln eluiert (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse

zeigten, dass eine Verwendung von DEPC-H<sub>2</sub>O bei erhöhter Temperatur zur Elution der gebundenen DIG-RNA gut geeignet ist.

Der Einsatz von DEPC-H<sub>2</sub>O als Waschlösung nach der Sorption ist sinnvoll, da Verunreinigung durch unspezifisch gebundene Nukleinsäuremoleküle, bei diesem Waschschrift vom Partikel abgelöst werden (siehe Abbildung 15). Der Grund dafür ist in der guten Wasserlöslichkeit von Nukleinsäuremolekülen zu sehen. Somit verbleiben bei der Inkubation der Partikel bei Raumtemperatur nur über den Anti-DIG Antikörper stark gebundene Digoxigenin markierte Nukleinsäuren am Partikel gebunden. Außerdem zeigte dieser Versuch, dass eine partielle Elution schon bei 75°C erzielt werden kann, jedoch bei 95°C von einer nahezu vollständigen Elution innerhalb 1 Minute auszugehen ist.

In der nächsten Entwicklungsstufe wurde untersucht, welches Konzentrationsverhältnis von Antikörper, Magnetpartikel und DIG markierter Gesamt-RNA zu einer effizienten Separation führten. Aus den Herstellerangaben der M-PVA-SAV2 Magnetpartikel ist bekannt, dass diese für biotinylierte Proteine von 150 kDa Größe eine maximale Kapazität von 30 – 40 pmol pro mg Partikel aufweisen. Laut Hersteller (abcam, Cambridge, GB) des Antikörpers handelt es sich bei diesem um einen biotinylierten monoklonalen Mausantikörper mit einer Größe von 162 kDa. Dieser Größe entsprechend sollten die Magnetpartikel für den eingesetzten Antikörper eine ähnliche maximale Kapazität aufweisen, wie für das biotinylierte Referenzprotein. Eine Menge von 1,6 µg dieses 162 kDa Antikörpers entsprechen ca. 10 pmol. Im folgenden Versuch wurden Separationen DIG markierter RNA aus einer Gesamt-RNA Lösung durchgeführt. Dabei wurde die Menge an Magnetpartikeln mit 0,25 mg und die der Gesamt-RNA mit 2 µg konstant gehalten. Vom Antikörper wurden unterschiedliche Mengen von 0,625; 1,25, 2,5 und 5 pmol eingesetzt. Dies entspricht einer Antikörperbeladung der Partikel von 2,5 pmol/mg; 5 pmol/mg 10 pmol/mg und 20 pmol/mg. Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse der Dot-Blots wurden mit Gesamt-RNA aus unterschiedlichen *in vivo* Markierungsansätzen erzeugt, so dass die einzelnen Separationen nicht untereinander verglichen werden können. Entscheidend für die Separation ist, wie viel markierte RNA in der Elution isoliert werden konnten. Die Ergebnisse in Abbildung 17 zeigt den Einfluss der Antikörpermenge auf die Separationseffizienz.

Partikelbeladung [pmolAK/mg]	S	W1	W2	E
2,5 pmol/mg				
5 pmol/mg				
10 pmol/mg				
20 pmol/mg				

Abbildung 17: Separation DIG markierter RNA mit unterschiedlichen Anti-DIG Antikörper Konzentrationen. Es wurden jeweils 2 µg *in vivo* markierte Gesamt-RNA, 0,25 mg Partikel und 0,4 µg Antikörper eingesetzt [AK: Anti-DIG Antikörper; S: Sorptionsüberstand nach der Bindung in 0,5x SSC-Puffer; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C]

So konnten mit einer Beladung von 2,5 pmol/mg nur 52% gemessen in LU der eingesetzten DIG-RNA gebunden und eluiert (Fraktion E) werden. Ein Großteil der markierten RNA wurde nicht gebunden und verblieb im Überstand. Eine Verdopplung der Antikörpermenge zeigte eine Steigerung der Ausbeute in der Elution auf 84%. Mit 10 pmol Anti-DIG Antikörper pro mg Partikel konnten über 90% der in der Gesamt-RNA enthaltenen DIG-RNA separiert werden. Eine weitere Erhöhung der Antikörperbeladung auf 20 pmol/mg konnte die Separationsausbeute nicht weiter steigern und lieferte ebenfalls eine Ausbeute von ca. 90%. Damit reichte eine Antikörpermenge von 1/3 der maximalen Beladung (10 pmol/mg) aus, um den Großteil der DIG-RNA zu separieren. Dabei musste der Antikörper nicht im Überschuss zugegeben werden, da die hohe Affinität von Biotin und Streptavidin zueinander, zu einer vollständigen Bindereaktion des Antikörpers an die Magnetpartikel führte. Ferner handelt es sich bei der zu separierenden DIG-RNA um relativ große und langkettige Moleküle, so dass die Anzahl der angebotenen Bindestellen (Antikörper) ausreichte, um die eingesetzte Ziel-RNA vollständig zu binden.

In diesem Separationsverfahren wurde die Ziel-RNA also nicht direkt über die DIG Markierung an die streptavidinfunktionalisierten Magnetpartikel gebunden. Die Kopplung erfolgte vielmehr in Sandwich-ähnlicher Weise über einen biotinylierten Anti-DIG Antikörper. Für die nähere Charakterisierung solcher spezifischen Bindungen ist es oft hilfreich, Bindungsisothermen aufzunehmen. Mit diesen kann bestimmt werden, wie viel Sorbat bei einer bestimmten Konzentration an das Sorbent bindet. (i) Für die erste Bindung des biotinylierten Antikörpers an die streptavidinfunktionalisierten Magnetpartikel war dies, wegen der hohen Bindungskonstanten nicht notwendig. Diese Kopplung konnte als chemische Funktionalisierungsreaktion angesehen werden, die vollständig ablief. Somit war gewährleistet, dass der Antikörper über seine Biotinylierung an das Streptavidin der M-PVA SAV2 Magnetpartikel band. (ii) Für die Bindung der DIG markierten RNA an die Antikörper sekundärfunktionalisierten Magnetpartikel ist von einer für Antikörper-Antigen Bindungen normalen Bindungskonstanten  $K_a$  von ca.  $10^8 \text{ M}^{-1}$  auszugehen (Kerr, 1990). Wegen dieser, im Vergleich zur Biotin Streptavidin Bindung, geringeren Bindungskonstante wäre die Aufnahme einer Adsorptionisotherme für diesen Bindungsschritt sinnvoll gewesen. Dies war jedoch nicht möglich, da die Einbaurate von DIG-11-UTP in die bakterielle RNA nicht molar, sondern nur relativ mittels Chemilumineszenz quantifiziert werden konnte. Für die Aufnahme einer Bindungsisotherme muss jedoch die genaue Anzahl an DIG-11-UTP Molekülen bekannt sein, die in jede einzelne RNA eingebaut wurden. Für die Messung dieser Anzahl sind keine Methoden bekannt, so dass keine Isotherme aufgenommen werden konnte. Der Einbau von DIG-11-UTP ist von der DNA Sequenz und der Anzahl der in den expremierten Genen enthaltenen Adenin Basen abhängig. Diese Base wird während der Transkription in RNA zur Base Uridin umgeschrieben. Die Anzahl einer bestimmten Base in der DNA Sequenz kann je nach betrachteter Spezies und nach betrachteten Genen stark variieren. Diese Variabilität wird augenscheinlich, wenn man beispielsweise den Gehalt an den Basen Guanin und Cytosin in unterschiedlichen Spezies vergleicht. Dieser Parameter für die thermische Stabilität der DNA beträgt für die vollständig entschlüsselten Genome von *P. aeruginosa* PA01 66% (Stover *et al.* 2000) und von *E. coli* K12 50% (Blattner *et al.* 1997). Ein Vergleich mit dem zweiten Referenzbakterium *E. faecium* war nicht möglich, da dessen Genom noch nicht vollständig sequenziert ist. Diese große Variabilität der DNA Sequenzen

unterschiedlicher Bakterienspezies und Gene ist eine weitere Schwierigkeit für die Aufnahme einer Bindungsisotherme.

### Optimiertes Separationsprotokoll

Die dargelegten Ergebnisse haben gezeigt, dass DIG markierte RNA mit großer Effizienz aus einem Gesamt-RNA Extrakt separiert werden kann. Dabei war der verwendete 0,5x SSC Puffer für die Bindung der DIG-RNA aus einer Gesamt-RNA gut geeignet. Eine Elution der gebundenen Ziel RNA war in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C möglich. Aus diesen Ergebnissen wurde ein optimiertes Separationsprotokoll mit 0,25 mg M-PVA SAV2 Partikeln, 0,4 µg Anti-DIG Antikörper und 2 µg *in vivo* markierte Gesamt-RNA entwickelt und für alle folgenden Separationen eingesetzt. Dieses Standardprotokoll zur DIG-RNA Separation ist nachfolgend aufgelistet.

### **Partikel Vorbereitung**

- 0,25 mg M-PVA SAV2 Magnetpartikel in 150 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufnehmen
- Partikel am Magneten separieren und Überstand verwerfen
- 2x mit 150 µl DEPC-H<sub>2</sub>O waschen, am Magneten separieren und Überstand verwerfen
- 2x mit 150 µl 0,5x SSC äquilibrieren, am Magneten separieren, Überstand verwerfen und die Partikel in 140 µl 0,5x SSC aufnehmen

### **Antikörper Bindung**

- 10 µl AK-Verdünnung mit einer Konzentration von 0,04 µg/µl zugeben
- 10 Minuten im Rotor inkubieren
- Partikel am Magneten separieren und Überstand verwerfen
- 2x mit 150 µl 0,5x SSC waschen und Überstand verwerfen
- Partikel in 100 µl 0,5x SSC aufnehmen

### **DIG markierte Gesamt-RNA Lösung** (Zeitgleich mit Antikörper-Bindung)

- 2 µg DIG-RNA mit 0,5x SSC auf 50 µl auffüllen
- 5 Minuten bei 70°C inkubieren (Auflösung der RNA-Sekundärstrukturen)
- 5 Minuten auf Eis abkühlen

### Separation

- 50 µl Gesamt-RNA Ansatz zu 100 µl vorbereitete Partikel geben
- 15 Minuten im Rotor inkubieren
- Partikel am Magneten separieren und Überstand als Sorptionsüberstand-Probe entnehmen
- 1x mit 150 µl 0,5x SSC waschen, am Magneten separieren und Überstand als Waschfraktion (W1) Probe entnehmen
- 2x mit 75 µl DEPC-H<sub>2</sub>O waschen, am Magneten Separieren und Überstand als Waschfraktion (W2) Probe entnehmen und poolen

### Elution

- 2x mit 75 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C und 850 upm für 1 Minuten im Heizblock inkubieren, am Magneten separieren und Überstand als Elutionsfraktion-Probe entnehmen und poolen
- Bis zur weiteren Analyse bei -80°C lagern.

Während der Separation wurden die jeweiligen Fraktionen zur Analyse auf Eis aufbewahrt und später bei -80°C gelagert. Mit diesem Protokoll war, wie in Abbildung 16 dargestellt, eine effiziente Separation der DIG markierten RNA mit Ausbeuten bis zu 95% möglich. Es waren nur geringe Verluste in der Sorptionsüberstand-Fraktion und in den Wasch-Fraktionen detektierbar.

Im Hinblick auf eine mögliche Nutzung des Verfahrens im Hochdurchsatz ist die Dauer der Durchführung des Protokolls wichtig, sie betrug ca. 45 Minuten. Diese Zeit ist im Vergleich zu kommerziellen Verfahren zur Aufreinigung eukaryontischer mRNA mittels poly(T) funktionalisierter Magnetpartikel um ca. 10 Minuten länger (z.B. chemagic mRNA Direct Kit, chemagen Biopolymer Technologie AG, Baesweiler oder Oligotex Direct mRNA Kit, QIAGEN, Hilden). Um das entwickelte Protokoll um 10 Minuten zu kürzen, könnten bereits mit Antikörpern funktionalisierte Partikel eingesetzt werden.

Ein Vergleich der Effizienz der entwickelten DIG-RNA Separation von ca. 90% mit anderen Nukleinsäure Isolierungsmethoden zeigte, dass diese Methode höhere Ausbeuten lieferte. Die Isolierung von Plasmid DNA resultiert beispielsweise in ca. 80% Ausbeute in der Elutionsfraktion (Davies *et al.* 1998). Die Aufreinigung eukaryontischer mRNA durch eine Hybridisierung an ein Oligo(T) funktionalisier-

tes Trägermaterial liefert eine Ausbeute von 80% – 90% (Jacobsen *et al.* 2004). Eine spezifische Separation eines humanen DNA Fragments mittels Capture-Hybridisierung lieferte 80% Ausbeute (Archer *et al.* 2006). Somit führt das entwickelte Separationsprotokoll zu einer ausreichenden Effizienz der Separation, die eine Durchführung weiterführender molekularbiologischer Untersuchungen erlaubt.

### 3.3.2. Anwendung des DIG-RNA Separationsprotokolls und Ausbeute der Separationen

Im Folgenden wurde untersucht, mit welchen Ausbeuten die Methode für die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienpopulationen anwendbar war. Die Ausbeuten der Separation wurden prozentual aus den Chemilumineszenz-Signalen [in Licht-Units (LU)] berechnet. Es wurde sowohl RNA aus *in vivo* markierten Kulturen der Referenzbakterien, als auch RNA aus markierten Biofilmen eingesetzt.

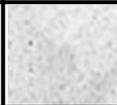
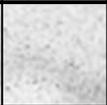
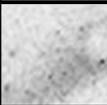
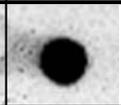
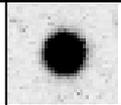
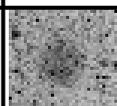
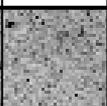
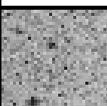
	S	W1	W2	E
Flüssig Reinkultur <i>P. aeruginosa</i>				
Chemil. Signale [% LU: S+W+E]	0,4	0,4	0,3	98,2
Flüssig Reinkultur <i>E. faecium</i>				
Chemil. Signale [% LU: S+W+E]	2,6	0,0		97,4
Biofilmprobe aus Trinkwasser				
Chemil. Signale [% LU: S+W+E]	45,5	13,8	5,7	35,0

Abbildung 18: Separation der DIG markierten RNA aus je 2 µg *P. aeruginosa*, 2 µg *E. faecium* Gesamt-RNA und 0,25 µg Gesamt-RNA aus einem Trinkwasserbiofilm [S: Sorptionsüberstand; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].

Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die DIG markierte RNA in allen drei Beispielen quantitativ aus der Gesamt-RNA Lösung separiert werden konnte. Für die beiden Ansätze aus den Referenzbakterien waren nur geringe Verluste im Sorptionsüberstand und in den Waschfraktionen festzustellen. Für die Probe aus den Referenzbakterien *P. aeruginosa* und *E. faecium* wurden über 90% der eingesetzten DIG-RNA in der Elutionsfraktion isoliert. Damit konnte das Verfahren sowohl für Proben aus Gram-negativen, als auch für Proben von Gram-positiven Bakterien durchgeführt werden, ohne dass die Separations-Effizienz durch die Bakteriengattung eingeschränkt wurde. In Abbildung 18 ist neben den Proben aus den Referenzbakterien auch die Separation von DIG markierter RNA aus Gesamt-RNA eines natürlichen Trinkwasserbiofilms dargestellt. Diese Probe wurde stellvertretend für alle Proben aus natürlichen Habitaten untersucht. Wie die Dot-Blot Analyse zeigt, waren größere Verluste an DIG-RNA in Sorptionsüberstand und Waschschritten zu verzeichnen und es konnten lediglich 35% der eingesetzten Ziel-RNA separiert werden. Diese viel geringeren Ausbeuten der Separation DIG markierten RNA aus Biofilmproben können mit den Verunreinigungen in der isolierten Gesamt-RNA (Tabelle 3) begründet werden. Diese Verunreinigungen durch Proteine oder DNA könnten die Bindung der DIG-RNA an die Magnetpartikel sterisch behindern haben. Außerdem waren diese Gesamt-RNA Proben nur sehr gering konzentriert, was einer vollständigen Bindung an das Sorbent entgegenwirkt. Eine Lösung läge in der Aufkonzentrierung der Separationsansätze, da eine höhere Sorbatkonzentrationen zu einer erhöhten Beladung der Magnetpartikel führen würde. Alternativ dazu könnte mehr Probenmaterial für die Separationen eingesetzt werden. Die markierte RNA könnte dann durch die Elution in ein geringes Volumen aufkonzentriert werden, was ihre Detektion im Dot-Blot erleichtern würde.

#### Direkte RNA Separation aus bakteriellem Rohextrakt

Zusätzlich zur Separation von DIG markierter RNA aus einem Gesamt-RNA Extrakt, wurde versucht, diese direkt aus bakteriellem Zellrohextrakt aufzureinigen. Hierzu wurden *in vivo* markierte Zellen des Referenzbakteriums *P. aeruginosa* mit Lysozym aufgeschlossen und Anti DIG Antikörper sekundärfunktionalisierte M-PVA SAV2 Magnetpartikel direkt zugegeben. Die Separation wurde nach dem

in Kapitel 3.3.1 dargelegten Protokoll durchgeführt. Dabei war es jedoch nicht möglich, signifikante Mengen an DIG markierter RNA zu isolieren (ohne Abbildung).

Der wahrscheinliche Grund dafür war in, während der Lyse der Bakterien freigesetzten Zellkomponenten (z.B. Zellmembran, Zellwand, Proteine, DNA) zu sehen, die eine Bindung der markierten RNA an die Magnetpartikel sterisch behinderten. Außerdem waren im Rohextrakt auch noch einzelne, nicht in die RNA eingebaute DIG-11-UTP Moleküle vorhanden, die die Ausbeuten an DIG markierter Ziel-RNA verminderten. Zusätzlich konnte nicht abgeschätzt werden, inwieweit zelleigene RNasen die RNA Moleküle im Rohextrakt angreifen und damit das gesamte Transkriptom verändern. Durch die Vorschaltung einer RNA Fixierung und Isolierung wird also sichergestellt, dass nur aussagekräftiges Probenmaterial in den nachgeschalteten Analysen eingesetzt wird. Für die standardisierte Isolierung der Gesamt-RNA sind viele verschiedene Methoden kommerziell erhältlich. In der Literatur sind darüberhinaus viele unterschiedliche nicht-kommerzielle Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren beschrieben, die auch für komplexe Habitats anwendbar sind (McIlroy, 2008). Der Separation der DIG markierten RNA musste also immer eine Isolierung der Gesamt-RNA vorgeschaltet werden.

### **3.3.3. Zusätzliche molekularbiologische Validierung der Spezifität der Separation**

Im Folgenden wurde die Spezifität der Separation mit Gesamt-RNA aus *in vivo* DIG markierten *P. aeruginosa* Kulturen untersucht. Mit den zuvor beschriebenen Experimenten konnte im Dot-Blot die Effizienz des entwickelten Verfahrens durch den spezifischen Nachweis der DIG-RNA in den Separationsfraktionen gezeigt werden. Dieses Nachweisverfahren detektierte jedoch ausschließlich markierte RNA Moleküle, nicht markierte Nukleinsäuren hingegen konnten mit dieser Methode nicht erfasst werden. Somit waren die Dot-Blot Experimente alleine nicht ausreichend, um die unspezifischen Bindungen unmarkierter Nukleinsäuremoleküle an die Partikel zu detektieren. Die Untersuchung der Spezifität ist aber sehr wichtig, da unspezifisch separierte DNA oder RNA nachfolgende Analysen stark beeinflussen können. Um die Spezifität der Separation näher untersuchen zu können, wurde eine nicht DIG markierte Nukleinsäure von bekannter Sequenz

und Konzentration als interner Standard eingesetzt. Bei diesen Versuchen konnte somit der Anteil an unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren durch eine quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) analysiert werden (Kapitel 2.14). In diesen Experimenten wurde in einer PCR ein 100 bp großes Amplikon hergestellt, das Teil des *tuf* Gens ist, einem für *Enterococcus* sp. spezifischen und konstitutiv expremierten Gen, das für den Elongationsfaktor EF-Tu kodiert. 0,25 µg dieses *tuf* Fragments wurden den Separationsansätzen mit 2 µg markierte Gesamt-RNA zugesetzt, um die unmarkierten Nukleinsäuremoleküle in den einzelnen Separations-Fractionen verfolgen zu können. Das *tuf* Fragment konnte dabei nach der Separation in einer Lösung von *P. aeruginosa* Gesamt-RNA mit spezifischen Primern in einer qPCR nachgewiesen werden. Beim Nachweis konnten Hintergrundsignale ausgeschlossen werden, da das *tuf* Gen in *P. aeruginosa* nicht vorkommt und ein detektiertes Signal damit ausschließlich vom *Enterococcus* spezifischen Amplikon erzeugt werden konnte. In der qPCR konnten die Mengen der jeweiligen Nukleinsäuren durch die gemessenen  $C_t$  Werte relativ zueinander bestimmt werden. Wegen der exponentiellen Signalzunahme während der qPCR-Zyklen entspricht ein Unterschied im  $C_t$  Wert ( $\Delta C_t$ ) von 3,3 einem Faktor von 10 der detektierten Nukleinsäuremengen.

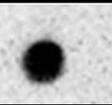
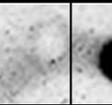
	gesRNA	S	W1	W2	E
Dot-Blot					
$C_t$ Werte <i>tuf</i> DNA <sub>IS</sub>	16,5	16,2	23,9	28,6	25,4
$C_t$ Werte <i>rpoS</i> mRNA <sub>DIG</sub>	26,1	25,8	29,4	34,2	28,9

Abbildung 19: Analyse der Spezifität der Separation. 0,25 µg *in vitro* synthetisierter *tuf* DNA (DNA<sub>IS</sub>) wurden zu 2 µg DIG-markierter Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* zugegeben. Die cDNA Mengen wurden in einer quantitativen SYBR Green PCR quantifiziert [gesRNA: Probe vor der Separation; S: Sorptionsüberstand; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].

Durch einen Vergleich der  $C_t$  Werte für das *tuf* Fragment in den Ansätzen vor der Separation (gesRNA) und in der Elutionsfraktion (E) kann die Spezifität der Separation evaluiert werden (siehe Abbildung 19). Je geringer dabei ein  $C_t$  Wert ist, desto höher war die Konzentration der Zielsequenz in der Probe.

Aus der Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale (nicht aufgeführt) war ersichtlich, dass die Ausbeute an DIG markierter RNA größer als 90% war. Damit wurde fast die gesamte eingesetzte markierte RNA effizient gebunden und wieder eluiert.

Die angegebenen  $C_t$  Werte der qPCR für die *tuf* DNA als internen Standard zeigten einen  $\Delta C_t$  Wert von 8,9 zwischen der nicht separierten Probe und der Elutionsfraktion. Da dies einem 1000-fachen Unterschied entspricht, wurden also nur ca. 0,1% der ursprünglich im Separationsansatz vorhandenen unmarkierten *tuf* DNA unspezifisch separiert. Diese hohe Spezifität konnte reproduzierbar erreicht werden, dabei wurden durchschnittlich 0,05% ( $\Delta C_t$  Wert =  $11 \pm 2$ ) der unmarkierten Nukleinsäuren unspezifisch gebunden wurden. Somit konnte mit dieser Separation reine DIG markierte RNA isoliert werden, da die Spezifität der Separation als Indikator für die Reinheit des Zielmoleküls angesehen werden kann. Das entwickelte Verfahren ermöglichte damit nicht nur eine effiziente Separation der DIG markierten RNA, sondern die Separation erfolgte auch hinreichend spezifisch. Die Untersuchung der Separation von DIG markierter RNA aus natürlichen Biofilmen zeigte, dass auch diese RNA spezifisch separiert werden konnte (ohne Abbildung).

Die Verwendung eines internen Standards zur Untersuchung der Spezifität biochemischer Reaktionen ist weit verbreitet. Er wird beispielsweise bei reversen Transkriptionen und qPCR (Dreier *et al.* 2005, Zucol *et al.* 2006) eingesetzt und auch zur Identifizierung und Quantifizierung von Analyten in der Chromatographie genutzt (Paxon *et al.* 2005). Ferner wurde ein solcher experimenteller Ansatz zum Testen der Spezifität einer Capture-Hybridisierung von humaner DNA an Magnetpartikel verwendet (Archer *et al.* 2006).

### Einbaurate des Nukleotidanalogs in die RNA

Aufgrund der hohen Ausbeuten und der hohen Spezifität der Separation DIG markierter RNA konnte die Einbaurate des Nukleotidanalogs DIG-11-UTP in die RNA bestimmt werden. Die dargelegten Ergebnisse haben gezeigt, dass in der Elutionsfraktion sowohl nur reine DIG-RNA, als auch die gesamte im Ansatz vorhandene DIG-RNA isoliert wurde. Somit repräsentiert die Menge an RNA in der Elution den Anteil der DIG markierten RNA an der eingesetzten Gesamt-RNA. Durch eine Quantifizierung der RNA Menge vor der Separation und in der Elutionsfraktion, mittels qPCR, war es demnach möglich, deren relatives Konzentrationsverhältnis zu bestimmen. Über die Menge der für die Separation eingesetzten Gesamt-RNA in  $\mu\text{g}$  konnte damit die Einbaurate des Nukleotidanalogs für einzelne mRNA Moleküle bestimmt werden.

In dem in Abbildung 19 dargestellten Ergebnis, wurde stellvertretend für die im Separationsansatz enthaltene mRNA die Menge an *rpoS* mRNA, mittels qPCR, bestimmt. Bei *rpoS* handelt es sich um ein für *P. aeruginosa* spezifisches Gen, das für den stressinduzierten Sigmafaktor  $\sigma^S$  codiert. In dieser Analyse wurde ein  $\Delta C_t$  Wert von 3 als Differenz zwischen nicht separierter Probe (gesRNA) und Elutionsfraktion gemessen. Somit wurden ca. 10% der eingesetzten *rpoS* mRNA als DIG markierte *rpoS* mRNA isoliert.

Wiederholte qPCR Experimente für diese mRNA zeigten, dass der Einbau von DIG-11-UTP je nach Wachstumsphase schwankte, wobei die gemessenen  $\Delta C_t$  Werte zwischen 3 und 7 lagen. Somit waren in der Elutionsfraktion 0,5% bis 10% der ursprünglich eingesetzten *rpoS* mRNA als DIG markierte *rpoS* mRNA enthalten (Einbaurate = 0,5%-10%). Dabei wiesen Bakterien gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase eine höhere Einbaurate des Nukleotidanalogs auf, als solche in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Dieses Ergebnis ist damit zu erklären, dass das *rpoS* Gen als Stressantwort bei hohen Zelldichten und Nährstofflimitierung verstärkt expremiert wird (Schreiber *et al.* 2006). Eine verstärkte Induktion der Expression dieses Gens führte demnach zu einem erhöhten Einbau von DIG-11-UTP in diese neu synthetisierte mRNA. Dieses Ergebnis zeigte, dass es nicht möglich ist, eine allgemeingültige Einbaurate anzugeben, da sie vom Expressionsniveau eines jeden Gens abhängt.

Anhand der in der qPCR ermittelten Mengenunterschiede an *tuf* DNA und *rpoS* mRNA in Separationsansatz und Elutionsfraktion (siehe Abbildung 19) lässt sich nun die Verunreinigung der separierten DIG-RNA mit unmarkierter RNA abschätzen. Die Bestimmung der Einbaurate zeigte, dass 10% der eingesetzten RNA markiert waren. Bei 2 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmenge entspricht dies ca. 200 ng DIG markierter RNA. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass in diesem Experiment 0,1% der eingesetzten unmarkierten RNA unspezifisch gebunden wurden (siehe Abbildung 19). Bei einer Menge von 1,8 µg (Gesamt-RNA - DIG-RNA) unmarkierte RNA wurden somit 1,8 ng dieser RNA in der Elutionsfraktion isoliert. Der Anteil der nicht markierten RNA (1,8 ng) an der DIG markierten RNA (200 ng) in der Elutionsfraktion betrug nach diesen Berechnungen also 0,9%.

Eine alternative Bestimmung der RNA Konzentrationen in der Elutionsfraktion mittels UV Spektrometrie konnte bei relativ geringen RNA Mengen wegen des Detektionslimits des Spektralphotometers nicht durchgeführt werden. Das Detektionslimit liegt mit 2 ng/µl über der in der Elutionsfraktion enthaltenen RNA Konzentration (Einbaurate 10% = 200 ng DIG-RNA in 150 µl Elutionsvolumen = 1,3 ng/µl). Für eine Separation mit erhöhten RNA Mengen wurde eine Einbaurate von ca. 1% detektiert, da 80 ng aus 6960 ng separiert wurden. Die mittels qPCR für die *rpoS* mRNA ermittelte Einbaurate dieses Experiments zeigte einen ähnlichen Wert von ca. 1%.

Eine Erhöhung der für die Markierung eingesetzten DIG-11-UTP Menge konnte die angegebenen Einbauraten nicht weiter steigern.

Die Einbaurate von DIG-11-UTP in die RNA lag nach diesen Ergebnissen also zwischen 0,5% und 10%, wobei sie durch die Genexpression und damit durch die Nährstoffversorgung im jeweiligen Habitat, die Populationszusammensetzung und die Markierungsdauer beeinflusst wurde. Diese Einbaurate erscheint relativ gering, wenn sie mit der radioaktiv markierten Uridins von bis zu 45% verglichen wird (Bremer und Yuan, 1968). Bremer und Yuan haben aber auch gezeigt, dass die Aufnahme des Uridins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, der die Markierungsreaktion limitiert. Die geringere Einbaurate an DIG-11-UTP kann damit erklärt werden, dass radioaktiv markiertes Uridin stärker aufgenommen wird als das für die *in vivo* Markierung eingesetzte Nukleotidanalogen. Nichtsdestotrotz war ein *in vivo* Einbau des DIG markierten Nukleotids in 0,5% bis 10% der

RNA für alle nachgeschalteten molekularbiologischen Untersuchungen ausreichend (siehe Kapitel 3.5 und 3.6).

#### Zusammenfassung der Separationsergebnisse

Aus den dargelegten Ergebnissen können die folgenden Schlüsse gezogen werden: (i) Die Spezifität des entwickelten Separationsverfahrens liegt bei 99,9%. (ii) Die Ausbeute der Separation liegt bei 95%. (iii) Die Einbaurrate an DIG-11-UTP in die RNA liegt bei 0,5% und 10%. (iv) Die Bindekapazität der M-PVA SAV2 Anti-DIG Antikörper funktionalisierten Partikel betrug somit 0,8 µg *in vivo* DIG markierter RNA pro mg Partikel aus 8 µg Gesamt-RNA.

### **3.4. Partikelvermittelte Capture-Hybridisierung zur Abtrennung markierter rRNA**

Durch die Entwicklung des Separationsverfahrens für DIG markierte RNA war es möglich, die *de novo* synthetisierte RNA von Bakterien aus Reinkulturen und natürlichen Biofilmen zu untersuchen. Dieses Verfahren sollte für die Analyse der bakteriellen Genexpression und der Taxonomie von natürlichen Populationen unbekannter Zusammensetzung angewendet werden. Zur Erhöhung der Sensitivität dieser nachgeschalteten Analysen wurde versucht, die DIG markierte bakterielle mRNA und rRNA weiter aufzureinigen. Ein mögliches Verfahren zur Separation von Nukleinsäuren bekannter Sequenz ist die so genannte Capture-Hybridisierung (Ranki 1983). Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren bekannter Sequenz durch Hybridisierung an komplementäre, festphasengebundene Oligonukleotide separiert. Die speziesübergreifend stark konservierte Sequenz der rRNA, die man sich bei Taxonomieanalysen zunutze macht, erlaubt den Einsatz einer solchen Capture-Hybridisierung zur Separation (kurz: Capture-Separation) von rRNA und mRNA.

Eine schematische Beschreibung einer solchen Aufreinigung ist in Abbildung 20 dargestellt.

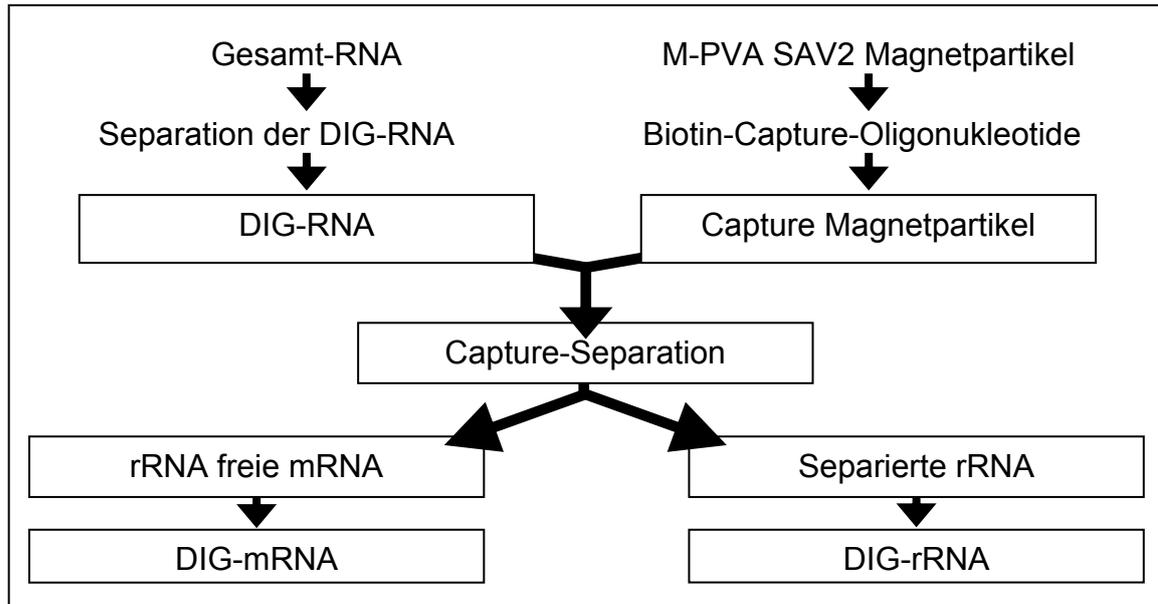


Abbildung 20: Schematischer Ablauf der Capture-Separation

### 3.4.1. Entwicklung eines Verfahrens zur Separation von DIG markierter rRNA und mRNA

Der Einsatz der Capture-Hybridisierung zur Trennung von mRNA und rRNA wird in der mikrobiellen Forschung zur Aufreinigung von mRNA eingesetzt. So vertritt beispielsweise die Firma Ambion dieses mRNA Reinigungsverfahren als MICROBExpress™ Kit. Durch den Einsatz von 5S-, 16S- und 23S rRNA-komplementären Oligonukleotiden ist es möglich, die rRNA aus einer bakteriellen Gesamt-RNA abzutrennen. Um die Capture-Separation für möglichst viele Bakterienspezies anwenden zu können, muss die Sequenz der Capture-Oligonukleotide zu den konservierten Bereichen der rRNA aller Bakterien, als so genannte Konsensus-Sequenz, stark homolog sein (Pang *et al.* 2004).

Durch die Biotinylierung der Capture-Oligonukleotide konnte dieses Verfahren mit den bereits verwendeten streptavidinfunktionalisierten Magnetpartikeln durchgeführt werden. Im Folgenden wurde somit eine Capture-Separation mittels biotinylierten 5S-, 16S- und 23S rRNA-komplementären Oligonukleotiden und M-PVA SAV2 Magnetpartikeln entwickelt. Die einzelnen Schritte der Separation wurden nach Pang *et al.* (2004) durchgeführt. Dabei hybridisierten die Oligonukleotide spezifisch mit der jeweils komplementären rRNA und wurden über ihre Biotinylier-

nung an die M-PVA SAV2 Magnetpartikel gekoppelt. Dies sollte das Abtrennen der rRNA aus der Gesamt-RNA Fraktion ermöglichen. Die nicht gebundene RNA, die zum Großteil aus mRNA bestehen sollte, verblieb im Sorptionsüberstand und sollte für anschließende Expressionsstudien verwendet werden. Die abgetrennte rRNA dagegen konnte für Populationsanalysen eingesetzt werden. Eine Analyse mit ausschließlich 16S rRNA komplementären Oligonukleotiden und Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* ist in Abbildung 21 dargestellt.

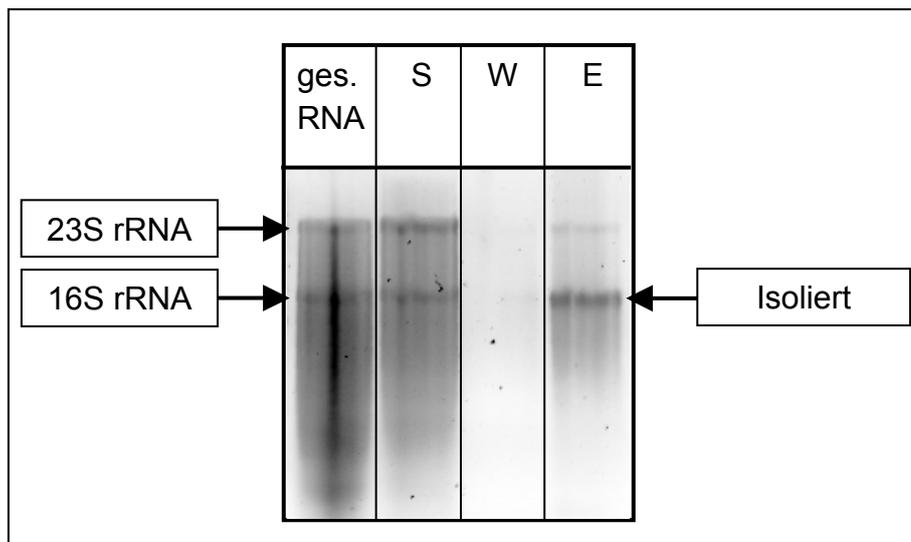


Abbildung 21: Capture-Separation der 16S rRNA aus einer DIG markierten *P. aeruginosa* Gesamt-RNA, Analyse im Formaldehyd-Agarosegel [23S rRNA, 16S rRNA: Lage der rRNA Banden im Gel; S: Sorptionsüberstand, W: Waschfraktion in 0,5x SSC Puffer, E: Elutionsfraktion in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].

Die Abbildung zeigt, dass es mit den 16S rRNA gerichteten Oligonukleotiden (Kapitel 2.8, Tabelle 1) möglich war, die 16S rRNA aus einem *P. aeruginosa* Gesamt-RNA Extrakt zu separieren. Für diesen Versuch wurde Gesamt-RNA aus einer Reinkultur eingesetzt, um RNA Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze eines Formaldehyd-Agarosegels zu verwenden. Die Bande der 16S rRNA ist in der Elutionsfraktion deutlich zu erkennen. Ein Teil der 16S rRNA blieb jedoch im Sorptionsüberstand zurück. Beim Einsatz aller rRNA komplementären Oligonukleotide und Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* ergab sich ein analoges Bild, das die Separation aller rRNA Moleküle zeigte (ohne Abbildung). Diese Ver-

suche haben die Anwendbarkeit der Capture-Separation für DIG markierter RNA aus Reinkulturen gezeigt.

Da dieses Verfahrens jedoch vor allem für die Taxonomieanalyse von Biofilmen unbekannter Zusammensetzung eingesetzt werden sollte, wurde im Folgenden die Anwendbarkeit dieser Methode für separierte DIG-RNA aus natürlichen Biofilmen untersucht.

### **3.5. Taxonomieanalysen aus unterschiedlichen Habitaten**

Die moderne Analyse der Taxonomie basiert nicht mehr auf morphologisch biochemischen Daten, sondern wird mittels der Sequenz der rDNA erforscht (Woese, 2000). Eine weit verbreitete Technik zur Analyse der bakteriellen Taxonomie ist die PCR gekoppelte Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE). Mit diesem Verfahren werden rDNA Moleküle gleicher Länge aber mit unterschiedlicher Sequenz aufgetrennt, was einer Auftrennung nach unterschiedlichen Bakterienspezies entspricht. Das Trennprinzip dieser Technik wurde in Kapitel 2.13 bereits näher beschrieben und beruht auf dem GC-Gehalt der aufgetragenen DNA Moleküle. Da jede Bakterienspezies eine in Teilen eigenständige Sequenz der 16S rRNA aufweist, entsteht so idealerweise für jede Spezies einer Population eine separate Bande im DGGE-Gel.

In dieser Arbeit wurden die Fraktionen der DIG-RNA- und der Capture-Separation in einer PCR-DGGE eingesetzt, um die Verwendbarkeit der separierten RNA für Populationsanalysen zu untersuchen. Alle Proben wurden hierfür mittels Random Hexamer Primern (Applied Biosystems, Foster City, USA) revers in cDNA transkribiert. Die 16S cDNA wurde in einer anschließenden PCR mit den universellen Eubakterien Primern (GC)341F und 907R amplifiziert und die 566 bp großen PCR-Produkte in einer DGGE analysiert.

Für eine Bewertung der Separationen wurden neben der Gesamt-RNA Fraktion und der DIG-RNA Fraktion auch die, aus dieser DIG-RNA mittels Capture-Separation abgetrennte DIG-rRNA Fraktion, untersucht. Durch einen Vergleich der Bandenmuster dieser Fraktionen, konnten die folgenden Aussagen getroffen werden:

- Das Bandenmuster der nicht separierten Probe gibt an, welche Bakterien in dem untersuchten Biofilm ursprünglich vorkommen.
- Das Bandenmuster der separierten DIG-RNA zeigt an, welche dieser Spezies DIG-11-UTP eingebaut haben, wobei der Einbau von ihrer physiologischen Aktivität abhängt.
- Das Bandenmuster der DIG-rRNA verdeutlicht, ob die Capture-Separation alle DIG-rRNA Fragmente des Biofilms abgetrennt hat.

Für die folgenden Populationsanalysen wurden natürliche Biofilmpopulationen aus Flusswasser, aus Trinkwasser und aus Seesediment *in vivo* mit DIG-11-UTP markiert, separiert und in einer PCR-DGGE analysiert. Das DGGE Gel der relevanten Fraktionen ist in Abbildung 22 aufgeführt.

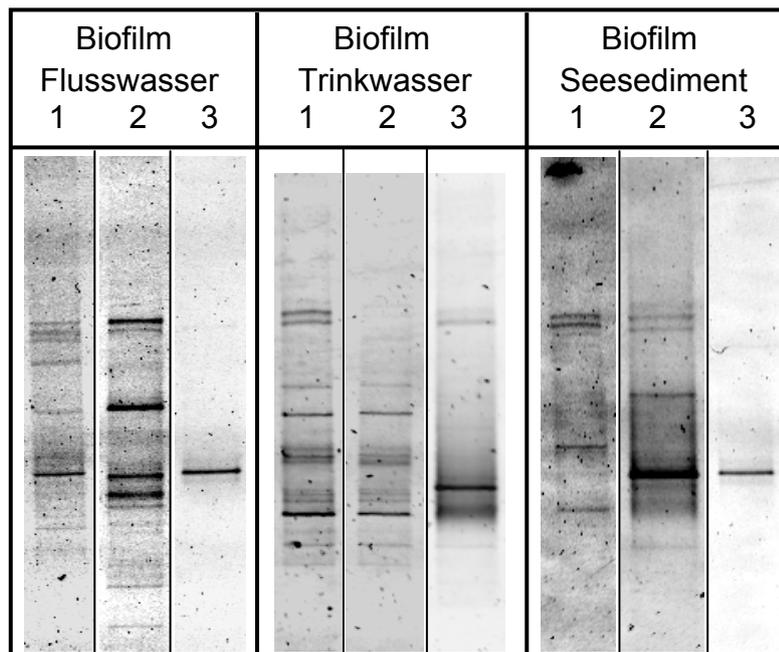


Abbildung 22: DGGE-Gele zur Bewertung der DIG-RNA und DIG-rRNA Separation in einer PCR-DGGE Populationsanalyse. Es wurde Gesamt-RNA von DIG markierten, natürlichen Biofilmen aus Flusswasser, Trinkwasser und Seesediment verwendet. In den Spuren 1 wurde die Gesamt-RNA Fraktion, in Spuren 2 die DIG-RNA Fraktion und in Spuren 3 die DIG-rRNA Fraktion der jeweiligen Biofilme analysiert.

In den dargestellten DGGE-Gelen (Abbildung 22) wies die jeweilige Gesamt-RNA Fraktion für alle Biofilme ein diverses Bandenmuster mit 5 bis 12 Banden auf. Ein Vergleich dieser Muster mit denen der separierten DIG-RNA (DIG-RNA Fraktion, Spuren 2) zeigte, dass sie für alle drei Habitate in Bandenanzahl und Lage im Gel vergleichbar waren. Diese Fraktionen wiesen lediglich hinsichtlich der Bandenintensität Unterschiede auf. Für Flusswasser- und Seesediment Biofilme blieb die Zahl der detektierten Banden mit 10 bzw. 5 Banden konstant. Für den Trinkwasser Biofilm nahm die Zahl der Banden von 12 auf 10 Banden ab. Wird nun von einer konstanten Effizienz der Reversen Transkription und der cDNA Amplifikation ausgegangen, so ist die Bandenintensität im DGGE-Gel zur rRNA Menge in der Separationsfraktion proportional. Intensivere Banden zeigten demnach an, dass diese rRNA Moleküle überproportional in der separierten DIG-RNA enthalten waren. Die zu diesen Banden gehörenden Spezies wiesen damit eine höhere DIG-11-UTP Einbaurrate auf, als solchen mit weniger intensiven Banden. Eine höhere Einbaurrate kann dabei mit einer verstärkten physiologischen Aktivität dieser Spezies begründet werden.

Wird die in diesen Versuchen detektierte Bandendiversität mit Werten aus der Literatur verglichen, so zeigt sich, dass eine für stark oligotrophe Habitate gewöhnlich Anzahl von bis zu 12 Banden vorzufinden war (de Vet *et al.* 2008). Damit spiegelt die *in vivo* markierte RNA die Populationsdiversität des untersuchten Habitats sehr gut wider. Darüberhinaus haben diese Ergebnisse gezeigt, dass das modifizierte Nukleotid DIG-11-UTP speziesunspezifisch in die RNA eingebaut wird. Die präsentierten Ergebnisse beschränken sich allerdings auf eubakterielle Spezies, da die eingesetzten PCR-DGGE Primer für diese spezifisch waren. In weiteren Untersuchungen muss demnach gezeigt werden, ob das Verfahren der *in vivo* Markierung und Separation auch auf *Archea* und anaerobe Bakterien angewendet werden kann. Dies wäre durch die Verwendung geänderter Primer leicht durchführbar.

Im Gegensatz zur DIG-RNA Fraktion war die Zahl der Banden in der DIG-rRNA Fraktion aus der Capture-Separation (Abbildung 22, Spuren 3) stark reduziert. Die separierte rRNA zeigte für alle untersuchten Habitate ein völlig anderes Bandenmuster, als die Gesamt-RNA in den Spuren 1 und die DIG markierte RNA in den Spuren 2. In der DIG-rRNA Fraktion waren nur noch 20% der ursprünglich vorhandenen Banden detektierbar. Damit verfälschte die Capture-Separation das

Bild der Zusammensetzung der Bakterienpopulationen in der PCR-DGGE signifikant. Diese Beobachtung kann nur damit erklärt werden, dass die in der Capture-Separation verwendeten Oligonukleotide selektiv mit der rRNA bestimmter Bakterienspezies hybridisierten. Eine Sequenzierung der dominanten Banden in den Spuren 3 aller untersuchten Biofilme ergab, dass es sich dabei um einen *Sphingomonas sp.* Stamm handelte (Sequenzvergleich siehe Anhang 6.2.1).

Die eingesetzten Capture Nukleotide wurden nach Pang *et al.* (2004) synthetisiert, wobei deren für alle Eubakterien einsetzbaren Sequenzen basierend auf der rRNA von *Yersinia pestis* EV76 erarbeitet wurden (Pang *et al.* 2004). In den Versuchen dieser Doktorarbeit konnte mit diesen Capture-Nukleotiden neben der rRNA aus *Sphingomonas sp.* auch die rRNA aus *P. aeruginosa* quantitativ separiert werden. Um diese Spezifität näher zu untersuchen, wurde die Sequenz dieser Oligonukleotide mit Daten einer Online Datenbank abgeglichen (BLAST Sequenzvergleich, siehe Anhang 0). Dabei zeigte sich, dass sie wie erwartet zur 16S rRNA Sequenz einer großen Menge von Eubakterien komplementär waren. Demnach kann das verminderte Bandenmuster nach der Capture-Separation nicht mit einer zu hohen Spezifität dieser Oligonukleotide begründet werden. Der Einsatz dieser Methode zur Separation bakterieller rRNA aus den hier untersuchten natürlichen Habitaten bedürfte also einer tiefgreifenden Optimierung.

Die präsentierten Ergebnisse haben aber darüberhinaus gezeigt, dass Populationsanalysen direkt mit DIG markierter RNA, ohne eine zusätzliche Separation der rRNA durchgeführt werden können. Damit kann zukünftig auf eine Capture-Separation verzichtet werden. Dies bietet im Hinblick auf den Einsatz dieses Verfahrens im Hochdurchsatz den Vorteil eines verkürzten Separationsprotokolls. Der Ablauf eines solchen Protokolls ohne Capture-Separation ist in Abbildung 23 nochmals schematisch dargestellt.

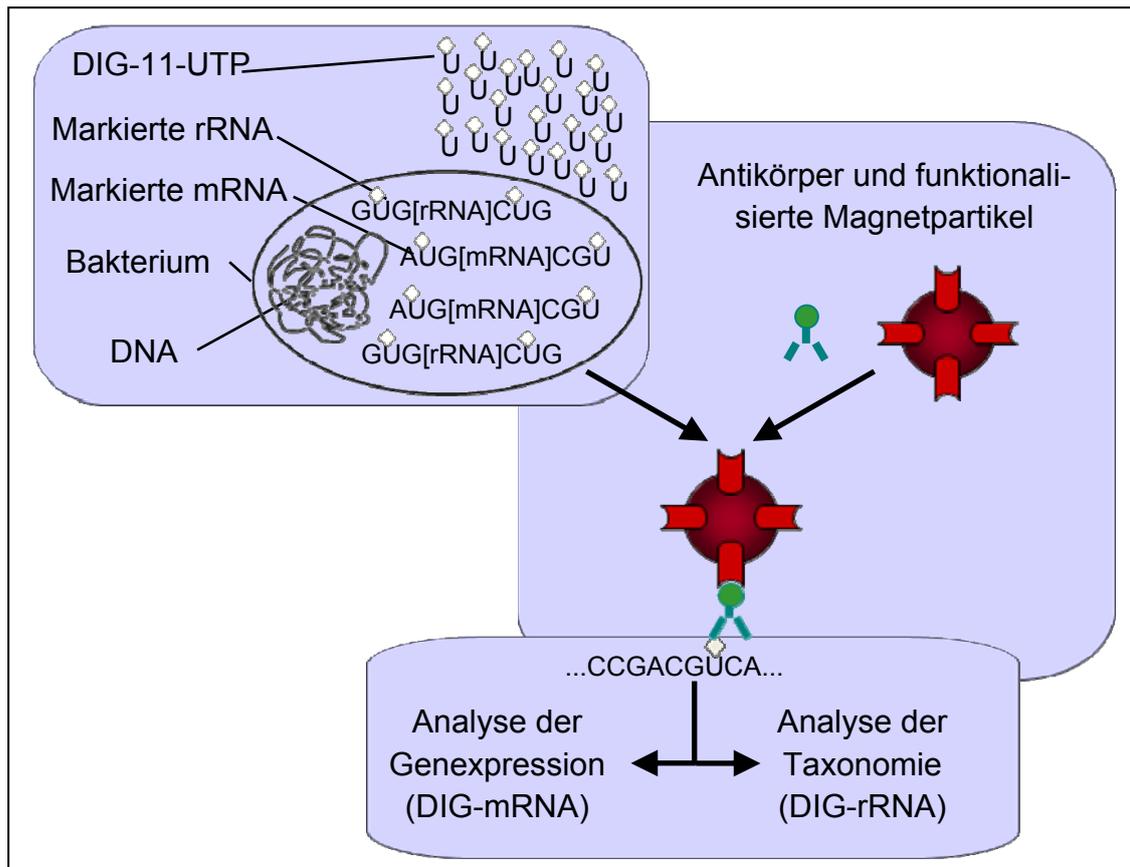


Abbildung 23: Schema des verkürzten Protokolls ohne Capture-Separation.

Ein Vergleich dieser DIG-RNA basierten Methode mit Standard PCR-DGGE Protokollen und der Metagenom Forschung zeigt, dass diese meist rDNA nutzen. Damit werden in solchen Untersuchungen alle in einem Habitat vorhandenen Bakterien, unabhängig von ihrem physiologischen Status, erfasst (De Vero und Giudici, 2008, Asakawa und Kimura, 2008, Emtiazi *et al.* 2004, Muyzer *et al.* 1993). Sie beleuchten also, welche Bakterien in dem untersuchten Habitat heimisch sind. Informationen über die 16S rDNA besitzen jedoch keinerlei Aussagekraft über die physiologischen Eigenschaften der betrachteten Mikroorganismen.

Eine Methode zur Erfassung der Vitalität von Bakterien in PCR basierten Analysen ist der Einsatz von Propidium Monoazid (PMA). Dieses Reagenz interkaliert in extrazelluläre DNA und die DNA toter Zellen und verhindert deren Amplifikation in einer nachgeschalteten PCR. Die Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien ist durch den Einsatz von PMA möglich, da es nur in Zellen mit einer defekten Membran eindringen kann. Der Defekt von Membranen gilt dabei

als Charakteristikum für eine tote Bakterienzelle. Diese Methode wurde beispielsweise eingesetzt, um die Effizienz von Desinfektionsmaßnahmen in Abwasser zu untersuchen (Rieder *et al.* 2008).

PCR-DGGE Analysen, die rRNA als Ausgangsbasis verwenden, beziehen ebenfalls die Vitalität der Mikroorganismen mit in ihre Betrachtung ein und erfassen nur die lebenden Spezies (Tannock *et al.* 2004). Dieser Vitalitätsmarker ist jedoch von der Halbwertszeit der eingesetzten RNA im untersuchten Habitat abhängig. Dementsprechend muss die Halbwertszeit der RNA analysiert werden, bevor sie als ein Vitalitätsparameter gewertet werden kann. Die durchschnittliche Halbwertszeit bakterieller rRNA *in vivo* liegt bei ca. 48 Stunden, wohingegen mRNA schon nach wenigen Minuten abgebaut werden kann (Villarino *et al.* 2000, Prescott und Fricker, 1999, Rauhut und Klug, 1999).

Die Verwendung von RNA in den Analysen von Bakterien aus natürlichen Habitaten kann somit als Vitalitätsmarker gewertet werden, aber es ermöglicht keinerlei Aussagen über die physiologische Aktivität der Mikroorganismen. Die stabile Isotopenbeprobung (SIP) dagegen erlaubt Aussagen über die Stoffwechselaktivität der untersuchten Spezies. Sie bleibt dabei aber auf bestimmte Nährsubstrate wie beispielsweise CO<sub>2</sub> oder Methanol beschränkt (Lueders *et al.* 2004). Setzt man dagegen *in vivo* DIG markierte RNA ein, so werden alle physiologisch aktiven Bakterien unabhängig von ihren metabolischen Fähigkeiten erfasst. Schließlich können aktive Bakterien das modifizierte Nukleotid (DIG-11-UTP) aufnehmen und in die RNA einbauen. Die detektierten Bakterien tragen somit aktiv zur Funktionalität, beispielsweise eines Biofilms, bei. Diese Methode erlaubt also die Differenzierung zwischen aktiven und inaktiven Zellen in einem Habitat.

### 3.6. Erprobung des Separationsverfahrens in Expressionsanalysen

Das Verfahren der *in vivo* Markierung und Separation bakterieller RNA, hatte das Ziel, die Untersuchung der Taxonomie und der Funktionalität unbekannter Bakterienpopulationen zu vereinfachen. Im vorangegangenen Kapitel haben die molekularbiologischen Taxonomieuntersuchungen bereits gezeigt, dass DIG-RNA in reversen Transkriptionen und PCR Experimenten eingesetzt und exprimierte rRNA Gene analysiert werden können. Im Folgenden wurden nun exemplarisch die Expressionsraten induzierbarer funktioneller Gene (mRNA) im Verlauf einer Separation untersucht.

#### 3.6.1. Methodik der Expressionsanalyse mit den Referenzbakterien

Bei Expressionsanalysen wird die Induktion von Genen durch bestimmte Umweltstimuli untersucht. Ein Maß für die Stärke der jeweiligen Expression ist die Menge an mRNA, die von einem bestimmten Gen transkribiert wird. Da die *in vivo* Markierung zu einem verstärkten Einbau von DIG-11-UTP in die entsprechende mRNA eines induzierten Gens führt, sollte eine erhöhte Transkriptionsrate mit der entwickelten Methode nachweisbar sein. Im Folgenden wurde untersucht, ob die verstärkte Expression eines bestimmten Gens auch in separierter DIG-RNA nachweisbar ist. Dafür wurden keine Umweltproben verwendet, da die unbekannte Populationszusammensetzung eine gezielte Betrachtung eines bestimmten Gens einer Spezies verhindert.

In dieser Arbeit wurde die Expression von zwei induzierbaren Genen aus den Referenzbakterien in einer differentiellen Expressionsanalyse mittels quantitativer PCR (Kapitel 2.14, Primer siehe Tabelle 2) untersucht. Das *rpoS* Gen aus *P. aeruginosa*, das den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^S$  kodiert, wird bei hohen Zelldichten oder Nährstofflimitierung verstärkt exprimiert. Das Resistenzgen *vanA* gegen das Antibiotikum Vancomycin aus *E. faecium* wird dagegen durch die Anwesenheit von Vancomycin im Nährmedium induziert. Die Induktion beider Gene ist in Kapitel 2.2.2 ausführlich beschrieben.

Bei dieser differentiellen Expressionsanalyse wurden die Induktionsfaktoren der untersuchten Gene nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode ermittelt (Pfaffl, 2001). Dabei kann die Mengen an Ziel-mRNA nach einer reversen Transkription in einer SYBR

green qPCR anhand von  $C_t$  Werten erfasst werden (Kapitel 2.14). Durch den Vergleich von nicht induzierten und induzierten Bakterienkulturen kann damit die Induktion des Zielgens ermittelt werden. In der nicht induzierten Kultur findet lediglich eine Grundexpression des Zielgens statt, dafür wird es in der induzierten Kultur verstärkt expremiert. Der beispielhafte Ablauf einer solchen differentiellen Expressionsanalyse für bekannte, induzierbare Gene ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

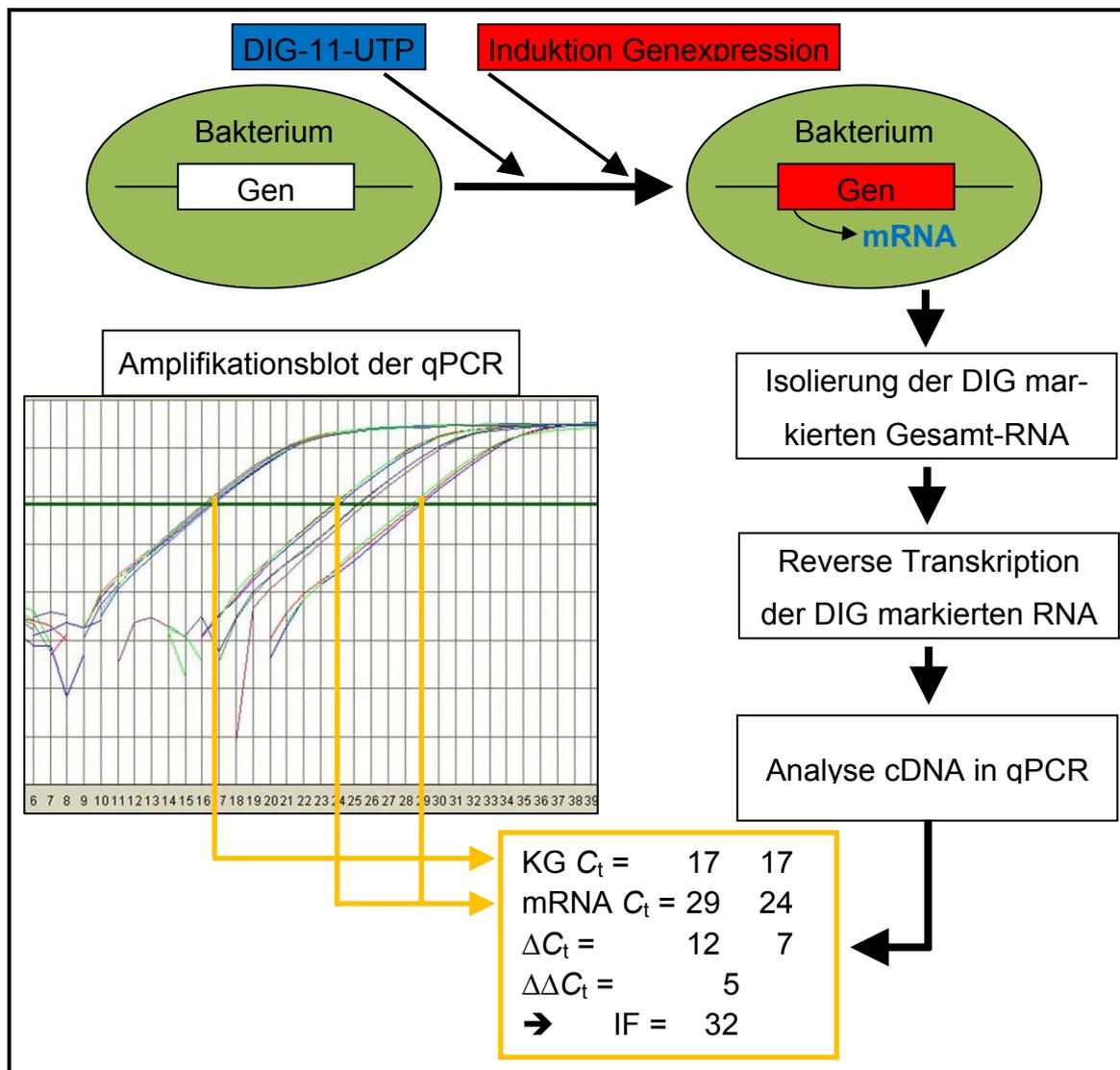


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Expressionsanalyse. Die beispielhafte Berechnung der Induktion aus den  $C_t$  Werten des qPCR Amplifikationsblots sind in orangener Farbe dargestellt [KG: Konstitutiv expremiertes Gen zur Normalisierung, mRNA: mRNA des Zielgens, IF: Induktionsfaktor].

In der qPCR werden die Konzentrationen der Ziel-RNA und die eines konstitutiv exprimierten Gens aufgenommen. Ein konstitutiv exprimiertes Gen wird in allen Organismen einer Art im gleichen Ausmaß transkribiert, da es für ein Überleben des Organismus essentiell ist, wie z.B. das Gen der 23S rRNA. Die Menge der Ziel-mRNA wird zu diesem konstitutiv exprimierten Gen normalisiert, um die Werte der beiden Kulturen vergleichbar zu machen. Die Normalisierung durch die Subtraktion des  $C_t$  Wertes der konstitutiv exprimierten RNA vom  $C_t$  Wert des Ziel-Gens ergibt den  $\Delta C_t$  Wert. Der Unterschied der  $\Delta C_t$  Werte von induzierter und nicht induzierter Kultur durch Subtraktion, ergibt dann den relevanten  $\Delta\Delta C_t$  Wert. Der  $\Delta\Delta C_t$  Wert zeigt somit das Ausmaß der Induktion an und die Umrechnung in einen Induktionsfaktor (IF) erfolgt, wegen des exponentiellen Charakters der Amplifikation der qPCR, nach der Formel:  $IF = 2^{\Delta\Delta C_t}$ .

### **3.6.2. Vergleich der Expressionsprofile des *rpoS* Gens in *Pseudomonas aeruginosa* und des *vanA* Gens in *Enterococcus faecium***

Für das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* wurde die Expression des *rpoS* Gens bei unterschiedlichen Zelldichten untersucht, wobei dieses Gen bei hohen Zelldichten induziert wird (Murakami *et al.* 2005). Die Induktion des *rpoS* Gens wurde, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Nach der RNA Isolierung wurde die Induktion des *rpoS* Gens in einer qPCR ermittelt. Die für die *rpoS* mRNA der induzierten (stationäre Wachstumsphase) und nicht induzierten Kulturen (exponentielle Wachstumsphase) ermittelten  $C_t$  Werte wurden zu der konstitutiv exprimierten 23S rRNA von *P. aeruginosa* normalisiert.

Für die isolierte Gesamt-RNA, die ein Gemisch aus markierter und nicht markierter RNA enthält, wurde eine 5-fache Induktion ( $\Delta\Delta C_t = 2,3$ ) des *rpoS* Gens für die Bakterien in der stationären Phase gemessen. Zur Bewertung des entwickelten *in vivo* Markierungs- und Separationsverfahrens wurde die DIG markierte RNA aus der Gesamt-RNA separiert und in der gleichen Weise analysiert. Eine Untersuchung der Induktion direkt in der Elutionsfraktion der DIG-RNA Separation ergab eine 4-fache Induktion ( $\Delta\Delta C_t = 2,0$ ) des *rpoS* Gens für die Bakterien in der stationären Phase. Diese Ergebnisse zeigten geringe Verluste des Zielmoleküls, der *rpoS* mRNA, während der Separation und sind in Abbildung 25 nochmals zusammenfassend dargestellt. Die in den präsentierten Ergebnissen gemessenen

Induktionsfaktoren waren im Vergleich zu in der Literatur erreichten Werten um den Faktor 10 geringer (Coutard *et al.* 2007), was mit den Kultivierungsbedingungen im Vollmedium erklärt werden kann. Durch das schnelle Zellwachstum wurde dieses Gen offensichtlich auch schon bei geringeren Zelldichten der nicht induzierten Kontrollkulturen expremiert. Dies resultierte in einer niedrigeren Differenz der Expressionsniveaus der beiden Ansätze.

Die Vancomycin-Resistenz des Gram-positiven Referenzbakteriums *E. faecium* wird durch das *vanA* Gen vermittelt, wobei *vanA* der dominante Resistenzfaktor in Enterokokken ist (Arthur *et al.* 1996). Die Induktion des *vanA* Gens hängt von der Vancomycin Konzentration im Wachstumsmedium der Vancomycinresistenten Bakterien ab. Die Induktion des *vanA* Gens wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Nach der RNA Isolierung wurde analog zu dem vorangegangenen Experiment mit *P. aeruginosa* die Induktion in einer qPCR nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode bestimmt. Die für die *vanA* mRNA der induzierten (Zugabe von Vancomycin) und nicht induzierten Kulturen (Zugabe von sterilem H<sub>2</sub>O) ermittelten  $C_t$  Werte wurden zu der konstitutiv expremierten 23S rRNA von *E. faecium* normalisiert. Die so erhaltenen  $\Delta C_t$  Werte konnten zur Bestimmung der Induktion des *vanA* Gens verglichen werden. Für die aus den Kulturen isolierte Gesamt-RNA, die wiederum eine Mischung aus markierter und nicht markierter RNA enthielt, wurde eine 9-fache Induktion ( $\Delta\Delta C_t = 3,1$ ) des *vanA* Gens berechnet. Auch aus dieser Gesamt-RNA Lösung wurde die DIG markierte RNA separiert und die Induktion des *vanA* Gens analysiert. Für die DIG-RNA ergab sich ebenso eine 9-fache Induktion ( $\Delta\Delta C_t = 3,1$ ) des *vanA* Gens (Abbildung 25). Bei dieser Separation waren also keine Verluste in der Induktionsrate nachweisbar. Die Induktionsfaktoren des Vancomycin-Resistenzgens *vanA* lagen mit Werten von ca. 9 unterhalb der Werte, die in vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe erreicht wurden, was durch eine mediumsbedingte autologe Induktion des *vanA* Gens erklärt werden kann (Obst *et al.* 2006, Schwartz und Kohnen, 2007).

Es konnte letztlich gezeigt werden, dass die Induktion eines Gens in vergleichbarer Weise auch in separierter DIG-RNA nachweisbar war.

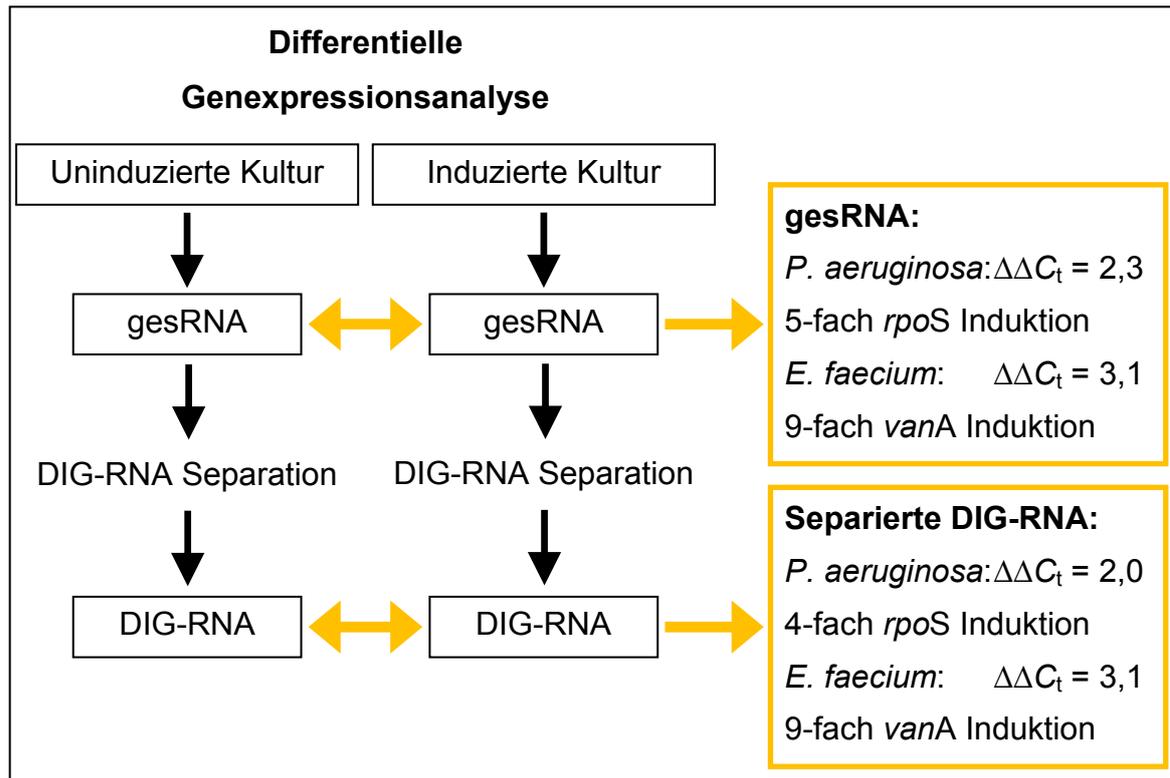


Abbildung 25: Zusammenfassung der Expressionsanalyse des *rpoS* Gens aus *P. aeruginosa* und des *vanA* Gens aus *E. faecium*. Die Induktionsfaktoren wurden für die verschiedenen Separationsfraktionen angegeben.

Die Einsetzbarkeit der in dieser Arbeit entwickelten Methode für Expressionsanalysen wurde also durch die Untersuchung der Induktion zweier spezifischer Gene aus den Referenzbakterien *P. aeruginosa* und *E. faecium* gezeigt. Da das Verfahren zukünftig unter anderem in der Erforschung der bakterieller Stressantworten eingesetzt werden soll, wurden für die exemplarischen Expressionsanalysen zwei durch Stress induzierbare Gene untersucht.

Diese Ergebnisse lassen sich zu zwei wichtigen Aussagen zusammenfassen:

1. Isolierte DIG-RNA kann direkt in molekularbiologischen Untersuchungen ohne zusätzliche Probenvorbereitung eingesetzt werden.
2. Eine Induktion der Beispiel-Gene war vor und nach der Separation in annähernd gleicher Höhe nachweisbar.

Das bedeutet, dass das relative Konzentrationsverhältnis von konstitutiv exprimiertem Gen und induziertem Gen vor und nach der Separation konstant war. Daraus wiederum lässt sich schließen, dass DIG-11-UTP induktionsabhängig in

die neu synthetisierte RNA eingebaut wurde. Somit ist der Einbau dieses Nukleotidanalogs proportional zur Expressionsrate der betrachteten Gene und die isolierte DIG markierte RNA spiegelt die realen Expressions-Verhältnisse in den betrachteten Bakterien wieder. Die separierte DIG-RNA liefert also ein Abbild der *in situ* vorherrschenden Populationszusammensetzung und deren genetischer Aktivität.

Die Betrachtung der markierten RNA bietet gerade für die Analyse der Reaktion von Bakterien auf exogene Stressstimuli große Vorteile. So kann mit diesem Verfahren beispielsweise zwischen mRNA mit einer kurzen Halbwertszeit und unter Stress stabilisierten mRNA Molekülen unterschieden werden. Darüberhinaus erlaubt es die Betrachtung der Expression unbekannter Gene, da stark exprimierte Gene verstärkt markiert und separiert werden.

Mit dem entwickelten Verfahren können demnach zukünftig auch Genexpressionsmuster unbekannter Gene aus unbekanntem Organismen in natürlichen Habitaten analysiert werden. Hierfür müssen jedoch Amplifikations-Methoden für die isolierte DIG markierte RNA entwickelt werden, die die Anzahl der erfassten Gene nicht durch die Wahl bestimmter Primer limitiert. Ansätze dazu wurden bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Schwartz des IFG erarbeitet.

### **3.7. Übertragung des Verfahrens auf den chemagic Prepito™**

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur Separation Digoxigenin markierter RNA sollte die Grundlage für die Entwicklung eines kommerzialisierbaren Kits bilden. Mit den zuvor präsentierten Ergebnissen erscheint eine solche Konfektionierung von wissenschaftlicher Seite leicht realisierbar. Der Fokus liegt dabei auf der Applikation des entwickelten Verfahrens im Hochdurchsatz. Für Magnetpartikel basierte Hochdurchsatzanwendungen zur Nukleinsäureseparation im Bereich eines Analysevolumens unter 0,6 ml bietet die Firma chemagen Biopolymer Technologie AG den chemagic Prepito™ an. Das genaue Funktionsprinzip dieses in Abbildung 26 dargestellten Geräts wurde bereits in Kapitel 1.2.7 ausführlich dargestellt.



Abbildung 26: chemagic Prepito™ der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG. A: Touchscreen zur Bedienung; B: Im Inneren, beweglicher Magnetseparator; C: Im Inneren, Mikrotiterplatte; D: Pufferreservoir zur Befüllung der Mikrotiterplatte.

### 3.7.1. Anpassung des Separationsverfahrens

Das in Kapitel 3.3.1 entwickelte Protokoll zur Separation DIG markierter RNA musste für den Einsatz im Hochdurchsatz auf Basis des chemagic Prepito™ angepasst werden. Für die Wasch- und Bindschritte wurde eine 8 (A – H) x 12 Kavitäten (1 – 12) Mikrotiterplatte verwendet, somit standen für die Binde- und Waschschrte 8 Stationen (A – H) zur Verfügung (siehe Abbildung 27). Für die Elution waren jeweils zwei weitere, mit Plastikröhrchen ausgestattete Plätze vorhanden. Als Mindestvolumen für eine effiziente Separation der Partikel wurden 200 µl ermittelt.

Die protokollbedingten Inkubationszeiten zur Bindung von Antikörper bzw. DIG-RNA wurden in Kavität B für 8 Minuten bzw. in Kavität E für 12 Minuten unter gelegentlichem Rühren durchgeführt. Die Waschschrte wurden durch Resuspendierung der beladenen Magnetpartikel in den jeweiligen Puffern realisiert. Da die Funktion eines Heizblock-Schüttelinkubators fehlte, musste die Elution außerhalb des Geräts durchgeführt werden. Als letzten Schritt des Protokolls wurden die Partikel in 200 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und zur Elution manuell 2 Minuten in einem Heizblock Schüttelinkubator bei 850 upm und 95°C inkubiert.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Zeit [min]
A	Zuvor in 0,5x SSC Puffer äquilibrierte M-PVA SAV2												2
B	Antikörperverdünnung in 0,5x SSC Puffer												8
C	0,5x SSC Waschpuffer für Antikörper beladene M-PVA SAV2												2
D	Gesamt-RNA Lösung in 0,5x SSC Puffer												2
E	0,5x SSC Waschlösung für DIG-RNA beladene M-PVA SAV2												2
F	DEPC-H <sub>2</sub> O Waschlösung für DIG-RNA beladene M-PVA SAV2												2
G	DEPC-H <sub>2</sub> O Waschlösung für DIG-RNA beladene M-PVA SAV2												2
H													
1	Resuspendieren in Elutionspuffer												2
2													

Abbildung 27: Belegung der Mikrotiterplatte und Dauer der Verfahrensschritte im chemagic Prepito™. Im Außenrand sind die Positionen beschriftet und im Inneren ist die Belegung aufgeführt.

Vor der Verwendung dieses Protokolls wurde der chemagic Prepito™ entsprechend programmiert (Siehe Anhang, Kapitel 6.1). Die Ergebnisse einer Separation DIG markierter RNA mittels des chemagic Prepito™ werden im nächsten Kapitel dargestellt.

### 3.7.2. Anwendung des automatisierten Protokolls zur Isolierung DIG-markierter RNA

Das entwickelte Programm des chemagic Prepito™ wurde in Separationsexperimenten getestet und mittels Dot-Blot und qPCR analysiert. Durch die Zudotierung der *tuf* DNA konnte auch die Spezifität der Separation erfasst werden. Abbildung 28 zeigt sowohl im Dot-Blot, als auch durch die C<sub>t</sub> Werte für das *tuf* DNA Fragment, dass eine Separation technisch möglich ist.

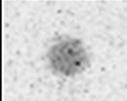
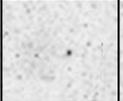
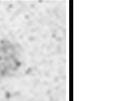
	gesRNA	S	W1	W2	E
Dot-Blot					
C <sub>t</sub> Werte <i>tuf</i> DNA <sub>IS</sub>	16,4	16,8	22,6	22,5	28,7

Abbildung 28: Analyse der Separation mittels chemagic Prepito™. 0,25 µg *in vitro* synthetisierter *tuf* DNA in 5 µg DIG-markierter Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* [gesRNA: Probe vor der Separation; S: Sorptionsüberstand; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].

Insgesamt konnten jedoch mit 66% DIG markierten RNA ca. 30% weniger aus dem Gesamt-RNA Extrakt isoliert werden, als bei einer manuell durchgeführten Separation. Betrachtet man die C<sub>t</sub> Werte für das *tuf* Amplikon in der Gesamt-RNA und in der Elutionsfraktion, so zeigen diese, dass lediglich 0,02% ( $\Delta C_t = 12,3$ ) der unmarkierten Nukleinsäuren gebunden wurden.

Damit konnte das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren auf den chemagic Prepito™ übertragen werden. Es waren zwar Einbußen bei der Ausbeute zu verzeichnen, die Spezifität aber war gleichwertig zu den manuell durchgeführten Separationen. Damit ist der Einsatz dieses Verfahrens im Hochdurchsatz auf dem chemagic Prepito™ realisierbar. Für eine vollständig automatisierte Separation wäre jedoch die Einbindung eines beheizbaren Schüttelinkubators notwendig, da eine Elution der DIG markierten RNA nur durch Erhitzen erreicht werden kann. Dies wäre mit relativ geringem Aufwand zu verwirklichen. Die geringeren Ausbeuten, die mit dem chemagic Prepito™ erreicht werden konnten, sind auf die lange Inkubationsdauer der Gesamt-RNA Lösung bei Raumtemperatur zurückzuführen, die einen Abbau der RNA begünstigte. Wird das Protokoll manuell durchgeführt, wird die Gesamt-RNA bis zur Separation auf Eis gelagert. Somit wäre eine Ausrüstung des chemagic Prepito™ mit Kühlelementen für die RNA Proben ebenfalls denkbar, um mit diesem Gerät die maximale Leistung der Separation erreichen zu können.

Alternative Geräte zum chemagic Prepito™, die ebenfalls automatisierte Magnetseparationen von Nukleinsäuren durchführen können, sind der QIAGEN BioRo-

bot<sup>®</sup> M48 und der Tecan Freedom EVO<sup>®</sup>. Der BioRobot<sup>®</sup> M48 verarbeitet dabei 6 Proben parallel, wohingegen der chemagic Prepito<sup>™</sup> 12 Proben in einer Separation prozessieren kann. Für den Bedarf eines Forschungslabors sind solche Probenzahlen ausreichend. Für Anwendungen mit großen Probenzahlen bietet der Tecan Freedom EVO<sup>®</sup> die Möglichkeit 96 Proben parallel zu separieren. So ist die zu verarbeitende Probenanzahl ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl eines geeigneten, automatisierten Separationssystems.

Der chemagic Prepito<sup>™</sup> weist aber zu beiden alternativen Geräten den Vorteil auf, dass seine Separatornadeln auch als Rührer eingesetzt werden können. Die dadurch erreichte vollständige Resuspendierung der Partikel, erhöht dabei die Ausbeute der Separationen. Bei vollständig suspendierten Partikeln sind nämlich alle Bindungsplätze für das Zielmolekül zugänglich. Liegen dagegen Partikelaggregate vor, stehen nicht alle Bindungsplätze zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil des chemagic Prepito<sup>™</sup> ist, dass die Magnetpartikel während der Binde- und Waschschriffe in neue Kavitäten überführt werden. Dies verhindert, dass Flüssigkeitsreste eines anderen Puffers im Reaktionsgefäß verbleiben. Dieser Vorteil wird besonders bei dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll deutlich, dass nacheinander in Salzpuffern und salzfreiem Wasser arbeitet. Eine Verschleppung von Salz in die Suspension der Elution würde die Ausbeuten dieses Protokolls stark reduzieren. Somit bietet der chemagic Prepito<sup>™</sup> eine gut geeignete Möglichkeit das Verfahren der *in vivo* RNA Markierung und Separation automatisiert im Hochdurchsatz durchführen zu können.

### **3.8. Weiterführende Charakterisierung und Optimierung der Separation DIG markierter RNA**

Die Separation von Digoxigenin markierter RNA mittels M-PVA SAV2 Magnetpartikeln (Protokoll siehe Kapitel 3.3.1) konnte sehr effizient, mit Ausbeuten von über 90% und mit ausreichender Spezifität von über 99,9% durchgeführt werden. Um diese Ergebnisse weiter zu optimieren, wurden die Partikeleigenschaften näher analysiert und viele unterschiedliche Protokollvariationen und Sorbentien untersucht. Im nachfolgenden Kapitel werden die eingesetzten M-PVA SAV2 Partikel

physikalisch charakterisiert und die erfolgreichen Optimierungen der Magnetseparationen dargestellt. Um die Vergleichbarkeit der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Separationen mit DIG markierter RNA aus dem gleichen *in vivo* Markierungsansatz (DIG-11-UTP-Einbaurrate: 1%) durchgeführt. Außerdem wurde allen Ansätze nicht markierter *tuf* DNA zudotiert. Durch die Analyse der Chemilumineszenz im Dot-Blot konnten die Effizienz, durch die  $\Delta C_t$  Werte der qPCR die Spezifität der Separation, untersucht werden.

### 3.8.1. Charakterisierung der magnetischen Trägermaterialien

Eine Charakterisierung der physikalischen Eigenschaften der verwendeten Magnetpartikel sollte dazu genutzt werden, den Mechanismus der unspezifischen Bindung nicht markierter Nukleinsäuren besser zu verstehen. Als Charakteristika wurden die mittlere Größe und die Oberflächenladung der Partikel herangezogen. Die Größe der Partikel konnte den Herstellerangaben entnommen werden. Die Oberflächenladung dagegen wurde als isoelektrischer Punkt (IEP) durch die Messung des Zeta-Potentials der Partikel experimentell bestimmt. Gerade die Oberflächenladung eines Partikels kann als mögliche Erklärung für unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen herangezogen werden.

Die verwendeten M-PVA SAV2 Magnetpartikel basieren auf Polyvinylalkohol Partikeln (M-PVA 012), die mit Streptavidin funktionalisiert wurden. Diese Basis-Partikel weisen einen mittleren Partikeldurchmesser von 2  $\mu\text{m}$  und einen IEP von 2,5 auf. Nach der Funktionalisierung mit dem Protein Streptavidin, das einen stärker basischen IEP von ca. 6,3 aufweist (Sivasankar *et al.* 2005), kommt es zu einer Erhöhung des isoelektrischen Punktes der Magnetpartikel. Die M-PVA SAV2 Partikel weisen, bei einem mittleren Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  einen IEP von 3,3 auf. Zusätzlich wurde auch der IEP der mit Antikörpern sekundärfunktionalisierten M-PVA SAV2 Magnetpartikel untersucht. Dieser lag nach den Ergebnissen der Zeta-Potential Messung bei 3,4. Die Sekundärfunktionalisierung erhöhte damit den IEP der Partikel nicht signifikant. Die Messungen des Zeta-Potentials der M-PVA SAV2 Partikel legt den Schluss nahe, dass sie bei allen Schritten der Separation negativ geladen vorlagen, da ausschließlich in Puffersystemen mit einem pH-Wert  $\geq 7,0$  gearbeitet wurde.

Die Verwendung von Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten, im sauren- und im neutralen Bereich, während einer Separation DIG markierter RNA bestätigte diese Annahme. So führte eine Separation bei pH 4, also im Bereich des IEP der Partikel, zur vollständigen unspezifischen Bindung der nicht markierten *tuf* DNA Fragmente. Die weniger stark negativ geladene Oberfläche der Partikel ermöglichte diese unspezifische Anlagerung an die Partikeloberfläche. Im Gegensatz dazu wurden die Nucleinsäuren bei hohen pH-Werten (> pH 6) von der negativ geladenen Partikeloberfläche stärker abgestoßen, was die Spezifität der Separation verbesserte. Dies erklärt warum bei einem pH-Werte von 7 nur 0,009% der unmarkierten *tuf* DNA an die Partikel banden (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Einfluss der Oberflächenladung auf die Effizienz und Spezifität der Separation DIG markierter RNA. Ausbeute in % LU in der Elution, Unspezifität in % gebundene *tuf* DNA.

Partikelbezeichnung	IEP	Ausbeute [%]	Unspezifität [%]
M-PVA SAV2 pH 7	3,3	97	0,009
M-PVA SAV2 pH 4	3,3	62	100

Im Gegensatz zu der pH-Wert-abhängigen unspezifischen Bindung von Nucleinsäuren an die Partikeloberfläche, wurde die Antikörper vermittelte Bindung der DIG markierten RNA nicht durch eine negative Oberflächenladung beeinflusst. Dies zeigte sich an den hohen Ausbeuten der Separation bei neutralem pH-Wert (siehe Tabelle 5 pH 7). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Spacer-Wirkung von Streptavidin und biotinyliertem Antikörper sein, die einen gewissen Abstand zwischen RNA und Partikeloberfläche herstellen.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die Oberflächenladung für die Spezifität der Separation von Nucleinsäuren eine wichtige Rolle spielt. Eine negativ geladene Partikeloberfläche kann dabei die unspezifische Anlagerung nicht markierter Nucleinsäuremoleküle vermindern. Somit kann über den IEP abgeschätzt werden, ob die Partikel für eine spezifische Separation bei einem bestimmten pH-Wert geeignet sind.

### 3.8.2. Optimierung der Pufferzusammensetzung

Mit dem Ziel, die unspezifischen Wechselwirkungen der Partikel mit nicht markierten Nukleinsäuren noch weiter zu minimieren, wurden verschiedene Modifikationen des entwickelten Standardprotokolls mittels Dot-Blot und qPCR untersucht. Die Werte für Spezifität und Ausbeute dieser optimierten DIG-RNA Separationen sind in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 6: Verbesserung der Spezifität und der Ausbeute der DIG-RNA Separation. Ausbeute in % LU in der Elution, Unspezifität in % gebundene *tuf* DNA.

Modifikation	Ausbeute [%]	Unspezifität [%]
Standardprotokoll in 0,5x SSC	97	0,009
EDTA gewaschen	94	0,001
Lachs Sperma DNA	89	0,005
2x Separation	31	0,008

Unspezifische Wechselwirkungen von Nukleinsäuren mit der Partikeloberfläche können beispielsweise durch nicht abreagierte, aktivierte Carboxyl-Gruppen oder polyvalente Kationen vermittelt werden. Das Waschen in EDTA entfernt dabei polyvalente Kationen von der Partikeloberfläche, die während der Herstellung der Magnetpartikel benötigt werden. Diese Kationen können die negativ geladenen Nukleinsäuren elektrostatisch binden und die Spezifität der Separation vermindern. Der Einsatz von EDTA gewaschenen Partikeln, die von der chemagen Biopolymer Technologie AG zur Verfügung gestellt wurden, führte zu einer effizienten Separation mit 94% Ausbeute. Darüberhinaus konnte die Spezifität mit diesen Partikeln nochmals um den Faktor 9 auf nur 0,001% Bindung unmarkierter Nukleinsäuren gesteigert werden. Im Gegensatz dazu hatte ein Quenchen der Carboxyl-Gruppen mit 50 mM Tris-HCl (Szajani *et al.* 1991) keinen Effekt auf die Effizienz und die Spezifität der Separation.

Neben solchen Vorbehandlungen der Partikel wurden auch unterschiedliche Ab-sättigungs-Nukleinsäuren nach Kishore *et al.* (2006) eingesetzt, um die unspezifischen Wechselwirkungen zu minimieren. Dabei sollten diese Hintergrundnuk-

leinsäuren die unspezifischen Bindungsregionen auf der Partikeloberfläche besetzen. Der Einsatz von 15 µg Lachs-Sperma DNA lieferte dabei die besten Ergebnisse. Bei annähernd konstanter Effizienz der Separation konnte die Spezifität um den Faktor 2 gesteigert werden, da nur 0,005% der gespikten *tuf* DNA unspezifisch gebunden wurden.

Als weitere Alternative zur Verbesserung der Separationsspezifität wurde eine wiederholte Separation der isolierten DIG markierten RNA aus der Elutionsfraktion heraus untersucht. Mit dieser Maßnahme konnte die Spezifität zwar geringfügig gesteigert werden, jedoch führte die Doppel-Separation zu einer um 60% reduzierten Ausbeute. Somit ist eine solche Separationsstrategie für eine gleichermaßen effiziente wie auch spezifische Abtrennung der DIG markierten RNA ungeeignet.

Auch eine Variation des Salzgehalts der eingesetzten Puffer konnte die Effizienz der DIG-RNA Separation nicht verbessern, obwohl er die Löslichkeit von Nucleinsäuren in wässrigen Lösungen verändert (Flock *et al.* 1996). Genauso wenig konnte der Einsatz von Detergenzien wie Tween 20 die Leistung der Separation verbessern. Tween 20 wurde eingesetzt, da es bei immunologischen Nachweismethoden häufig zu Verminderung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Festphase verwendet wird (Kenna *et al.* 1985).

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass ein Waschen der Partikel mit EDTA und ein Blocking mit Lachs-Sperma DNA effiziente Wege darstellen, um die unspezifischen Interaktionen zwischen nicht markierten Nucleinsäuren und funktionalisierten Magnetpartikeln weiter zu reduzieren.

### **3.8.3. Alternative Sorbentien**

Neben der Optimierung der während der Separation eingesetzten Puffer wurden auch alternative Sorbentien verwendet. Die Firma chemagen Biopolymer Technologie AG stellte hierzu verschiedene Magnetpartikel zur Verfügung. Darüberhinaus wurden auch kommerziell erhältliche, streptavidinfunktionalisierte Sorbentien eingesetzt.

Eine Übersicht aller eingesetzten Sorbentien ist in Tabelle 7 angegeben. Neben den relevanten Charakteristika der Partikel sind in dieser Tabelle auch die Aus-

beuten und Unspezifitäten der jeweiligen Separationsexperimente aufgeführt. Die Ausbeute ist hierbei ein Maß für die Effizienz der Separation und der prozentuale Anteil an isolierten unmarkierten Nukleinsäuren zeigt die Spezifität der Separation an.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Partikel wiesen dabei einen IEP kleiner als 4,3 auf, so dass sie alle für eine Separation bei pH 7 geeignet erschienen. Die Separationsergebnisse haben aber gezeigt, dass die unspezifische Bindung nicht alleine mit der Oberflächenladung der verwendeten Partikel erklärt werden konnte.

---

Index Seite 110, Tabelle 7:

- \*1 Kapazität in  $\mu\text{g}$  biotinylierter Antikörper / mg Partikel
- \*2 E1: Elution in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  bei  $95^\circ\text{C}$
- \*2 E2: Elution in 0,5x SSC Puffer, pH 11 bei  $95^\circ\text{C}$
- \*3 Ausbeute in % LU in der Elution
- \*4 Unspezifität in % gebundene tuf DNA in der Elution
- \*5 M-PVA SAV Partikel: Funktionalisierung über Carboxylgruppe
- \*6 n.u.: nicht untersucht
- \*7 Hydrophobisierte Partikel: Funktionalisierung über Carboxylgruppe

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sorbentien ihre physikalischen Eigenschaften und ihre Leistung in Separationsexperimenten.

Partikelbezeichnung	Größe [µm]	IEP	Kapazität* <sup>1</sup> [µg/mg]	Elution* <sup>2</sup>	Ausbeute* <sup>3</sup> [%]	Unspezifität* <sup>4</sup> [%]	Bemerkung
M-PVA SAV1* <sup>5</sup>	0,75	2,5	6,4	E1	44	0,336	Kleine M-PVA Partikel
M-PVA SAV2 (EDTA)* <sup>5</sup>	2,0	3,3	4,8	E1	94	0,001	Standardpartikel EDTA gewaschen
M-PVA SAV3* <sup>5</sup>	6,0	4,0	4,0	E1	74	0,223	Große M-PVA Partikel
M-PVA-(NCO)-SAV2	2,0	3,5	n.u.	E2	94	0,026	Funktionalisierung über Isocyanat
M-PVA-(EPX)-SAV2	2,0	3,7	n.u.	E2	95	0,391	Funktionalisierung über Epoxid
M-PVA SAV 2-AGE-Butyl* <sup>7</sup>	2,0	3,2	n.u.	E2	62	2,000	Hydrophobisierte Oberfläche
M-PVA SAV 2-NH2-Acryl* <sup>7</sup>	2,0	3,2	n.u.	E2	93	0,700	Hydrophobisierte Oberfläche
M-PVA 10 AK	2,0	2,6	n.u.	E1	93	0,108	Antikörperfunktionalisiert
M-PVA 9 AK	2,0	4,0	n.u.	E2	83	0,001	Antikörperfunktionalisiert
DynaBead M-270	2,8	4,3	7,5	E2	89	0,136	Carbonsäureaktiviertes Polystyrol
DynaBead M-280	2,8	3,6	7,5	E2	93	0,302	Tosylaktiviertes Polystyrol
DynaBead MyOne C1	1,0	4,2	25	E1, E2	36; 42	0,039; 0,027	Carbonsäureaktiviertes Polystyrol
DynaBead MyOne T1	1,0	3,6	20	E2	63	0,081	Tosylaktiviertes Polystyrol
Streptavidin Agarose	> 40	n.u.	1,6	E1, E2	33; 30	0,377; 0,974	Nicht magnetisches Sorbent

### Separation mit M-PVA SAV Magnetpartikeln unterschiedlicher Größe

Die Magnetpartikel M-PVA SAV1 und SAV3 unterscheiden sich in ihrer Größe von den bisher eingesetzten Partikeln. In Separationsexperimenten erbrachten diese Partikel weder eine Verbesserung der Effizienz noch der Spezifität (Tabelle 7). Die geringere Spezifität dieser Partikel kann nicht über den IEP erklärt werden, da ihre Oberfläche stärker negativ geladen war als die der SAV2 Partikel. Eine Erklärung wäre die sekundäre Anlagerung von unmarkierten Nukleinsäuren an die partikelgebundene DIG-RNA. Die für die SAV3 Partikel gemessenen verminderten Spezifitäten stehen eventuell mit einer geringeren Funktionalisierungsdichte dieser Partikel im Zusammenhang, da hierdurch größere Räume zwischen den Bindungsstellen existieren, die eine unspezifische Anlagerung von Nukleinsäuren fördern. Genauso fördert die geringere Oberflächenladung dieser Partikel ihre Unspezifität. Die verminderte Ausbeute der Versuche unter Verwendung von M-PVA SAV3 Partikel könnte zudem mit einer größenbedingten schlechteren Dispergierbarkeit dieser Partikel begründet werden.

### Variationen der Streptavidin Kopplung an die Magnetpartikel

Weitere streptavidinfunktionalisierte M-PVA Partikel der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG unterschieden sich in den chemischen Gruppen, über die die Funktionalisierung an die Partikel gebunden wurde. Bei diesen reaktiven chemischen Gruppen handelte es sich um Isocyanat (NCO) und Epoxid. Die resultierenden Partikel M-PVA-(NCO)-SAV2 und M-PVA-(EPX)-SAV2 wurden auf ihre Leistungsfähigkeit hin untersucht. Diese Sorbentien erbrachten die gleiche Effizienz wie die Standardpartikel, jedoch eine Verschlechterung der Spezifität. (siehe Tabelle 7). Die Verschlechterung der Spezifität kann durch eine unspezifische Bindung der RNA an die neuen reaktiven Gruppen erklärt werden. So können ungebundene Isocyanatgruppen auf der Partikeloberfläche beispielsweise mit Hydroxylgruppen reagieren und Epoxidgruppen mit Aminverbindungen der DNA. Bei der Untersuchung dieser Partikel wurde ferner festgestellt, dass eine Elution der gebundenen DIG markierten RNA in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C nicht möglich war. Nur durch die Verwendung eines 0,5x SSC Puffers mit pH 11 bei 95°C konnte eine Elution der markierten RNA erreicht werden.

### Hydrophobisierte M-PVA SAV2 Partikel

Aufgrund des beobachteten Einflusses der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel auf die Separationsleistung wurden unterschiedliche hydrophobe Gruppen kovalent an die hydrophile Partikeloberfläche gebunden, da DNA nur schlecht an hydrophobe Oberflächen bindet (Nielsen *et al.* 2005). Diese Partikel wurden wiederum von der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG auf Basis der M-PVA 012 Partikel hergestellt. Als hydrophobe Reste wurden Allyl-Glycidyl-Ether mit Cyclohexyl-Gruppe, Allyl-Glycidyl-Ether mit Butyl-Gruppe, Tosyl-Gruppen, Allyl-Glycidyl-Gruppen und eine Amino-Funktion mit Acryl-Gruppe eingesetzt (Reihenfolge nach abnehmender Hydrophobizität). Jedoch erbrachte keine dieser Modifikationen eine Verbesserung der Separationsleistung, sondern ausschließlich Verschlechterungen. In Tabelle 7 sind zwei Beispiele dieser Partikel aufgeführt. Die Ausbeuten schwankten zwischen 62% (M-PVA SAV 2-AGE-Butyl Partikel) bei 2% Unspezifität und 93% (M-PVA SAV 2-NH<sub>2</sub>-Acryl Partikel) bei 0,7% Unspezifität. Eine Korrelation der Separationsleistung mit der Hydrophobizität der Partikel konnte dabei nicht festgestellt werden. Somit scheint die Spezifität von der individuellen Struktur der hydrophoben Funktionalisierung abzuhängen, die mit keinen der hier verwendeten generellen Parameter korreliert.

### M-PVA Magnetpartikel mit Anti-DIG Antikörper Funktionalisierung

Eine weitere Modifikationsstufe waren von der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG mit Anti-DIG Antikörper funktionalisierte Magnetpartikel. Diese basierten auf den M-PVA SAV2 Partikeln, an die die Anti-DIG Antikörper über einen sekundären biotinylierten Antikörper gebunden wurden. Die M-PVA 10 AK und die M-PVA 9 AK Partikel unterscheiden sich in ihrer Antikörper-Beladungsdichte voneinander. Laut Hersteller wiesen die M-PVA 9 AK Partikel eine um den Faktor fünf höhere Beladung mit Antikörpern auf.

Die Separation zeigte, dass eine Elution der markierten RNA von M-PVA 10 AK Partikeln in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C möglich war, wohingegen bei den M-PVA 9 AK Partikeln 0,5x SSC Puffer mit pH 11 bei 95°C verwendet werden musste. Eine Erklärung für dieses Elutionsverhalten könnte in einer, durch die höhere Antikörperbeladung vermittelten, stärkeren Bindung der DIG-RNA an die M-PVA 9 AK Partikel liegen. Die Ausbeuten der Separationen unterschieden sich mit 93% (M-

PVA 10 AK) bzw. 83% (M-PVA 9 AK) weniger stark voneinander, als die Spezifitäten dieser Partikel. Mit den M-PVA 10 AK Partikeln wurden 0,108%, mit den M-PVA 9 AK Partikeln dagegen nur 0,001% der unmarkierten Nukleinsäuren in der Elution separiert (siehe Tabelle 7). Diese Spezifität der M-PVA 9 AK Partikel liegt auf einem genauso hohen Niveau, wie diejenige der EDTA gewaschenen M-PVA SAV2 Partikel. Bei den antikörperfunktionalisierten Partikeln lag aber die Effizienz der Separation um 11% niedriger als bei den EDTA gewaschenen Standardpartikeln. Ein Vorteil der Verwendung antikörperfunktionalisierter Partikel wäre dagegen die Verkürzung des Separationsprotokolls.

#### Hypothese zur unspezifischen Bindung unmarkierter Nukleinsäuren

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse konnte die folgende Hypothese aufgestellt werden: Die unspezifische Bindung unmarkierter Nukleinsäuren wird durch deren direkte Anlagerung an die Partikeloberfläche vermittelt. Dies konnte durch die Wirksamkeit einer Blockierung der Oberfläche mittels Lachs-Sperma DNA oder das Waschen der Partikel mit EDTA gezeigt werden. Eine Bestätigung findet diese Hypothese bei der Betrachtung von M-PVA Partikeln mit unterschiedlichen Antikörperbeladungsdichten. Die M-PVA 9 AK Partikel mit einer fünffach höheren Beladungsdichte weisen dabei eine höhere Spezifität in der Separation auf, als die weniger dicht beladenen M-PVA 10 AK Partikel. Der Grund liegt darin, dass die Oberfläche der M-PVA 9 AK Partikel wegen der höheren Beladungsdichte stärker gegen unspezifische Wechselwirkungen abgeschirmt wird. Damit ist eine hohe Liganden-Beladungsdichte für die Spezifität von magnetpartikelbasierten Separationen essentiell, die ein spezifisches Tag-Ligand System zur Bindung des Zielmoleküls nutzen.

#### Alternative magnetische und nicht magnetische streptavidinfunktionalisierte Sorbentien

Um die generelle Anwendbarkeit der entwickelten Methode zu demonstrieren, wurden weitere magnetische und nicht magnetische Sorbentien anderer Hersteller untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen verglichen. Die vier untersuchten DynaBead Magnetpartikel der Firma Invitrogen lieferten ähnliche Ausbeuten an DIG-RNA, wobei die höchsten Ausbeuten mit 93% mit den 2,8 µm großen Po-

lystyren DynaBead M-280 Partikeln erreicht wurden. Die detektierte Spezifität war mit 0,30% an unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren jedoch deutlich geringer. Die höchste Spezifität lieferten die 1 µm großen Polystyrenpartikel DynaBead MyOne C1 mit durchschnittlich 0,03% Unspezifität bei einer Ausbeute von 77%. Eine Elution der DIG-RNA von diesen Partikeln war vollständig nur in 0,5x SSC Puffer bei pH 11 und 95°C möglich (siehe Tabelle 7).

Ebenfalls war die Separation von DIG markierter RNA mittels streptavidinfunktionalisierter Agarose der Firma Novagen (Madison, USA) als nicht magnetischem Sorbent möglich. In den beiden Elutionsschritten in DEPC-H<sub>2</sub>O und 0,5x SSC Puffer bei pH 11 bei je 95°C konnten in der Summe 63% der Ziel-RNA mit einer durchschnittlichen Unspezifität von 0,68% separiert werden (siehe Tabelle 7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das entwickelte Verfahren sowohl mit magnetischen als auch mit nicht magnetischen Sorbentien durchgeführt werden kann. Dabei konnten mit den optimierten „chemagen Partikeln“ die besten Ausbeuten und Spezifitäten erzielt werden. Generell sind ähnliche Ausbeuten und Spezifitäten nach entsprechender Optimierung auch für andere Sorbentien denkbar.

#### Partikelauswahl für die Kommerzialisierung

Für eine Kommerzialisierung des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens bieten sich somit die mit Absättigungs-DNA geblockten M-PVA SAV2 Partikel, die EDTA gewaschenen M-PVA SAV2 Partikel oder die direkt antikörperfunktionalisierten M-PVA 9 AK Partikel an. Mit diesen drei Partikelarten waren Separationen mit zufriedenstellenden Ausbeuten an DIG markierter RNA und einer hohen Spezifität möglich. Eine betriebswirtschaftliche Betrachtung der Produktions- und Materialkosten wäre nötig, um eine abschließende Auswahl der bei einer Kommerzialisierung einzusetzenden Partikel zu treffen.

### 3.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse haben in ihrer Summe das Folgende gezeigt:

- Eine *in vivo* Markierung mit DIG-11-UTP ist für eine große Bandbreite an Bakterien möglich, die Einbauraten liegen zwischen 1% und 10%.
- Die Markierung kann sowohl für planktonische als auch für sessile Bakterien ohne Manipulation der Population durchgeführt werden.
- Eine Separation der DIG markierten RNA mittels M-PVA SAV2 Magnetpartikeln ist mit hohen Ausbeuten über 90% und hoher Spezifität mit über 99,9% durchführbar.
- Mit DIG markierter RNA können Taxonomieanalysen, fokussiert auf die aktiven Bakterien in einem Habitat, durchgeführt werden.
- Die Messung der bakteriellen Genexpression ist mit *in vivo* markierter RNA direkt aus dem Eluat der Separation durchführbar.
- Eine Umsetzung der identischen Separation im Hochdurchsatz mittels des chemagic Prepito™ war möglich.
- Die Sorbentien M-PVA SAV2 EDTA gewaschen, M-PVA SAV2 Lachs-Sperma geblockt und M-PVA 9 AK lieferten die besten Separationsergebnisse. Mit ihnen ist eine Steigerung der Spezifität auf 99,999% bei einer Effizienz von über 90% möglich.

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zeigt einen Weg auf, wie nur die neu synthetisierte (*in vivo* markierte) RNA als Ausgangspunkt für nachgeschaltete Analysemethoden verwendet werden kann. Damit liegt das Augenmerk der Forschung auf dem Transkriptom des untersuchten Habitats. Dabei werden nur die exprimierten Gene derjenigen Bakterien betrachtet, die aktiv zum Verhalten der Population beitragen. Damit schließt die in dieser Arbeit entwickelte Methode die Lücke zwischen der Analyse der Zusammensetzung einer Bakterienpopulation und ihrer funktionalen Aktivität. DIG markierte RNA konnte sowohl zur taxonomischen Untersuchung (Kapitel 3.5) als auch zur Analyse der Expression funktioneller Gene (Kapitel 3.6.2) genutzt werden.

Andere Methoden, die ebenfalls eine Analyse der Genexpression von natürlichen Bakterienpopulationen zum Ziel haben, sind dagegen auf ausgewählte Gene, Gengruppen oder Organismengruppen festgelegt (Sharkey *et al.* 2004). Außer-

dem nutzt kein bekanntes Verfahren zur Untersuchung des Transkriptom von Bakterien Populationen unbekannter Zusammensetzung eine *in vivo* Markierung der neu synthetisierten RNA. Eine alternative Technik der Transkriptomuntersuchung isoliert die mRNA einer bakteriellen Population aus einer Gesamt-RNA durch Größenausschluss in einem Agarosegel. Die mRNA wird aus den Regionen des Agarosegels isoliert, die zwischen den drei distinkten Banden der 5S-, 16S- und 23S rRNA liegen (McGrath *et al.* 2008). Diese Methode weist jedoch den Nachteil auf, dass Transkripte, die eine ähnliche Größe wie die rRNA Moleküle haben, ausgeschlossen werden, und dass Selektion oder Verlust von mRNA Molekülen schwierig zu quantifizieren sind. Im Gegensatz dazu macht die *in vivo* Markierung und Separation das Transkriptom der gesamten Population für Expressionsstudien zugänglich. Es nutzt die Markierung der *de novo* synthetisierten RNA für dessen Separation, wobei eine zusätzliche Abtrennung der rRNA Moleküle für eine Analyse der Genexpression aus der mRNA Fraktion nicht notwendig ist. Außerdem erlaubt die Separation der DIG markierten RNA mittels Magnetpartikeln eine Abschätzung der Ausbeuten, Verluste und Bindekapazitäten.

Die *in vivo* Markierung und Separation der DIG-RNA führt außerdem zu einer weiteren Aufreinigung der RNA, da Kontaminationen aus der partikelgebundenen RNA ausgewaschen werden. Dies ist besonders für natürliche Proben nützlich, da beispielsweise Oberflächengewässer Huminsäuren, phenolische Verbindungen oder Schwermetalle enthalten können, die eine nachfolgende PCR inhibieren würden (Park *et al.* 2007). Ein weiterer Vorteil des vorgestellten Verfahrens liegt darin, dass die neu synthetisierte RNA ohne PCR Amplifikation oder sequenzspezifische Capture-Separation isoliert werden kann. Damit kann sichergestellt werden, dass alle markierten RNA Moleküle sequenzunabhängig separiert werden. Durch eine Klonierung der markierten und revers transkribierten Ribonukleinsäuren wäre eine spätere Analyse aller isolierten RNA Moleküle möglich. Durch die Sequenzunabhängigkeit der *in vivo* Markierung und Separation können also alle DIG markierten RNA Moleküle isoliert werden ohne RNA einer bestimmten Spezies wegen ihrer Sequenz auszuschließen. Ein solcher sequenzbedingter Ausschluss von bestimmten Spezies wurde mit den Ergebnissen der Capture-Separation dargelegt. Die Spezifität der Sonden führte nämlich dazu, dass nur 20% der enthaltenen Spezies erfasst werden konnten.

#### 4.       **Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Verfahren entwickelt werden, dass die Erforschung der Zusammensetzung, Aktivität und Funktionalität von natürlichen bakteriellen Populationen erleichtert. Diese Zielsetzung konnte durch die *in vivo* Markierung bakterieller RNA mit Digoxigenin und deren spezifischer Separation erreicht werden. Sie erlaubt eine parallele Analyse der bakteriellen Genexpression und der Taxonomie. Gleichzeitig ist der Einbau von DIG-11-UTP in die RNA ein Marker für die physiologische Aktivität der analysierten Bakterien. Damit können mit dieser Methode Transkriptomdaten der aktiven Bakterien einer Population erhoben werden.

Alle vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass das entwickelte Verfahren der *in vivo* RNA Markierung und Separation, RNA natürlicher Populationen zugänglich macht. Für die nachgeschalteten Analysen ist es wichtig, DIG-RNA Komponenten einsetzen zu können, die Spezies- und Sequenz-unabhängige Informationen zur Taxonomie und Funktionalität liefern. Dabei kann auf bisher vielfach verwendete Hybridisierungsreaktionen verzichtet werden, die oftmals für das Design der methodischen Nachweisverfahren eine Vorauswahl von Zielsequenzen benötigen.

Ein Weg, die isolierte DIG-RNA unabhängig von ihrer Sequenz zu amplifizieren, ist die Ligation von definierten Adaptersequenzen. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein aktiviertes Oligonukleotid mit einer PolyA Sequenz an das 3'-Ende von RNA Molekülen mittels der T4-Ligase gebunden werden konnte. In einer reversen Transkription mit einem PolyT Primer konnte es somit in cDNA mit nun bekanntem 5'-Ende umgeschrieben werden. Die Ligation eines zweiten aktivierten Oligonukleotids bekannter Sequenz an das 3'-Ende der cDNA lieferte dann ein von kurzen, bekannten Sequenzen flankiertes cDNA Molekül. Diese flankierte cDNA konnte in einer PCR amplifiziert werden, da durch die Adapter sowohl die Sequenz für den Vorwärts-, als auch für den Rückwärtsprimer, bekannt war. Auf diese Weise können alle DIG markierten RNA Moleküle, unabhängig von ihrer Sequenz, in einer PCR amplifiziert werden, da die Primer-Bindungsstellen die kodierenden Sequenzen an ihren Rändern flankieren. Ferner würden diese Adapter der flankierten DNA das Klonieren dieser Fragmente in

eine Gen-Bibliothek ermöglichen. Eine Variation dieser Methode könnte genutzt werden, ausschließlich die markierte mRNA zu amplifizieren. Hierzu müsste in der PCR der cDNA ein zur Shine-Dalgarno-Sequenz komplementärer Vorwärtsprimer eingesetzt werden. Die ausschließliche Amplifikation der mRNA kann dadurch gewährleistet werden, dass diese im Gegensatz zu rRNA und tRNA, über eine Shine-Dalgarno Ribosomen-Bindestelle verfügen.

Ein weiteres vorstellbares Einsatzgebiet der *in vivo* Markierung von natürlichen Bio-filmen liegt darin, die Genexpression in einem Biofilm räumlich zu lokalisieren. Die Aktivität der Bakterien ist nämlich nicht homogen in einem Biofilm verteilt, sondern hat Schwerpunkte in bestimmten Regionen des Biofilms. Bei Analysemethoden, die die Bakterien von ihrer Aufwuchsoberfläche entfernen, wird jedoch immer eine homogene Expressionsverteilung im Biofilm angenommen. Diese Analysen nutzen lediglich Durchschnittswerte, als so genannte Konzentrationsparameter (Lenz et al. 2008). Ein Auffinden der Expressionsaktivität wäre durch die Lokalisierung des eingebauten Nukleotidanalogs möglich. Der Einbau von DIG-11-UTP in die neu synthetisierte RNA, die eine Genexpression anzeigt, könnte über eine antikörpervermittelte Detektion in Gefrierschnitten untersucht werden. Alternativ dazu wäre auch der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem UTP denkbar, der eine direkte Detektion der Genexpression erlauben würde. Die Auswertung eines solchen molekularen Bildgebungsverfahrens könnte mikroskopisch erfolgen. Durch den Einsatz des in dieser Doktorarbeit entwickelten Verfahrens als Markertechnik für Aktivitäten in Biofilmen könnten tiefere Erkenntnisse über das Zusammenspiel der Bakterien in einem Biofilm und der Aufwuchsoberfläche gewonnen werden.

Die Fraktionierung der DIG markierten RNA und damit der aktiv exprimierten Gene bietet auch im Hinblick auf eine Transkriptomanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung große Vorteile. Diese liegen zum einen in der Reduktion der Probenzahl, wenn ausschließlich hochregulierte Gene gesucht und untersucht werden sollen. Schließlich wird DIG-11-UTP nur in exprimierte mRNA eingebaut. Nicht stark exprimierte Gene werden dagegen in einer solchen Sequenzierung statistisch reduziert erfasst.

Liegt das Interesse der Transkriptomanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung dagegen auf der Erforschung regulatorischer Netzwerke in Biofilmen, bietet

die mar-kierte RNA einen anderen Vorteil. So erlaubt ein Vergleich von Sequenzdaten der DNA, der Gesamt-RNA und der DIG markierten RNA Aussagen darüber, welche Gene bei bestimmten exogenen Einflüssen herauf- oder herunter reguliert werden. So repräsentieren die Sequenzen aus einer DNA Untersuchung alle Gene, die in der untersuchten Population vorhanden sind, die Gesamt-RNA Daten zeigen dagegen alle exprimierten Gene. Die Daten der DIG markierten RNA lassen darüberhinaus Rückschlüsse auf eine spezifische Induktion oder eine Stabilisierung von RNA Molekülen zu. Singh et al. (2009) zeigten, dass Stress relevante mRNA Moleküle vor einen intrazellulären Abbau durch das sogenannte RNA Degradosom geschützt vorliegen und damit eine höhere Halbwertszeit besitzen als Stress unabhängig regulierte Genprodukte.

In Kombination mit einer sequenzunabhängigen Amplifikation von Nukleinsäuren, kann eine solche Methode zur Aufklärung regulatorischer Netzwerke bakterieller Populationen unbekannter Zusammensetzung eingesetzt werden. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber Mikroarray Untersuchungen, die dies ausschließlich für bekannte Gene oder Spezies leisten können. Die Nutzung der RNA Markierung und Separation könnte demnach ein tieferes Verständnis, gerade von bakteriellen Stressantworten in natürlichen Biofilmen, erbringen. Führen doch diese Stressantworten zu einer erhöhten Stabilität der Biofilme gegenüber Desinfektion, Hitze oder Antibiotikabehandlung, was manipulative Maßnahmen dämpfen, verändern oder aufheben kann.

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren ermöglicht Wissenschaftlern der mikrobiellen Ökologie und Biotechnologie damit neue Einblicke in Bakterienverbände *in situ*.

Im Hinblick auf die Anwendbarkeit sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden, für welche weiteren Habitate diese Methode anwendbar ist. Außerdem sollten Populationsanalysen durchgeführt werden, die nicht nur Eubakterien erfassen, sondern auch solche aus anderen biologischen Reichen, wie dem der Archea. Diese Untersuchungen könnten zeigen, ob DIG-11-UTP auch in die RNA nicht eubakterieller Spezies eingebaut wird.

Das entwickelte Verfahren soll in Zukunft für die Biofilmforschung am IFG eingesetzt werden. Hierbei steht die Analyse der bakteriellen Stressantworten im Vordergrund, da diese Biofilmbakterien äußerst widerstandsfähig werden lassen

und eine Manipulation von Biofilmen erschweren. Dabei sollen nicht Biofilme bekannter Modellorganismen betrachtet werden, sondern natürliche Populationen unbekannter Zusammensetzung. Darüberhinaus soll das entwickelte Verfahren dazu genutzt werden, die Reaktion von Biofilmbakterien auf modifizierten und funktionalisierten Oberflächen zu testen.

## 5. Literatur

1. Adachi, M., Yamazaki, M., Harada, M., Shioi, A., and Katch, S., Bioaffinity separation of trypsin using trypsin inhibitor immobilized in reverse micelles composed of a nonionic surfactant. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997. 53(4): p. 406-408.
2. Adamczyk, J., Hesselsoe, M., Iversen, N., Horn, M., Lehner, A., Nielsen, P.H., Schloter, M., Roslev, P., and Wagner, M., The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. 69(11): p. 6875-6887.
3. Aglietta, M., Defelice, L., Stacchini, A., Petti, M.C., Bianchi, A.C.M., Spiriti, M.A.A., Sanavio, F., Apra, F., Piacibello, W., Stern, A.C., et al., In vivo Effect of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor on the Kinetics of Human Acute Myeloid-Leukemia Cells. *Leukemia*, 1991. 5(11): p. 979-984.
4. Archer, M.J., Lin, B.C., Wang, Z., and Stenger, D.A., Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA. *Analytical Biochemistry*, 2006. 355(2): p. 285-297.
5. Arthur, M., Reynolds, P.E., Depardieu, F., Evers, S., Dutka-Malen, S., Quintiliani, J., R., and Courvalin, P., Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Journal of Infection*, 1996. 32(1): p. 11-16.
6. Asakawa, S. and Kimura, M., Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. *Soil Biology and Biochemistry* Special Section: Functional Microbial Ecology: Molecular Approaches to Microbial Ecology and Microbial Habitats, 18th World Congress of Soil Science, 2008. 40(6): p. 1322-1329.
7. Bach, H.-J., Hartmann, A., Trevors, J.T., and Munch, J.C., Magnetic capture-hybridization method for purification and probing of mRNA for neutral protease of *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiological Methods*, 1999. 37(2): p. 187-192.
8. Baracchini, E. and Bremer, H., Determination of synthesis rate and lifetime of bacterial mRNAs. *Analytical Biochemistry*, 1987. 167(2): p. 245-260.
9. Bayer, E.A., Wilchek, M., and Skutelsky, E., Affinity Cytochemistry - Localization of Lectin and Antibody Receptors on Erythrocytes Via Avidin-Biotin Complex. *Febs Letters*, 1976. 68(2): p. 240-244.
10. Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.K., Hochedlinger, G., Hodl, I., Baranyi, C., and Battin, T.J., Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. 73(15): p. 4966-4974.
11. Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., ColladoVides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al., The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997. 277(5331): p. 1453-1454.
12. Bozhinova, D., Galunsky, B., Yueping, G., Franzreb, M., Koster, R., and Kasche, V., Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobi-

lised biocatalysts for selective and stereoselective transformations. *Biotechnology Letters*, 2004. 26(4): p. 343-350.

13. Bozhinova, D.P., Synthesis modification and characterisation of magnetic micromatrices for covalent immobilisation of biomolecules Model investigations with penicillin amidase from *E. coli*. 2004: Regensburg.

14. Breadmore, M.C., Wolfe, K.A., Arcibal, I.G., Leung, W.K., Dickson, D., Giordano, B.C., Power, M.E., Ferrance, J.P., Feldman, S.H., Norris, P.M., et al., Microchip-based purification of DNA from biological samples. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(8): p. 1880-1886.

15. Bremer, H. and Yuan, D., Uridine transport and incorporation into nucleic acids in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1968. 169(1): p. 21-34.

16. Chen, D.-H. and He, X.-R., Synthesis of nickel ferrite nanoparticles by sol-gel method. *Materials Research Bulletin*, 2001. 36(7-8): p. 1369-1377.

17. Cleary, M.D., Meiring, C.D., Jan, E., Guymon, R., and Boothroyd, J.C., Biosynthetic labeling of RNA with uracil phosphoribosyltransferase allows cell-specific microarray analysis of mRNA synthesis and decay. *Nature Biotechnology*, 2005. 23(2): p. 232-237.

18. Cooksey, K.E. and Wigglesworthcooksey, B., Adhesion of Bacteria and Diatoms to Surfaces in the Sea - a Review. *Aquatic Microbial Ecology*, 1995. 9(1): p. 87-96.

19. Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J., Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, 1987. 41: p. 435-464.

20. Coutard, F., Lozach, S., Pommepuy, M., and Hervio-Heath, D., Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability. *Appl Environ Microbiol*, 2007. 73(16): p. 5183-9.

21. Curran, S., McKay, J.A., McLeod, H.L., and Murray, G.I., Laser capture microscopy. *Mol Pathol*, 2000. 53(2): p. 64-8.

22. Davies, M.J., Taylor, J.I., Sachsinger, N., and Bruce, I.J., Isolation of Plasmid DNA Using Magnetite as a Solid-Phase Adsorbent. *Analytical Biochemistry*, 1998. 262(1): p. 92-94.

23. De Vero, L. and Giudici, P., Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology Vinegars and Acetic Acid Bacteria* 2005, 2008. 125(1): p. 96-101.

24. de Vet, W.W.J.M., Dinkla, I.J.T., Muyzer, G., Rietveld, L.C., and van Loosdrecht, M.C.M., Molecular characterization of microbial populations in groundwater sources and sand filters for drinking water production. *Water Research*, 2009. 43(1): p. 182-194.

25. Dennis, P., Edwards, E.A., Liss, S.N., and Fulthorpe, R., Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. 69(2): p. 769-778.

26. Dreier, J., Stormer, M., and Kleesiek, K., Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43(9): p. 4551-4557.

27. Elaïssari, A., Rodrigue, M., Meunier, F., and Herve, C., Hydrophilic magnetic latex for nucleic acid extraction, purification and concentration. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2001. 225(1-2): p. 127-133.
28. Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P., and Obst, U., Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research*, 2004. 38(5): p. 1197-1206.
29. Endres, H.N., Johnson, J.A.C., Ross, C.A., Welp, J.K., and Etzel, M.R., Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2003. 37: p. 259-266.
30. England, T.E., Bruce, A.G., and Uhlenbeck, O.C., Specific labeling of 3' termini of RNA with T4 RNA ligase. *Methods Enzymol*, 1980. 65(1): p. 65-74.
31. Flock, S., Labarbe, R., and Houssier, C., Dielectric constant and ionic strength effects on DNA precipitation. *Biophysical Journal*, 1996. 70(3): p. 1456-1465.
32. Franzreb, M. and Wohlgemuth, J., Verfahren zum Abtrennen eines dispergierten oder gelösten Stoffes und Magnetseparator, in Patent DE 10 057 396. 2001: Deutschland.
33. Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G.W., Coleman, M.L., Schuster, S.C., Chisholm, S.W., and DeLong, E.F., Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. 105(10): p. 3805-3810.
34. Fuchs, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., and Amann, R., Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. 64(12): p. 4973-4982.
35. Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P., Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 2005. 13(1): p. 34-40.
36. Gauthier, M. and Blais, B.W., Comparison of different approaches for the incorporation of non-radioactive labels into polymerase chain reaction products. *Biotechnology Letters*, 2003. 25(16): p. 1369-1374.
37. Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., and Ball, A.S., Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. 69(3): p. 1800-1809.
38. Gon, S., Camara, J.E., Klungsoyr, H.K., Crooke, E., Skarstad, K., and Beckwith, J., A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo Journal*, 2006. 25(5): p. 1137-1147.
39. Gupta, V., Cherkassky, A., Chatis, P., Joseph, R., Johnson, A.L., Broadbent, J., Erickson, T., and DiMeo, J., Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Research*, 2003. 31(4): p. e13.
40. Harrison, B. and Zimmerman, S.B., T4 polynucleotide kinase: macromolecular crowding increases the efficiency of reaction at DNA termini. *Anal Biochem*, 1986. 158(2): p. 307-15.

41. Hawkins, T.L., Oconnormorin, T., Roy, A., and Santillan, C., DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase. *Nucleic Acids Research*, 1994. 22(21): p. 4543-4544.
42. Hermanson, G., Mallia, A., and Smith, P., *Inmobilized affinity ligand techniques*. 1992, Academic Press: San Diego.
43. Hilario, E., End labeling procedures. *Molecular Biotechnology*, 2004. 28(1): p. 77-80.
44. Hinton, J.C.D., Hautefort, I., Eriksson, S., Thompson, A., and Rhen, M., Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Current Opinion in Microbiology*, 2004. 7(3): p. 277-282.
45. Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., and Uhlen, M., The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*, 2005. 26(3): p. 501-510.
46. Hurt, R.A., Qiu, X.Y., Wu, L.Y., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., and Zhou, J.H., Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. 67(10): p. 4495-4503.
47. Jackson, C.R., Foreman, C.M., and Sinsabaugh, R.L., Microbial Enzyme-Activities as Indicators of Organic-Matter Processing Rates in a Lake Erie Coastal Wetland. *Freshwater Biology*, 1995. 34(2): p. 329-342.
48. Jacobsen, N., Nielsen, P.S., Jeffares, D.C., Eriksen, J., Ohlsson, H., Arcander, P., and Kauppinen, S., Direct isolation of poly(A)<sup>+</sup> RNA from 4 M guanidine thiocyanate-lysed cell extracts using locked nucleic acid-oligo(T) capture. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(7): p. e64.
49. Jenkinson, H.F. and Lappin-Scott, H.M., Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, 2001. 9(1): p. 9-10.
50. Jungfer, C., Schwartz, T., and Obst, U., UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Research*, 2007. 41(1): p. 188-196.
51. Kenna, J.G., Major, G.N., and Williams, R.S., Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods*, 1985. 85(2): p. 409-19.
52. Kerr, M.A., The structure and function of human IgA. *Biochem J*, 1990. 271(2): p. 285-96.
53. Kishore, R., Hardy, W.R., Anderson, V.J., Sanchez, N.A., and Buoncristiani, M.R., Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot (R) EZ1 and BioRobot (R) M48. *Journal of Forensic Sciences*, 2006. 51(5): p. 1055-1061.
54. Labrou, N. and Clonis, Y.D., The Affinity Technology in Downstream Processing. *Journal of Biotechnology*, 1994. 36(2): p. 95-119.
55. Lagaly, G., Shchulz, O., and Zimehl, R., *Dispersionen und Emulsionen*. Vol. 1. 1997, Kiel: Steinkopff Verlag.
56. Langer, P.R., Waldrop, A.A., and Ward, D.C., Enzymatic-Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides - Novel Nucleic-Acid Affinity Probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1981. 78(11): p. 6633-6637.

57. Larsson, L.I. and Hougaard, D.M., Optimization of Nonradioactive In situ Hybridization - Image-Analysis of Varying Pretreatment, Hybridization and Probe Labeling Conditions. *Histochemistry*, 1990. 93(4): p. 347-354.
58. Lee, D.-Y., Shannon, K., and Beaudette, L.A., Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. 65(3): p. 453-467.
59. Lenz, A.P., Williamson, K.S., Pitts, B., Stewart, P.S., and Franklin, M.J., Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. 74(14): p. 4463-4471.
60. Levison, P.R., Badger, S.E., Dennis, J., Hathi, P., Davies, M.J., Bruce, I.J., and Schimkat, D., Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification. *J Chromatogr A*, 1998. 816(1): p. 107-11.
61. Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M., and Sussman, J.L., 3-Dimensional Structures of Avidin and the Avidin-Biotin Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. 90(11): p. 5076-5080.
62. Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., and Friedrich, M.W., Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2004. 6(1): p. 60-72.
63. Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J., Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLOS Pathogens*, 2009. 5(3): p. e1000354.
64. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z.T., et al., Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors (vol 437, pg 376, 2005). *Nature*, 2006. 441(7089): p. 120-120.
65. McCreery, T., Digoxigenin labeling. *Molecular Biotechnology*, 1997. 7(2): p. 121-124.
66. McGrath, K.C., Thomas-Hall, S.R., Cheng, C.T., Leo, L., Alexa, A., Schmidt, S., and Schenk, P.M., Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 2008. 75(2): p. 172-176.
67. McIlroy, S., Porter, K., Seviour, R.J., and Tillett, D., Simple and Safe Method for Simultaneous Isolation of Microbial RNA and DNA from Problematic Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. 74(21): p. 6806-6807.
68. Meckenstock, R., Steinle, P., van der Meer, J.R., and Snozzi, M., Quantification of bacterial mRNA involved in degradation of 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 from liquid culture and from river sediment by reverse transcriptase PCR (RT/PCR). *FEMS Microbiol Lett*, 1998. 167(2): p. 123-9.
69. Melzak, K.A., Sherwood, C.S., Turner, R.F.B., and Haynes, C.A., Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996. 181(2): p. 635-644.

70. Mohanty, B.K., Maples, V.F., and Kushner, S.R., The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2004. 54(4): p. 905-920.
71. Muller, J.F., Stevens, A.M., Craig, J., and Love, N.G., Transcriptome analysis reveals that multidrug efflux genes are upregulated to protect *Pseudomonas aeruginosa* from pentachlorophenol stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. 73(14): p. 4550-4558.
72. Murakami, K., Ono, T., Viducic, D., Kayama, S., Mori, M., Hirota, K., Nemoto, K., and Miyake, Y., Role for rpoS gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 2005. 242(1): p. 161-167.
73. Muyzer, G., Dewaal, E.C., and Uitterlinden, A.G., Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993. 59(3): p. 695-700.
74. Nielsen, P.S., Ohlsson, H., Alsbo, C., Andersen, M.S., and Kauppinen, S., Expression profiling by oligonucleotide microarrays spotted on coated polymer slides. *Journal of Biotechnology*, 2005. 116(2): p. 125-134.
75. Obst, U., Schwartz, T., and Volkmann, H., Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. *International Journal of Artificial Organs*, 2006. 29(4): p. 387-394.
76. Oster, J., Parker, J., and à Brassard, L., Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2001. 225(1-2): p. 145-150.
77. Pang, X., Zhou, D., Song, Y., Pei, D., Wang, J., Guo, Z., and Yang, R., Bacterial mRNA purification by magnetic capture-hybridization method. *Microbiol Immunol*, 2004. 48(2): p. 91-6.
78. Park, T.G., de Salas, M.F., Bolch, C.J.S., and Hallegraef, G.A., Development of a real-time PCR probe for quantification of the heterotrophic dinoflagellate *Cryptoperidiniopsis brodyi* (dinophyceae) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. 73(8): p. 2552-2560.
79. Parsek, M.R. and Tolker-Nielsen, T., Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Opin Microbiol*, 2008. 11(6): p. 560-6.
80. Paxon, T.L., Powell, P.R., Lee, H.G., Han, K.A., and Ewing, A.G., Microcolumn separation of amine metabolites in the fruit fly. *Analytical Chemistry*, 2005. 77(16): p. 5349-5355.
81. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001. 29(9): p. e45.
82. Pollock, J.D., Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2002. 121(1-2): p. 241-256.
83. Prescott, A.M. and Fricker, C.R., Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water. *Molecular and Cellular Probes*, 1999. 13(4): p. 261-268.
84. Ranki, M., Palva, A., Virtanen, M., Laaksonen, M., and Söderlund, H., Sandwich hybridization as a convenient method for the detection of nucleic acids in crude samples. *Gene*, 1983. 21(1-2): p. 77-85.

85. Rasmussen, T.B. and Givskov, M., Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol*, 2006. 296(2-3): p. 149-61.
86. Rauhut, R. and Klug, G., mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999. 23(3): p. 353-370.
87. Rieder, A., Schwartz, T., Schon-Holz, K., Marten, S.M., Suss, J., Gusbeth, C., Kohnen, W., Swoboda, W., Obst, U., and Frey, W., Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *Journal of Applied Microbiology*, 2008. 105(6): p. 2035-2045.
88. Rosenow, C., Saxena, R.M., Durst, M., and Gingeras, T.R., Prokaryotic RNA preparation methods useful for high density array analysis: comparison of two approaches. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(22): p. E112.
89. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
90. Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E., et al., Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. 69(12): p. 7298-7309.
91. Schmitz, G.G., Walter, T., Seibl, R., and Kessler, C., Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Analytical Biochemistry*, 1991. 192(1): p. 222-231.
92. Schreiber, K., Boes, N., Eschbach, M., Jaensch, L., Wehland, J., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Hentzer, M., and Schobert, M., Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *Journal of Bacteriology*, 2006. 188(2): p. 659-668.
93. Schwartz, T. and Kohnen, W., Antibiotikaresistenzen im Abwasser, Nachweis und Vermeidung der Verbreitung. *GWF Wasser Abwasser*, 2007. 148: p. 886 - 891.
94. Sharkey, F.H., Banat, I.M., and Marchant, R., Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl Environ Microbiol*, 2004. 70(7): p. 3795-806.
95. Singh, D., Chang, S.J., Lin, P.H., Averina, O.V., Kaberdin, V.R., and Lin-Chao, S., Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. 106(3): p. 864-869.
96. Sivasankar, S., Subramaniam, S., and Leckband, D., Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. 95(22): p. 12961-12966.
97. Smith, G.J., Sosnick, T.R., Scherer, N.F., and Pan, T., Efficient fluorescence labeling of a large RNA through oligonucleotide hybridization. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 2005. 11(2): p. 234-239.
98. Song, Y.Z., Hahn, T., Thompson, I.P., Mason, T.J., Preston, G.M., Li, G.H., Paniwnyk, L., and Huang, W.E., Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. *Nucleic Acids Research*, 2007. 35(19): p. e129.
99. Stanley, N.R. and Lazazzera, B.A., Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 2004. 52(4): p. 917-924.

100. Steele, H.L. and Streit, W.R., Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. *Fems Microbiology Letters*, 2005. 247(2): p. 105-111.
101. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W., Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 2002. 56: p. 187-209.
102. Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al., Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000. 406(6799): p. 959-964.
103. Szajani, B., Sudi, P., Klamar, G., Jaszay, Z.M., Petnehazy, I., and Toke, L., Effects of Carbodiimide Structure on the Immobilization of Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991. 30(2): p. 225-231.
104. Tannock, G.W., Munro, K., Bibiloni, R., Simon, M.A., Hargreaves, P., Gopal, P., Harmsen, H., and Welling, G., Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. 70(4): p. 2129-2136.
105. Ugelstad, J., Berge, A., Ellingsen, T., Schmid, R., Nilsen, T.-N., Mørk, P.C., Stenstad, P., Hornes, E., and Olsvik, Ø. Preparation and application of new monosized polymer particles. *Progress in Polymer Science*, 1992. 17(1): p. 87-161.
106. Urbach, E., Vergin, K.L., and Giovannoni, S.J., Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. 65(3): p. 1207-1213.
107. Urich, T., Lanzen, A., Qi, J., Huson, D.H., Schleper, C., and Schuster, S.C., Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. *PLoS ONE*, 2008. 3(6): p. e2527-e2527.
108. Villarino, A., Bouvet, O.M.M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., and Grumont, P.A.D., Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Research in Microbiology*, 2000. 151(9): p. 755-768.
109. Vogelstein, B. and Gillespie, D., Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979. 76(2): p. 615-619.
110. Volkmann, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., and Obst, U., Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J Microbiol Methods*, 2004. 56(2): p. 277-86.
111. Volkmann, H., Schwartz, T., Kirchen, S., Stofer, C., and Obst, U., Evaluation of inhibition and cross-reaction effects on real-time PCR applied to the total DNA of wastewater samples for the quantification of bacterial antibiotic resistance genes and taxon-specific targets. *Molecular and Cellular Probes*, 2007. 21(2): p. 125-133.
112. Weber, T., Schmidt, E., and Scheer, U., Mapping of transcription units on *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes by in situ hybridization with biotin-labeled cDNA probes. *Eur J Cell Biol*, 1989. 50(1): p. 144-53.
113. Wendisch, V.F., Zimmer, D.P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N., and Kustu, S., Isolation of *Escherichia coli* mRNA and Comparison of Expression

Using mRNA and Total RNA on DNA Microarrays. *Analytical Biochemistry*, 2001. 290(2): p. 205-213.

114. Wilchek, M. and Bayer, E.A., Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol*, 1990. 184: p. 5-13.

115. Woese, C.R., Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97(15): p. 8392-8396.

116. Yavuz, C.T., Prakash, A., Mayo, J.T., and Colvin, V.L., Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science*, 2009. 64(10): p. 2510-2521.

117. Zheng, G., Shu, B., and Yan, S., Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003. 32(7): p. 776-782.

118. Zucol, F., Ammann, R.A., Berger, C., Aebi, C., Altwegg, M., Niggli, F.K., and Nadal, D., Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006. 44(8): p. 2750-2759.

## 6. Anhang

### 6.1. Computerprogramm für chemagic Prepito™

```
[INFO]
DATEI_NAME=Niko 5a DIG-RNA Sep. 29.10.2008
ZEILE_1=Pos. A:          Partikel in 0,5xSSC Puffer vorlegen
ZEILE_2=Pos. B:          Antikörper vorlegen
ZEILE_3=Pos..C, D:       Wasch in 0.5xSSC
ZEILE_4=Pos. E:          DIG-RNA vorlegen
ZEILE_5=Pos. F:          Wasch 0.5xSSC
ZEILE_6=Pos. G:          Wasch Wasser
ZEILE_7=Pos. 1:          Elutionspuffer

TIME=36

[GET_TIPS_1]             Aufnahme Spitzen

[POS_H]                  Platte Pos. A, Magnetpartikel vorgelegt
[POSITIONING]
POSITION=60000
SPEED=12000
[MAGNET]                 Magnet aus
DIR=OFF
[TIMER]                 5 Sek. bis Magnet aus
TIME=5
[ROTATION]              Partikel resuspendieren, hohe Geschwindigkeit
DIR=ON
[TIMER]                 60 Sek. rühren
TIME=60
[ROTATION]              Rühren aus
DIR=OFF
[MAGNET]                Separation der Partikel, Magnet an
DIR=ON
[POSITIONING]
POSITION=61300
SPEED=100
[TIMER]                 10 Sek. halten
TIME=10
[POSITIONING]          Magnet herausziehen
POSITION=58000
SPEED=100
[TIMER]                 10 Sek. halten
```

TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=55000  
SPEED=100  
[POSITIONING] Ruhestellung, Kavitaet wechseln  
POSITION=9000  
SPEED=12000

[POS\_G] Platte Pos. B, Bio-Anti-DIG AK vorgelegt  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[MAGNET] Magnet aus  
DIR=OFF  
[TIMER] 5 Sek. bis Magnet aus  
TIME=5  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 30 Sek. ruehren  
TIME=30  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[POSITIONING]  
POSITION=30000  
SPEED=12000  
[TIMER] 4 Min. AK Bindung (4 Min.)  
TIME=240  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 5 Sek. ruehren  
TIME=5  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[POSITIONING]  
POSITION=30000  
SPEED=12000  
[TIMER] 4 Min. AK Bindung (8 Min.)  
TIME=240  
[POSITIONING]  
POSITION=60000

SPEED=12000  
[MAGNET] Separation der Partikel, Magnet an  
DIR=NEG  
[POSITIONING]  
POSITION=61300  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=58000  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=55000  
SPEED=100  
[POSITIONING] Ruhestellung, Kavitaet wechseln  
POSITION=9000  
SPEED=12000  
  
[POS\_F] Platte Pos. C, Waschen AK beladene Partikel  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[MAGNET] Magnet aus  
DIR=OFF  
[TIMER] 5 Sek. bis Magnet aus  
TIME=5  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 15 Sek. ruehren  
TIME=15  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[TIMER] 30 Sek. waschen  
TIME=30  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 5 Sek. ruehren  
TIME=5  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[MAGNET] Separation der Partikel, Magnet an

DIR=ON  
[POSITIONING]  
POSITION=61300  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=58000  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=55000  
SPEED=100  
[POSITIONING] Ruhestellung, Kavitaet wechseln  
POSITION=9000  
SPEED=12000

[POS\_E] Platte Pos. D, Waschen SAV-AK  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[MAGNET] Magnet aus  
DIR=OFF  
[TIMER] 5 Sek. bis Magnet aus  
TIME=5  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 15 Sek. ruehren  
TIME=15  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[TIMER] 30 Sek. waschen  
TIME=30  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 5 Sek. ruehren  
TIME=5  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[MAGNET] Separation der Partikel, Magnet an  
DIR=NEG  
[POSITIONING]

POSITION=61300  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=58000  
SPEED=100  
[TIMER] 10 sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=55000  
SPEED=100  
[POSITIONING] Ruhestellung, Kavität wechseln  
POSITION=9000  
SPEED=12000  
  
[POS\_D] Platte Pos. E, Bindung DIG-RNA  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[MAGNET] Magnet aus  
DIR=OFF  
[TIMER] 5 Sek. bis Magnet aus  
TIME=5  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 20 Sek. rühren  
TIME=20  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[POSITIONING]  
POSITION=30000  
SPEED=12000  
[TIMER] 4 Min. DIG-RNA Bindung (4 Min.)  
TIME=210  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 5 Sek. rühren  
TIME=5  
[ROTATION] Ruehrer aus

DIR=OFF  
[POSITIONING]  
POSITION=30000  
SPEED=12000  
[TIMER] 4 Min. DIG-RNA Bindung (8 Min.)  
TIME=210  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[ROTATION] Partikel resuspendieren  
DIR=ON2  
[TIMER] 5 Sek. ruehren  
TIME=5  
[ROTATION] Ruehrer aus  
DIR=OFF  
[POSITIONING]  
POSITION=30000  
SPEED=12000  
[TIMER] 4 Min. DIG-RNA Bindung (12 Min.)  
TIME=210  
[POSITIONING]  
POSITION=60000  
SPEED=12000  
[MAGNET] Separation der Partikel, Magnet an  
DIR=ON  
[POSITIONING]  
POSITION=61300  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=58000  
SPEED=100  
[TIMER] 10 Sek. halten  
TIME=10  
[POSITIONING] Magnet herausziehen  
POSITION=55000  
SPEED=100  
[POSITIONING] Ruhestellung, Kavitaet wechseln  
POSITION=9000  
SPEED=12000





```
[POS_1]                Partikel in H2O resuspendieren, manuelle Elution
[POSITIONING]
POSITION=51000
SPEED=12000
[MAGNET]                Magnet aus
DIR=OFF
[TIMER]                5 Sek. bis Magnet aus
TIME=5
[ROTATION]             Partikel resuspendieren
DIR=ON
[TIMER]                60 Sek. rühren, hohe Geschwindigkeit
TIME=60
[ROTATION]             Ruehrer aus
DIR=OFF
[POSITIONING]         Ruhestellung
POSITION=9000
SPEED=12000

[STRIP_TIPS]           Spitzen verwerfen

[END]                  Prog-Ende Grundstellung anfahren
```

## 6.2. Sequenzvergleich Capture-Separation

Alle Sequenzvergleiche wurden über eine frei zugängliche NCBI-Datenbank durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 6.2.1. Distinkte Bande der Capture-Separation im DGGE-Gel

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - VJRADDHW012

Nucleotide Sequence (480 letters)

Results for: lcl|62825 None(480)

Your BLAST job specified more than one input sequence. This box lets you choose which input sequence to show BLAST results for.

Query ID lcl|62825

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 480

Database Name chromosome

Description NCBI Chromosome Sequences [See details](#)

Program BLASTN 2.2.20+ [Citation](#)

#### Database Description Posted Date

[Reference:](#) Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]

#### Search Parameters

Program	blastn
Word size	28
Expect value	10
Hitlist size	100
Match/Mismatch scores	1,-2
Gapcosts	0,0
Low Complexity Filter	Yes
Filter string	L;m;
Genetic Code	1

#### Database

Posted date	Mar 11, 2009 5:44 PM
Number of letters	46,990,497,278
Number of sequences	8,906
Entrez query	none

#### Karlin-Altschul statistics

Params	Ungapped	Gapped
Lambda	1.33271	1.28
K	0.620991	0.46
H	1.12409	0.85

#### Results Statistics

Length adjustment	33
Effective length of query	447
Effective length of database	46990203380
Effective search space	21004620910860
Effective search space used	21004620910860

[Graphic Summary](#)

**Distribution of 202 Blast Hits on the Query Sequence [\[?\]](#)**

An overview of the database sequences aligned to the query sequence is shown. The score of each alignment is indicated by one of five different colors, which divides the range of scores into five groups. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a striped line. Mousing over a hit sequence causes the definition and score to be shown in the window at the top, clicking on a hit sequence takes the user to the associated alignments. New: This graphic is an overview of database sequences aligned to the query sequence. Alignments are color-coded by score, within one of five score ranges. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a dashed line. Mousing over an alignment shows the alignment definition and score in the box at the top. Clicking an alignment displays the alignment detail.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">NC_009511.1</a>	Sphingomonas wittichii RW1, complete genome >gb CP000699.1  Sphingomonas wittichii RW1, complete genome	<a href="#">776</a>	1553	100%	0.0	95%
<a href="#">NC_008048.1</a>	Sphingopyxis alaskensis RB2256, complete genome >gb CP000356.1  Sphingopyxis alaskensis RB2256, complete genome	<a href="#">754</a>	754	98%	0.0	95%
<a href="#">NC_007722.1</a>	Erythrobacter litoralis HTCC2594, complete genome >gb CP000157.1  Erythrobacter litoralis HTCC2594, complete genome	<a href="#">739</a>	739	98%	0.0	94%
<a href="#">NC_006526.1</a>	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4, complete genome >gb AE008692.1  Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4, complete genome	<a href="#">708</a>	2125	99%	0.0	93%
<a href="#">NC_011666.1</a>	Methylocella silvestris BL2, complete genome >gb CP001280.1  Methylocella silvestris BL2, complete genome	<a href="#">634</a>	1269	94%	2e-178	91%
<a href="#">NC_010742.1</a>	Brucella abortus S19 chromosome 1, complete sequence >gb CP000887.1  Brucella abortus S19 chromosome 1, complete sequence	<a href="#">625</a>	1250	94%	1e-175	91%
<a href="#">NC_011386.1</a>	Oligotropha carboxidovorans OM5, complete genome >gb CP001196.1  Oligotropha carboxidovorans OM5 strain OM5, complete genome	<a href="#">619</a>	619	94%	6e-174	91%
<a href="#">NC_007964.1</a>	Nitrobacter hamburgensis X14, complete genome >gb CP000319.1  Nitrobacter hamburgensis X14, complete genome	<a href="#">619</a>	619	94%	6e-174	91%
<a href="#">NC_002678.2</a>	Mesorhizobium loti MAFF303099, complete genome >dbj BA000012.4  Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	<a href="#">617</a>	1235	94%	2e-173	91%
<a href="#">NC_009720.1</a>	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome >gb CP000781.1  Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	<a href="#">612</a>	1224	94%	1e-171	91%
<a href="#">NC_003063.2</a>	Agrobacterium tumefaciens str. C58 chromosome linear, complete sequence >gb AE007870.2  Agrobacterium tumefaciens str. C58 linear chro-	<a href="#">603</a>	1206	94%	6e-169	90%

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
	mosome, complete sequence					

### 6.3. Sequenzvergleich der 16S rRNA Capture-Oligonukleotide

Alle Sequenzvergleiche wurden über eine frei zugängliche NCBI-Datenbank durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### 6.3.1. 16S-1 Capture-Oligonukleotid

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - UZTNZTAN01R

Nucleotide Sequence (28 letters)

Results for: lcl|43843 None(28bp)

Your BLAST job specified more than one input sequence. This box lets you choose which input sequence to show BLAST results for.

Query ID lcl|43843

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 28

Database Name chromosome

Description NCBI Chromosome Sequences [See details](#)

Program BLASTN 2.2.19+ [Citation](#)

#### Database Description Posted Date

[Reference](#): Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Other reports: [Search Summary](#) [[Taxonomy reports](#)] [[Distance tree of results](#)]

#### Search Parameters

Program blastn

Word size 7

Expect value 1000

Hitlist size 100

Match/Mismatch scores 1,-3

Gapcosts 5,2

Filter string F

Genetic Code 1

**Database**

Posted date Mar 4, 2009 2:14 PM

Number of letters 46,984,408,501

Number of sequences 8,853

Entrez query rrna

**Karlin-Altschul statistics**

Params Ungapped Gapped

Lambda 1.37406 1.37406

K 0.710603 0.710603

H 1.30725 1.30725

**Results Statistics**

Length adjustment 18

Effective length of query 10

Effective length of database 3957990768

Effective search space 39579907680

Effective search space used 39579907680

[Graphic Summary](#)

**Distribution of 584 Blast Hits on the Query Sequence [\[?\]](#)**

An overview of the database sequences aligned to the query sequence is shown. The score of each alignment is indicated by one of five different colors, which divides the range of scores into five groups. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a striped line. Mousing over a hit sequence causes the definition and score to be shown in the window at the top, clicking on a hit sequence takes the user to the associated alignments. New: This graphic is an overview of database sequences aligned to the query sequence. Alignments are color-coded by score, within one of five score ranges. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a dashed line. Mousing over an alignment shows the alignment definition and score in the box at the top. Clicking an alignment displays the alignment detail.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">NC_012097.1</a>	Pycnococcus provasolii chloroplast, complete genome >gb FJ493498.1  Pycnococcus provasolii chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_012052.1</a>	Syntrichia ruralis chloroplast, complete genome >gb FJ546412.1  Syntrichia ruralis chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	111	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_012026.1</a>	Anaplasma marginale str. Florida, complete genome >gb CP001079.1  Anaplasma marginale str. Florida, complete genome	<a href="#">56.0</a>	108	100%	5e-07	100%

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><a href="#">Max score</a></b>	<b><a href="#">Total score</a></b>	<b><a href="#">Query coverage</a></b>	<b><a href="#">E value</a></b>	<b><a href="#">Max ident</a></b>
<a href="#">NC_011901.1</a>	Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7, complete genome >gb CP001339.1  Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7, complete genome	<a href="#">56.0</a>	187	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011899.1</a>	Halothermothrix orenii H 168, complete genome >gb CP001098.1  Halothermothrix orenii H 168, complete genome	<a href="#">56.0</a>	383	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011852.1</a>	Haemophilus parasuis SH0165, complete genome >gb CP001321.1  Haemophilus parasuis SH0165, complete genome	<a href="#">56.0</a>	362	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011833.1</a>	Buchnera aphidicola str. 5A (Acyrtosiphon pisum), complete genome >gb CP001161.1  Buchnera aphidicola str. 5A (Acyrtosiphon pisum), complete genome	<a href="#">56.0</a>	82.3	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011828.1</a>	Trifolium subterraneum chloroplast, complete genome >gb EU849487.1  Trifolium subterraneum chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	84.2	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011761.1</a>	Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270, complete genome >gb CP001219.1  Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270, complete genome	<a href="#">56.0</a>	138	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011751.1</a>	<i>Escherichia coli</i> UMN026, complete genome >emb CU928163.2  <i>Escherichia coli</i> UMN026 chromosome, complete genome	<a href="#">56.0</a>	472	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011744.1</a>	Vibrio splendidus LGP32 chromosome 2, complete genome	<a href="#">56.0</a>	82.3	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011728.1</a>	Borrelia burgdorferi ZS7, complete genome >gb CP001205.1  Borrelia burgdorferi ZS7, complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011713.1</a>	Festuca arundinacea chloroplast, complete genome >gb FJ466687.1  Festuca arundinacea cultivar KY-31 chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	111	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011663.1</a>	Shewanella baltica OS223, complete genome >gb CP001252.1  Shewanella baltica OS223, complete genome	<a href="#">56.0</a>	618	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011595.1</a>	Acinetobacter baumannii AB307-0294, complete genome >gb CP001172.1  Acinetobacter baumannii AB307-0294, complete genome	<a href="#">56.0</a>	467	100%	5e-07	100%

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b>Max score</b>	<b>Total score</b>	<b>Query coverage</b>	<b>E value</b>	<b>Max ident</b>
<a href="#">NC_011600.1</a>	Vaucheria litorea chloroplast, complete genome >gb EU912438.1  Vaucheria litorea chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	138	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011528.1</a>	Coxiella burnetii CbuK_Q154, complete genome >gb CP001020.1  Coxiella burnetii CbuK_Q154, complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011313.1</a>	Aliivibrio salmonicida LF11238 chromosome 2, complete genome >emb FM178380.1  Aliivibrio salmonicida LF11238 chromosome 2 complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011294.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109, complete genome >emb AM933172.1  Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 complete genome	<a href="#">56.0</a>	444	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011296.1</a>	Thermodesulfovibrio yellowstonii DSM 11347, complete genome >gb CP001147.1  Thermodesulfovibrio yellowstonii DSM 11347, complete genome	<a href="#">56.0</a>	82.3	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011283.1</a>	Klebsiella pneumoniae 342, complete genome >gb CP000964.1  Klebsiella pneumoniae 342, complete genome	<a href="#">56.0</a>	502	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011244.1</a>	Borrelia recurrentis A1, complete genome >gb CP000993.1  Borrelia recurrentis A1, complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011206.1</a>	Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 53993, complete genome >gb CP001132.1  Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 53993, complete genome	<a href="#">56.0</a>	138	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011205.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853, complete genome >gb CP001144.1  Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853, complete genome	<a href="#">56.0</a>	444	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011186.1</a>	Vibrio fischeri MJ11 chromosome II, complete sequence >gb CP001133.1  Vibrio fischeri MJ11 chromosome II, complete sequence	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011163.1</a>	Cicer arietinum chloroplast, complete genome >gb EU835853.1  Cicer arietinum voucher ICCV 10 chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><a href="#">Max score</a></b>	<b><a href="#">Total score</a></b>	<b><a href="#">Query coverage</a></b>	<b><a href="#">E value</a></b>	<b><a href="#">Max ident</a></b>
<a href="#">NC_010554.1</a>	Proteus mirabilis HI4320, complete genome >emb AM942759.1  Proteus mirabilis strain HI4320, complete genome	<a href="#">56.0</a>	551	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011149.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483, complete genome >gb CP001138.1  Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483, complete genome	<a href="#">56.0</a>	444	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011138.1</a>	Alteromonas macleodii 'Deep ecotype', complete genome >gb CP001103.1  Alteromonas macleodii 'Deep ecotype', complete genome	<a href="#">56.0</a>	332	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010981.1</a>	Wolbachia endosymbiont of Culex quinquefasciatus Pel, complete genome >emb AM999887.1  Wolbachia endosymbiont of Culex quinquefasciatus Pel strain wPip complete genome	<a href="#">56.0</a>	56.0	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010842.1</a>	Leptospira biflexa serovar Patoc strain 'Patoc 1 (Ames)' chromosome I, complete genome >gb CP000777.1  Leptospira biflexa serovar Patoc strain 'Patoc 1 (Ames)' chromosome I, complete sequence	<a href="#">56.0</a>	111	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010776.1</a>	Fagopyrum esculentum subsp. ancestrale chloroplast, complete genome >gb EU254477.1  Fagopyrum esculentum subsp. ancestrale chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	111	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010772.1</a>	Heterosigma akashiwo chloroplast, complete genome >gb EU168190.1  Heterosigma akashiwo strain NIES 293 chloroplast, complete genome	<a href="#">56.0</a>	111	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010741.1</a>	Treponema pallidum subsp. pallidum SS14, complete genome >gb CP000805.1  Treponema pallidum subsp. pallidum SS14, complete genome	<a href="#">56.0</a>	166	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010694.1</a>	Erwinia tasmaniensis Et1/99, complete genome >emb CU468135.1  Erwinia tasmaniensis strain ET1/99 complete chromosome	<a href="#">56.0</a>	418	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010658.1</a>	Shigella boydii CDC 3083-94, complete genome >gb CP001063.1  Shigella boydii CDC 3083-94, complete genome	<a href="#">56.0</a>	472	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010634.1</a>	Yersinia pseudotuberculosis PB1/+, complete genome >gb CP001048.1  Yersinia	<a href="#">56.0</a>	418	100%	5e-07	100%

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
	pseudotuberculosis PB1/+, complete genome					

### 6.3.2. 16S-2 Capture-Oligonukleotid

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - UZSRKBYM016

Nucleotide Sequence (28 letters) Results for: lcl|62825 None (28bp)

Your BLAST job specified more than one input sequence. This box lets you choose which input sequence to show BLAST results for.

Query ID lcl|45551

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 28

Database Name chromosome

Description NCBI Chromosome Sequences [See details](#)

Program BLASTN 2.2.19+ [Citation](#)

#### Database Description Posted Date

[Reference](#) Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Other reports: [Search Summary](#) [[Taxonomy reports](#)] [[Distance tree of results](#)]

#### Search Parameters

Program blastn  
 Word size 7  
 Expect value 1000  
 Hitlist size 100  
 Match/Mismatch scores 1,-3  
 Gapcosts 5,2  
 Filter string F  
 Genetic Code 1

#### Database

Posted date Mar 4, 2009 2:14 PM

Number of letters 46,984,408,501

Number of sequences 8,853

Entrez query rrna

### Karlin-Altschul statistics

Params Ungapped Gapped

Lambda 1.37406 1.37406

K 0.710603 0.710603

H 1.30725 1.30725

### Results Statistics

Length adjustment 18

Effective length of query 10

Effective length of database 3957990768

Effective search space 39579907680

Effective search space used 39579907680

### [Graphic Summary](#)

#### Distribution of 911 Blast Hits on the Query Sequence [\[?\]](#)

An overview of the database sequences aligned to the query sequence is shown. The score of each alignment is indicated by one of five different colors, which divides the range of scores into five groups. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a striped line. Mousing over a hit sequence causes the definition and score to be shown in the window at the top, clicking on a hit sequence takes the user to the associated alignments. New: This graphic is an overview of database sequences aligned to the query sequence. Alignments are color-coded by score, within one of five score ranges. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a dashed line. Mousing over an alignment shows the alignment definition and score in the box at the top. Clicking an alignment displays the alignment detail.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">NC_011751.1</a>	<i>Escherichia coli</i> UMN026, complete genome >emb CU928163.2  <i>Escherichia coli</i> UMN026 chromosome, complete genome	<a href="#">56.0</a>	555	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011745.1</a>	<i>Escherichia coli</i> ED1a, complete genome >emb CU928162.2  <i>Escherichia coli</i> ED1a chromosome, complete genome	<a href="#">56.0</a>	527	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_011741.1</a>	<i>Escherichia coli</i> IAI1, complete genome	<a href="#">56.0</a>	557	100%	5e-07	100%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	>emb CU928160.2  <i>Escherichia coli</i> IA1 chromosome, complete genome					
<a href="#">NC_010658.1</a>	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94, complete genome >gb CP001063.1  <i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94, complete genome	<a href="#">56.0</a>	527	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010634.1</a>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+, complete genome >gb CP001048.1  <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+, complete genome	<a href="#">56.0</a>	472	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_009832.1</a>	<i>Serratia proteamaculans</i> 568, complete genome >gb CP000826.1  <i>Serratia proteamaculans</i> 568, complete genome	<a href="#">56.0</a>	553	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_008258.1</a>	<i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401, complete genome >gb CP000266.1  <i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401, complete genome	<a href="#">56.0</a>	531	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_007606.1</a>	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, complete genome >gb CP000034.1  <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, complete genome	<a href="#">56.0</a>	527	100%	5e-07	100%
<a href="#">NC_010506.1</a>	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908, complete genome >gb CP000961.1  <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908, complete genome	<a href="#">48.1</a>	533	100%	1e-04	100%
<a href="#">NC_009792.1</a>	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895, complete genome >gb CP000822.1  <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895, complete genome	<a href="#">48.1</a>	417	100%	1e-04	100%
<a href="#">NC_009778.1</a>	<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894, complete genome >gb CP000783.1  <i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894, complete genome	<a href="#">48.1</a>	486	100%	1e-04	100%
<a href="#">NC_007712.1</a>	<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans', complete genome >dbj AP008232.1  <i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans' DNA, complete genome	<a href="#">48.1</a>	336	100%	1e-04	96%
<a href="#">NC_004344.2</a>	<i>Wigglesworthia glossinidia</i> endosymbiont of <i>Glossina brevipalpis</i> , complete genome >dbj BA000021.3  <i>Wigglesworthia glossinidia</i> endosymbiont of <i>Glossina brevipalpis</i> DNA, complete genome	<a href="#">48.1</a>	96.1	100%	1e-04	96%
<a href="#">NC_011138.1</a>	<i>Alteromonas macleodii</i> 'Deep ecotype', complete genome >gb CP001103.1  <i>Alteromonas macleodii</i> 'Deep ecotype', comp-	<a href="#">40.1</a>	228	100%	0.033	100%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	lete genome					
<a href="#">NC_010814.1</a>	Geobacter lovleyi SZ, complete genome >gb CP001089.1  Geobacter lovleyi SZ, complete genome	<a href="#">40.1</a>	80.3	85%	0.033	95%
<a href="#">NC_008609.1</a>	Pelobacter propionicus DSM 2379, complete genome >gb CP000482.1  Pelobacter propionicus DSM 2379, complete genome	<a href="#">40.1</a>	213	100%	0.033	100%
<a href="#">NC_008260.1</a>	Alcanivorax borkumensis SK2, complete genome >emb AM286690.1  Alcanivorax borkumensis SK2, complete genome	<a href="#">40.1</a>	120	85%	0.033	95%
<a href="#">NC_008228.1</a>	Pseudoalteromonas atlantica T6c, complete genome >gb CP000388.1  Pseudoalteromonas atlantica T6c, complete genome	<a href="#">40.1</a>	226	100%	0.033	100%
<a href="#">NC_006570.1</a>	Francisella tularensis subsp. tularensis Schu 4, complete genome >emb AJ749949.1  Francisella tularensis subsp. tularensis SCHU S4 complete genome	<a href="#">40.1</a>	146	71%	0.033	100%
<a href="#">NC_007292.1</a>	Candidatus Blochmannia pennsylvanicus str. BPEN, complete genome >gb CP000016.1  Candidatus Blochmannia pennsylvanicus str. BPEN, complete genome	<a href="#">40.1</a>	40.1	71%	0.033	100%
<a href="#">NC_004545.1</a>	Buchnera aphidicola str. Bp (Baizongia pistaciae), complete genome >gb AE016826.1  Buchnera aphidicola str. Bp (Baizongia pistaciae), complete genome	<a href="#">40.1</a>	40.1	85%	0.033	95%
<a href="#">NC_010999.1</a>	Lactobacillus casei, complete genome >emb FM177140.1  Lactobacillus casei BL23 complete genome, strain BL23	<a href="#">38.2</a>	217	96%	0.13	94%
<a href="#">NC_010801.1</a>	Burkholderia multivorans ATCC 17616 chromosome 3, complete sequence >dbj AP009387.1  Burkholderia multivorans ATCC 17616 genomic DNA, complete genome, chromosome 3	<a href="#">38.2</a>	38.2	96%	0.13	92%
<a href="#">NC_006270.3</a>	Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome >gb CP000002.3  Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome	<a href="#">38.2</a>	319	100%	0.13	100%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">NC_010087.1</a>	Burkholderia multivorans ATCC 17616 chromosome 3, complete sequence >gb CP000870.1  Burkholderia multivorans ATCC 17616 chromosome 3, complete sequence	<a href="#">38.2</a>	38.2	96%	0.13	92%
<a href="#">NC_009848.1</a>	Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome >gb CP000813.1  Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	<a href="#">38.2</a>	319	96%	0.13	100%
<a href="#">NC_009725.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens FZB42, complete genome >gb CP000560.1  Bacillus amyloliquefaciens FZB42, complete genome	<a href="#">38.2</a>	353	96%	0.13	100%

### 6.3.3. 16S-3 Capture-Oligonukleotid

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - UZSS9XY9016

Nucleotide Sequence (27 letters) lcl|60591 None(27bp)

Your BLAST job specified more than one input sequence. This box lets you choose which input sequence to show BLAST results for.

Query ID lcl|60591

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 27

Database Name chromosome

Description NCBI Chromosome Sequences [See details](#)

Program BLASTN 2.2.19+ [Citation](#)

Database Description Posted Date

[Reference](#) Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Other reports: [Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#) [\[Distance tree of results\]](#)

Search Parameters

Program blastn

Word size 7

Expect value 1000

Hitlist size 100

Match/Mismatch scores 1,-3

Gapcosts 5,2

Filter string F

Genetic Code 1

#### Database

Posted date Mar 4, 2009 2:14 PM

Number of letters 46,984,408,501

Number of sequences 8,853

Entrez query rna

#### Karlin-Altschul statistics

Params Ungapped Gapped

Lambda 1.37406 1.37406

K 0.710603 0.710603

H 1.30725 1.30725

#### Results Statistics

Length adjustment 18

Effective length of query 9

Effective length of database 3957990768

Effective search space 35621916912

Effective search space used 35621916912

#### [Graphic Summary](#)

Distribution of 784 Blast Hits on the Query Sequence [\[?\]](#)

An overview of the database sequences aligned to the query sequence is shown. The score of each alignment is indicated by one of five different colors, which divides the range of scores into five groups. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a striped line. Mousing over a hit sequence causes the definition and score to be shown in the window at the top, clicking on a hit sequence takes the user to the associated alignments. New: This graphic is an overview of database sequences aligned to the query sequence. Alignments are color-coded by score, within one of five score ranges. Multiple alignments on the same database sequence are connected by a dashed line. Mousing over an alignment shows the alignment definition and score in the box at the top. Clicking an alignment displays the alignment detail.

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">NC_010554.1</a>	Proteus mirabilis HI4320, complete genome >emb AM942759.1  Proteus mirabilis strain HI4320, complete genome	<a href="#">54.0</a>	521	100%	2e-06	100%
<a href="#">NC_010634.1</a>	Yersinia pseudotuberculosis PB1/+, complete genome >gb CP001048.1  Yersinia pseudotuberculosis PB1/+, complete genome	<a href="#">54.0</a>	539	100%	2e-06	100%
<a href="#">NC_009832.1</a>	Serratia proteamaculans 568, complete genome >gb CP000826.1  Serratia proteamaculans 568, complete genome	<a href="#">54.0</a>	477	100%	2e-06	100%
<a href="#">NC_009381.1</a>	Yersinia pestis Pestoides F, complete genome >gb CP000668.1  Yersinia pestis Pestoides F, complete genome	<a href="#">54.0</a>	539	100%	2e-06	100%
<a href="#">NC_009348.1</a>	Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449, complete genome >gb CP000644.1  Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449, complete genome	<a href="#">54.0</a>	564	100%	2e-06	100%
<a href="#">NC_004547.2</a>	Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043, complete genome >emb BX950851.1  Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043, complete genome	<a href="#">54.0</a>	423	100%	2e-06	100%
<a href="#">NC_010407.1</a>	Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, complete genome >emb AM849034.1  Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus complete genome	<a href="#">48.1</a>	96.1	88%	1e-04	100%
<a href="#">NC_006087.1</a>	Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07, complete genome >gb AE016822.1  Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07, complete genome	<a href="#">48.1</a>	48.1	88%	1e-04	100%
<a href="#">NC_011896.1</a>	Mycobacterium leprae Br4923, complete genome >emb FM211192.1  Mycobacterium leprae Br4923, complete genome sequence	<a href="#">46.1</a>	98.6	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_011071.1</a>	Stenotrophomonas maltophilia R551-3, complete genome >gb CP001111.1  Stenotrophomonas maltophilia R551-3, complete genome	<a href="#">46.1</a>	289	92%	5e-04	100%
<a href="#">NC_010688.1</a>	Xanthomonas campestris pv. campestris, complete genome >emb AM920689.1	<a href="#">46.1</a>	360	85%	5e-04	100%

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
	Xanthomonas campestris pv. campestris complete genome, strain B100					
<a href="#">NC_010577.1</a>	Xylella fastidiosa M23, complete genome >gb CP001011.1  Xylella fastidiosa M23, complete genome	<a href="#">46.1</a>	199	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_009142.1</a>	Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338, complete genome >emb AM420293.1  Saccharopolyspora erythraea NRRL2338 complete genome	<a href="#">46.1</a>	184	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_008709.1</a>	Psychromonas ingrahamii 37, complete genome >gb CP000510.1  Psychromonas ingrahamii 37, complete genome	<a href="#">46.1</a>	487	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_008268.1</a>	Rhodococcus jostii RHA1, complete genome >gb CP000431.1  Rhodococcus jostii RHA1, complete genome	<a href="#">46.1</a>	184	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_008260.1</a>	Alcanivorax borkumensis SK2, complete genome >emb AM286690.1  Alcanivorax borkumensis SK2, complete genome	<a href="#">46.1</a>	138	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_002755.2</a>	Mycobacterium tuberculosis CDC1551, complete genome >gb AE000516.2  Mycobacterium tuberculosis CDC1551, complete genome	<a href="#">46.1</a>	98.6	85%	5e-04	100%
<a href="#">NC_011313.1</a>	Aliivibrio salmonicida LFI1238 chromosome 2, complete genome >emb FM178380.1  Aliivibrio salmonicida LFI1238 chromosome 2 complete genome	<a href="#">44.1</a>	44.1	81%	0.002	100%
<a href="#">NC_006840.2</a>	Vibrio fischeri ES114 chromosome I, complete genome >gb CP000020.2  Vibrio fischeri ES114 chromosome I, complete sequence	<a href="#">44.1</a>	596	100%	0.002	100%
<a href="#">NC_007954.1</a>	Shewanella denitrificans OS217, complete genome >gb CP000302.1  Shewanella denitrificans OS217, complete genome	<a href="#">44.1</a>	437	92%	0.002	100%
<a href="#">NC_007716.1</a>	Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB, complete genome >gb CP000061.1  Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB, complete genome	<a href="#">44.1</a>	88.2	81%	0.002	100%
<a href="#">NC_011886.1</a>	Arthrobacter chlorophenolicus A6, complete genome >gb CP001341.1  Arthrobacter chlorophenolicus A6, complete	<a href="#">38.2</a>	324	88%	0.12	100%

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
	genome					
<a href="#">NC_010168.1</a>	Renibacterium salmoninarum ATCC 33209, complete genome >gb CP000910.1  Renibacterium salmoninarum ATCC 33209, complete genome	<a href="#">38.2</a>	128	88%	0.12	100%
<a href="#">NC_009664.1</a>	Kineococcus radiotolerans SRS30216, complete genome	<a href="#">38.2</a>	152	85%	0.12	95%
<a href="#">NC_009253.1</a>	Desulfotomaculum reducens MI-1, complete genome >gb CP000612.1  Desulfotomaculum reducens MI-1, complete genome	<a href="#">38.2</a>	323	100%	0.12	100%

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der eubakteriellen Oligonukleotide, die über einen Spacer mit 14 Thymin Nukleotiden biotinyliert waren.....	- 40 -
Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer .....	- 43 -
Tabelle 3: Menge und Reinheitsgrad der nach der Markierung isolierten Gesamt-RNA als Durchschnittswerte der durchgeführten Experimente. ....	- 61 -
Tabelle 4: Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale aus Abbildung 16 in LU und berechnung der Ausbeute der Separation. ....	- 72 -
Tabelle 5: Einfluss der Oberflächenladung auf die Effizienz und Spezifität der Separation DIG markierter RNA. Ausbeute in % LU in der Elution, Unspezifität in % gebundene tuf DNA. ....	- 106 -
Tabelle 6: Verbesserung der Spezifität und der Ausbeute der DIG-RNA Separation. Ausbeute in % LU in der Elution, Unspezifität in % gebundene tuf DNA. ....	- 107 -
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sorbentien ihre physikalischen Eigenschaften und ihre Leistung in Separationsexperimenten. ....	- 110 -

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterschied zwischen prokaryontischer und eukaryontischer mRNA. .....	- 5 -
Abbildung 2: Strukturformeln der Haptene Digoxigenin und Biotin.....	- 10 -
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genexpressionsanalyse mittels Microarray Technologie.....	- 12 -
Abbildung 4: Entwicklung eines <i>P. aeruginosa</i> Psl Biofilms. (A): Schematische Entwicklung in 5 Schritten (Stoodley et al. 2002). (B) Korrespondierende mikroskopische Bilder der Biofilmbildung: extrazelluläre Matrix (rot), GFP markierter <i>P. aeruginosa</i> Psl (grün), bei Nr. 4 und 5 zusätzliche Seitenansicht (Ma et al. 2009). .....	- 17 -
Abbildung 5: ESEM-Aufnahme von magnetischen Polyvinylalkohol Partikeln (M- PVA 012) der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG. Mittlerer Partikeldurchmesser 2 µm (chemagen Biopolymer Technologie AG, Baesweiler, D, 2009). .....	- 20 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise des chemagic Prepito™. a): Separatornadeln (2) sind unmagnetisch, da die Polarisierung des Magnetzylinders (1) im 90° Winkel zu der Längsachse der Separatornadeln steht. Durch die zusätzliche Drehung der Separatornadeln bleiben die Magnetpartikel (3) im Puffer (4) resuspendiert. b): Durch Drehung des Magnetzylinders (1) werden die Separatornadeln (2) aufmagnetisiert, da das Magnetfeld in Richtung der Nadeln wirkt. Hierdurch kommt es zur Separation der Magnetpartikel (3) an den Separatornadeln (2). .....	- 26 -
Abbildung 7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verfahrensschritte (Ziffer 1 – 7), die in dieser Arbeit zu verwirklichen waren. ....	- 27 -
Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Dot-Blot Apparatur.....	- 37 -
Abbildung 9: Amplifikationsverlauf bei einer qPCR .....	- 54 -
Abbildung 10: Strukturformel des Nukleotidanalogs DIG-11-UTP (Digoxigenin- 3-O-Methylcarbonyl-ε-Aminocaproyl-[5-(3-aminoallyl)-Uridin-5'-Triphosphat] -	- 58 -
Abbildung 11: Darstellung der Bindung von DIG markierter RNA und streptavidinfunktionalisierten Magnetpartikeln mittels biotinyliertem Anti-DIG Antikörper.....	- 58 -
Abbildung 12: Detektion Digoxigenin markierter RNA in Gesamt-RNA Extrakten von den Referenz-Bakterien und den Biofilmproben. Die Mengen der aufgetragenen Gesamt-RNA Mengen sind angegeben, unmarkierte Gesamt-RNA wurde als Kontrolle [K] aufgetragen. ....	- 63 -

Abbildung 13: Dot-Blot DIG-11-UTP markierter RNA aus *P. aeruginosa*. Markierung der Bakterien in verschiedenen Wachstumsphasen, je 1 µg Gesamt-RNA wurde aufgetragen. Diagramm der Chemilumineszenzsignale als Maß der Markierungsausbeute über der Wachstumsphase als OD<sub>600</sub>.....- 65 -

Abbildung 14: RNase and DNase Verdau von isolierter Gesamt-RNA nach der in vivo Markierung von *P. aeruginosa* [*P. aerug.*] und eines Flusswasser Biofilms [Flussw.]. 2 µg bzw. 0,1 µg in vivo DIG markierte Gesamt-RNA und 0.025 µg in vitro markierte Kontroll-DNA (regA) [Kontr.] wurden mit DNase I (0.068 units/ml) oder RNase A (20 µg/ml) verdaut. ....- 67 -

Abbildung 15: Analyse der Bindungsspezifität zwischen M-PVA SAV2 Magnetpartikeln und DIG-RNA. Separation ohne Antikörper und mit biotinfreiem Anti-DIG Antikörper. Es wurden 2 µg in vivo markierte Gesamt-RNA und 0,25 mg Partikel eingesetzt [Anti-DIG AK: Anti-DIG Antikörper; n-b: nicht biotinyliert; S: Sorptionsüberstand; W1: Waschfraktion 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschfraktion 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elutionsfraktion in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C]. ....- 70 -

Abbildung 16: Separation DIG markierter RNA in unterschiedlicher Bindungsabfolge. A: 1. Bindung des Antikörpers an DIG-RNA, 2. an Magnetpartikel. B: 1. Bindung des Antikörpers an Magnetpartikel, 2. an DIG-RNA. Es wurden 2 µg in vivo markierte Gesamt-RNA, 0,25 mg Partikel und 0,4 µg Antikörper eingesetzt [AK: Anti-DIG Antikörper; gesRNA: Gesamt-RNA, S: Sorptionsüberstand nach der Bindung in 0,5x SSC-Puffer; W1: Waschfraktion 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschfraktion 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].....- 71 -

Abbildung 17: Separation DIG markierter RNA mit unterschiedlichen Anti-DIG Antikörper Konzentrationen. Es wurden jeweils 2 µg in vivo markierte Gesamt-RNA, 0,25 mg Partikel und 0,4 µg Antikörper eingesetzt [AK: Anti-DIG Antikörper; S: Sorptionsüberstand nach der Bindung in 0,5x SSC-Puffer; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].....- 75 -

Abbildung 18: Separation der DIG markierten RNA aus je 2 µg *P. aeruginosa*, 2 µg *E. faecium* Gesamt-RNA und 0,25 µg Gesamt-RNA aus einem Trinkwasserbiofilm [S: Sorptionsüberstand; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].- 79 -

-

Abbildung 19: Analyse der Spezifität der Separation. 0,25 µg in vitro synthetisierter tuf DNA (DNA<sub>IS</sub>) wurden zu 2 µg DIG-markierter Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* zugegeben. Die cDNA Mengen wurden in einer quantitativen SYBR Green PCR quantifiziert [gesRNA: Probe vor der Separation; S: Sorptionsüberstand; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C].....- 82 -

Abbildung 20: Schematischer Ablauf der Capture-Separation.....- 87 -

Abbildung 21: Capture-Separation der 16S rRNA aus einer DIG markierten *P. aeruginosa* Gesamt-RNA, Analyse im Formaldehyd-Agarosegel [23S rRNA, 16S rRNA: Lage der rRNA Banden im Gel; S: Sorptionsüberstand, W: Waschfraktion in 0,5x SSC Puffer, E: Elutionsfraktion in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C]. ....- 88 -

Abbildung 22: DGGE-Gele zur Bewertung der DIG-RNA und DIG-rRNA Separation in einer PCR-DGGE Populationsanalyse. Es wurde Gesamt-RNA von DIG markierten, natürlichen Biofilmen aus Flusswasser, Trinkwasser und Seesediment verwendet. In den Spuren 1 wurde die Gesamt-RNA Fraktion, in Spuren 2 die DIG-RNA Fraktion und in Spuren 3 die DIG-rRNA Fraktion der jeweiligen Biofilme analysiert. .... - 90 -

Abbildung 23: Schema des verkürzten Protokolls ohne Capture-Separation. - 93 -

Abbildung 24: Schematische Darstellung der Expressionsanalyse. Die beispielhafte Berechnung der Induktion aus den C<sub>t</sub> Werten des qPCR Amplifikationsblots sind in orangener Farbe dargestellt [KG: Konstitutiv expremiertes Gen zur Normalisierung, mRNA: mRNA des Zielgens, IF: Induktionsfaktor]..... - 96 -

Abbildung 25: Zusammenfassung der Expressionsanalyse des *rpoS* Gens aus *P. aeruginosa* und des *vanA* Gens aus *E. faecium*. Die Induktionsfaktoren wurden für die verschiedenen Separationsfraktionen angegeben..... - 99 -

Abbildung 26: chemagic Prepito™ der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG. A: Touchscreen zur Bedienung; B: Im Inneren, beweglicher Magnetseparator; C: Im Inneren, Mikrotiterplatte; D: Pufferreservoir zur Befüllung der Mikrotiterplatte..... - 101 -

Abbildung 27: Belegung der Mikrotiterplatte und Dauer der Verfahrensschritte im chemagic Prepito™. Im Außenrand sind die Positionen beschriftet und im Inneren ist die Belegung aufgeführt..... - 102 -

Abbildung 28: Analyse der Separation mittels chemagic Prepito™. 0,25 µg in vitro synthetisierter tuf DNA in 5 µg DIG-markierter Gesamt-RNA aus *P. aeruginosa* [gesRNA: Probe vor der Separation; S: Sorptionsüberstand; W1: Waschschrift 1 in 0,5x SSC Puffer, W2: Waschschrift 2 in DEPC-H<sub>2</sub>O, E: Elution in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 95°C]. .... - 103 -