

# **Die Identifizierung von molekularen Markern in Bakterien bei Stressexposition**

**Dissertation**

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

von  
**Dipl.-Biol. Miriam Brändle**  
geboren am 07. November 1979 in Waiblingen

**Tag der mündlichen Prüfung: 05. Mai 2010**

**Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk**  
**Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Obst**

**Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)**  
**Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Nord**

**Karlsruhe 2009**



**Erklärung:**

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

Karlsruhe, den 19.05.2010

---

(M. Brändle)



# **Danksagung**

## **Professor Dr. Christoph Syldatk**

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

## **Prof. Dr. Ursula Obst**

danke ich für die Überlassung des Themas, die fachlichen Diskussionen und zahlreichen Ratschläge.

## **Dr. Thomas Schwartz**

danke ich für die vielen Diskussionen und Anregungen, die fortwährende Unterstützung im Verlauf der Arbeit und die Ermutigungen bei Tiefpunkten.

## **Silke Kirchen**

danke ich für die Diskussionsbereitschaft bei meinen Ergebnissen, die kreativen Ideen zur Optimierung und die allgemeine große Hilfe.

## **Thomas Teutenberg**

danke ich für den Beitrag zu dieser Arbeit im Rahmen seiner Studien- und Diplomarbeit. Sein unermüdlicher Einsatz im Labor war mit viel Eigeninitiative und Interesse für das Thema verbunden.

## **Der gesamten Abteilung Umweltmikrobiologie**

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

## **Katja Maier, Karen Hilss, Tina Nuding, Jan Fickel und Christoph Konradt**

danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren, für die fachlichen Diskussionen und Hilfe bei der Literaturrecherche.

## **Meiner Mutter**

danke ich für ihre Unterstützung und Anwesenheit.

## Zusammenfassung

Die Fähigkeit von Mikroorganismen sich nicht optimalen Lebensbedingungen durch Veränderung ihrer Genexpression anzupassen, führt sowohl im medizinischen Bereich als auch bei technischen Prozessen, unter anderem durch die Minimierung der Desinfektionseffizienz, zu Problemen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene molekulare Marker ausgewählt, um bakterielle Stressantworten näher zu identifizieren.

Untersucht wurden die hygienisch relevanten Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sowie als Vertreter der Gram-positiven Bakterien *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*. Als Stressoren wurden Nährstofflimitierung und eine erhöhte Salzkonzentration eingesetzt. Des Weiteren wurden die verschiedenen Wachstumsphasen der Bakterien analysiert. Die Modellorganismen wurden in ihrer planktonischen und adhären Lebensweise betrachtet.

Bei der Untersuchung von physiologischen Summenparametern zeigte sich bei Enterokokken eine deutliche Zunahme des RNA-Gehalts, während die Zellzahl im gleichen Zeitraum bei Stresseinwirkung abnahm. Zusätzlich konnte ein beginnendes VBNC (viable but nonculturable)-Stadium als eine mögliche Stressantwort festgestellt werden. Zur Betrachtung der spezifischen Stressantwort wurden Genexpressionsanalysen mittels quantitativer PCR und Northern Blot-Analysen mit in dieser Arbeit neu berechneten Sonden und Primern durchgeführt. Dazu wurde zum einen der Sigmafaktor *rpoS*, der an der Biofilmbildung beteiligte Faktor *rcaA* bei Gram-negativen Bakterien und das in die Peptidoglykansynthese involvierte *pbp5*-Gen bei Enterokokken herangezogen. Es konnte eine Induktion von *rpoS* und erstmals eine stressabhängige Induktion des *rcaA*-Gen gezeigt werden, während es zu einer Repression des *pbp5*-Gens bei Stressexposition kam. Beim Vergleich dieser speziesspezifischen Expressionsmuster mit Genen der *Usp*-Familie, die an der generellen Stressantwort beteiligt sind, wurde deutlich, dass sich diese als allgemeingültige Stressmarker verwenden lassen. Zusätzlich wurden verschiedene Ansätze zur Identifizierung von Stressmustern untersucht, mit denen eine schnelle Erkennung physiologischer Stadien bei Bakterien möglich ist. Mit Hilfe der RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-PCR) wurden sowohl Transkriptom- als auch Genomanalysen durchgeführt, die deutlich Unterschiede zwischen den gestressten Bakterien zeigten und Hinweise auf eine Osmosensitivität von *Enterococcus faecalis* erbrachten.

Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Forschung bei der Stressadaptation von Bakterien im Hinblick auf die schnelle und speziessunabhängige Identifizierung und Bewertung physiologischer Stadien. Aufbauend darauf können Maßnahmen getroffen werden, die es ermöglichen, bakterielle Populationen direkt vor Ort zu manipulieren, um so in Zukunft technische Prozesse optimieren zu können.



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung	
Zusammenfassung	
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Motivation der Arbeit	1
1.2 Überblick über spezifische Anpassungsstrategien	2
1.3 Allgemeine Anpassungsstrategien von Bakterien	6
1.3.1 Das VBNC-Stadium	6
1.3.2 Biofilme	8
1.4 Untersuchte Regulatoren bei Anpassungsstrategien von Bakterien	11
1.4.1 Das <i>rpoS</i> -Gen	11
1.4.2 Das <i>rcsA</i> -Gen	13
1.4.3 Das <i>pbp5</i> -Gen	15
1.4.4 Die „universelle Stressprotein“ (Usp)-Familie	16
1.5 Molekulare Grundlagen der angewandten Nachweismethoden	18
1.6 Aufgabenstellung	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Bakterien und Wachstumsbedingung	23
2.2 Geräte und Materialien	23
2.3 Primer und Oligonukleotide	24
2.4 Optische Vermessung von RNA und DNA	26
2.5 Diskriminierung von DNA toter Zellen mit Propidium-Monoazid	27
2.6 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien	28
2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
2.8 RAPD-PCR	29
2.9 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.10 Stressparameter	31
2.11 Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)	32
2.12 Gesamt-RNA-Isolierung	32
2.13 Capture-Hybridisierungsaufreinigung nach Pang	33
2.14 Northern Blot-Hybridisierungen	34
2.14.1 Sondenherstellung	35

2.14.2	Northern Blot-Hybridisierungen.....	35
2.15	Reverse Transkription.....	36
2.16	Real-Time-PCR.....	37
2.17	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
2.18	Modifikation von Nukleinsäuren.....	41
2.18.1	3' Modifikation von Nukleinsäuren mit T4 RNA Ligase.....	41
2.18.2	3' Modifikation von Nukleinsäuren mit terminaler Transferase.....	42
2.19	Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen.....	42
2.20	Ethanolpräzipitation.....	43
2.21	Sequenzierung.....	43
2.22	Biofilmuntersuchungen.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Auswahl der Stressparameter.....	47
3.2	Untersuchung der Physiologie während Stressexposition bei Referenzbakterien.....	48
3.3	Untersuchung möglicher stressregulierter, speziesspezifischer Faktoren bei Referenzbakterien.....	56
3.3.1	Expression speziesspezifischer Regulatoren bei Gram-negativen Bakterien.....	57
3.3.2	Expression speziesspezifischer Regulatoren bei Gram-positiven Bakterien.....	64
3.4	Untersuchung der Expression des <i>rpoS</i> -Gens und des <i>rcaA</i> -Gens bei adhärenenten Bakterien.....	71
3.5	Untersuchung des universellen Stressgens bei Referenzbakterien.....	79
3.5.1	Expression eines <i>usp</i> -homologen Gens bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	81
3.5.2	Expression des <i>uspA</i> -Gens bei <i>Escherichia coli</i> .....	82
3.5.3	Expression von vier <i>usp</i> -homologen Genen bei <i>Enterococcus faecalis</i> .....	83
3.6	Ansatz zur Identifizierung neuer Stressmuster.....	89
3.6.1	Amplifikation durch Adapter.....	89
3.6.2	Amplifikation durch degenerierte und unspezifisch bindende Primer.....	92
3.7	Muster klonaler Stressresistenz.....	95
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	103
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>107</b>
4.1	Bakterielle Anpassungsstrategien.....	107
4.2	Physiologie bei Stressexposition.....	108
4.3	Speziesspezifische Regulatoren.....	112
4.4	Expression des universellen Stressproteins ( <i>usp</i> ).....	118
4.5	Molekulare Fingerprints bei Stress und unterschiedlichen physiologischen Stadien bei Bakterien.....	119

<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>157</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>165</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>168</b>



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ABNC	active but nonculturable
AFLP	amplified fragment-length polymorphism
AHL	N-Acyl-L-Homoserinlacton
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
C	Cytosin
CD	conserved domain
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
crDNA	komplementäre ribosomale Desoxyribonukleinsäure
CRP	cAMP-Rezeptorprotein
csi-Gen	carbon-starvation induced
Ct	threshold cycle
D	Aspartat
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Glutamat
Ebh-Protein	extracellular matrix-binding protein
EFAR	<i>Enterococcus faecalis/ faecium</i> repeats
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
ESEM	Environmental Scanning Electronic Microscopy
etc.	et cetera
F	Phenylalanin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
G	Glycin

G	Guanin
$x g$	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
H	Histidin
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HTH	Helix-Turn-Helix
I	Isoleucin
IF	Induktionsfaktor
IM	Innere Membran ( <i>inner membrane</i> )
IV	Inhaltsverzeichnis
J/m <sup>2</sup>	Joule/Quadratmeter
K	Lysin
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilo Dalton
L	Leucin
M	Methionin
M	molar
min	Minute
mL	Milliliter
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MW	Mittelwert
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
n.b.	nicht bearbeitet
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte ( <i>optical density</i> )
OM	äußere Membran ( <i>outer membrane</i> )
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PMA	Propidium-Monoazid
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat

Q	Glutamin
QS	Quorum sensing
R	Arginin
RAPD-PCR	Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
Rcs	regulator of capsule synthesis
rDNA	ribosomale DNA
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RF	Repressionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
S	Serin
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
T	Threonin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
tRNA	Transfer RNA
U	Uracil
usp	universal stress protein
UV	Ultraviolett
V	Valin
v.a.	vor allem
VBNC	viable but nonculturable
vgl.	vergleiche
vs.	versus
W	Tryptophan
z.B.	zum Beispiel
Y	Tyrosin
µL	Microliter



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation der Arbeit

Mikroorganismen sind perfekt an ihre sich ständig ändernde Umwelt angepasst und verfügen über eine enorme genetische Flexibilität, welche sich in vielfältigen Stressantworten äußert, die das Überleben der Zellen in der Umwelt und bei pathogenen Bakterien auch im Wirtsorganismus sichern. Diese Fähigkeit, auch bei nicht optimalen Bedingungen zu bestehen, stellt große Probleme im medizinischen Bereich, in der Lebensmittelindustrie als auch bei weiteren technischen Prozessen, beispielsweise bei der Trinkwasseraufbereitung dar, deren Tragweite man sich erst in den letzten Jahren bewusst wurde. Die meisten Untersuchungen beschäftigen sich bis heute allerdings oft mit einem spezifischen Modellbakterium, während die Anpassungsstrategien und ihre Charakterisierung bei natürlichen Populationen weitgehend unerforscht geblieben sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit bei hygienisch relevanten Bakterien auf der Basis zum Teil bekannter spezifischer Anpassungsstrategien Stressparameter festgelegt und molekularbiologisch charakterisiert. Mit diesen ermittelten Parametern wurden in einem zweiten Schritt verschiedene Methoden erprobt, um einen möglichst allgemeingültigen, speziesunabhängigen Methodenkatalog zur Untersuchung bestimmter Antworten auf sich ändernde Umweltbedingungen zu erstellen. Dies stellt die Grundlage dar, ein Bewertungskonzept zur Erkennung von physiologischen Zuständen von Bakterien in ihrem natürlichen Habitat zu schaffen, und soll zu gezielten Maßnahmen führen, bakterielle Populationen direkt vor Ort zu manipulieren. So können Schritte zur Vermeidung oder zum Nutzen dieser Populationen, zum Beispiel von Biofilmen, insbesondere bei technischen Prozessen eingeleitet werden.

## 1.2 Überblick über spezifische Anpassungsstrategien

In ihrem natürlichen Habitat sind Bakterien ständig mit Änderungen ihrer Umgebung und ihrer Nahrungsquellen konfrontiert. Oft wechseln in rascher Folge Bedingungen, die entweder ideal oder sehr ungünstig für das Wachstum der Zellen sein können. Neben starken Änderungen in der Nahrungsquantität treten unterschiedliche Situationen von physikalischem Stress, wie pH-Änderungen, osmotischem Schock, Hitze oder Kälte auf. Der Lebenszyklus von Bakterien ist daher durch die sich abwechselnde Vielfalt und Mangel an Nährstoffen sowie durch Begegnungen mit unterschiedlichen Umweltbedingungen und Stressformen geprägt. Die meisten Bakterien sind in ausgezeichneter Weise an solche Wechsel angepasst. Einige dieser möglichen Stressantworten auf Umweltstimuli sind im Folgenden aufgeführt, wobei sowohl osmotischer Stress als auch Nährstofflimitierung in industriellen Prozessen von besonderer Relevanz sind. So kommt es beispielsweise in der Lebensmittelproduktion bei der Trocknung von Nahrungsmitteln zu erhöhten Salzkonzentrationen. In der Trinkwasseraufbereitung sind die Nährstoffe begrenzt.

### **Hitzeschock-Antwort**

Bei der Anpassung an hohe Temperaturen spielen bei Bakterien Chaperone und ATP-abhängige Proteasen als Hitzeschockproteine eine Rolle, die bei der Proteinfaltung, -reparatur und -degradation beteiligt sind (Hendrick und Hartl 1993). Bei *Escherichia coli* kommt es zum Anstieg des Masterregulators  $\sigma_{32}$ , der cytoplasmatische Proteine schützt, (Missiakas et al. 1996) und SigmaE (Wang und Kaguni 1989), der für die Proteinfaltung im periplasmatischen Raum verantwortlich ist.  $\sigma_{32}$  ist bei Gram-negativen Bakterien stark konserviert, bei Gram-positiven Bakterien werden die Hitzeschockproteine oft von dem Sigmafaktor B reguliert (Hecker et al. 1996).

### **Membran und Zellwand bedingte Antwort**

Die Zellwand der Bakterien ist die erste Stelle, an der es bei Veränderungen in der natürlichen Umgebung zu einer Stressreaktion kommt, die sich sowohl durch eine Veränderung der Morphologie als auch der Signaltransduktion äußern kann. Bei *Escherichia coli* werden mehrere Anpassungsstrategien beschrieben. Eine dieser Strategien ist reguliert durch den Sigmafaktor  $\sigma_E$  (Raina et al. 1995), eine weitere wichtige Rolle spielen Zwei-Komponenten-Systeme, wie das CpxAr-System (Cosma et al. 1995). Sie sorgen für die Aktivierung verschiedener Faktoren - wie Oxidoreduktasen, Isomerasen oder Chaperone -, die für eine korrekte Faltung der Proteine verantwortlich sind.

### **Kälteschock-Antwort**

Die Hauptauswirkungen bei einem Absinken der Temperaturen sind für Bakterien ein Rückgang der Membranfluidität und eine Stabilisierung von Sekundärstrukturen der RNA und DNA, was die Transkription und Translation sowie die Replikation negativ beeinflussen kann. Die Zelle reagiert darauf mit einer Abnahme des Sättigungsgrades von Fettsäuren der Membranphospholipide und der vermehrten Expression von CspA (Goldstein et al. 1990), des Hauptkälteschockproteins von *Escherichia coli*, das als RNA-Chaperon die Translation erleichtert (Jiang et al. 1997).

### **Oxidativer Stress**

Die Autooxidation von Komponenten der Atmungskette führt bei aeroben Bakterien zu einem Anstieg von Hydrogenperoxid (Gonzalez-Flecha und Demple 1995), Superoxidanionen oder Hydroxylradikalen. Bei *Escherichia coli* kommt es daraufhin zu antioxidativen Aktivitäten verschiedener Gene, deren Expression durch die Regulons OxyR und SoxRS kontrolliert werden (Christman et al. 1985; Tsaneva und Weiss 1990). Zusätzlich spielen auch noch Superoxid-Dismutasen (Gort et al. 1999) oder Peroxidasen bei oxidativem Stress eine Rolle. Studien zeigen, dass die Antwort auf oxidativen Stress eng mit anderen regulatorischen Netzwerken verbunden ist (Storz und Imlay 1999).

### **pH-Änderungen**

Bakterien sind zum Teil in einer Umgebung mit niederen pH-Werten, beispielsweise bei der Lebensmittelproduktion oder in Hochmooren, anzutreffen. Um zu überleben, erhöhen sie zum einen den inneren pH-Wert durch ATPasen (Kobayashi et al 1982) oder Antiporter (Kroll und Booth 1983), zum anderen kommt es zu komplexen Änderungen des Proteoms, um säuresensitive Komponenten zu schützen. Dazu gehören alternative Sigmafaktoren, wie *rpoS* (Bearson et al. 1996), der bei verschiedenen Stressreaktionen eine Rolle spielt, als auch spezifische Signaltransduktionssysteme, zum Beispiel das PhoPQ-System (Bearson et al. 1998).

### **Sauerstoffverfügbarkeit**

Bei Änderungen der Sauerstoffkonzentration wurden bei Bakterien bereits viele regulatorische Proteinen identifiziert. Trotz der Diversität zwischen verschiedenen Organismen konnten gemeinsame Charakteristika festgestellt werden. *Escherichia coli* als fakultativ anaerobes Bakterium kann bei Sauerstoffmangel alternative Elektronenakzeptoren verwenden. Zwei globale Regulationssysteme wurden beschrieben: das Zwei-Komponenten-System ArcAB, das Funktionen der aeroben Atmung unterdrückt (Iuchi und Lin 1995) und FNR, ein Aktivator der anaeroben Signalwege (Guest et al. 1996, Kiley und Beinert 1998).

### **Osmotischer Stress**

Osmotischer Stress tritt für Bakterien dann auf, wenn die Molekülkonzentration in einer Lösung außerhalb der Bakterienzelle sich von der innerhalb der Zelle unterscheidet. Hypoosmotischer Stress führt dabei zu einer Diffusion von Wasser in die Zelle, während hyperosmotischer Stress zu einer Diffusion von Wasser aus der Zelle führt. Die Zelle beginnt zu schrumpfen und es kann zu DNA- und Proteinschäden und letztlich zum Zelltod kommen. Änderungen in der Osmolarität entstehen für Bakterien zum Beispiel in der Brackwasserzone, aber auch bei der Besiedlung ihrer Wirte, so beispielsweise bei der Kolonisierung der Harnwege (Wood 2007). Auch in der Lebensmittelindustrie kann es zu Veränderungen der Osmolarität durch Salze und somit zum Stress für die Bakterien kommen. Bakterien reagieren auf hyperosmotischen Stress durch die Akkumulation großer Mengen an Salz im Cytoplasma, um die osmotische Aktivität heraufzusetzen (meist Kalium- oder Natriumchlorid). Allerdings können große Kaliummengen störend bei Zellprozessen sein oder sind selbst toxisch (Atkinson 1979; Yancey et al. 1982). Die zweite mögliche Strategie ist die Erhöhung der Konzentration intrazellulär gelöster Stoffe mit niedermolekularen, wasserlöslichen organischen Verbindungen (Galinski und Trüper 1994), so genannten kompatiblen Soluten (Kempf und Bremer 1998; Wood 1999). Dies sind freie Aminosäuren und ihre Derivate, Zucker und Polyole, quartäre Methyamine, Sulfatester, Methylsulfonium-Verbindungen oder kleine Peptide (Csonka 1989; Imhoff 1986; Pflüger und Müller 2004; Reed et al. 1986). Sie garantieren das osmotische Gleichgewicht der Zellen zum Außenmilieu und wirken zugleich stabilisierend auf Enzyme und Zellen (Bolen 2001; Potts et al. 1994; Timasheff 1998). Die Akkumulation dieser Metaboliten geschieht einerseits durch die de novo-Synthese als auch durch die Aufnahme von außen, wobei bei nicht-halophilen Bakterien die Aufnahme energiesparender ist als ihre Synthese (Csonka 1989).

### **Nährstofflimitierung**

Bakterien werden in ihrer Umwelt mit drei verschiedenen Wachstumssituationen konfrontiert: das „normale“, schnelle Wachstum unter nährstoffgesättigten Bedingungen, das langsame Wachstum unter nährstofflimitierenden Bedingungen sowie das Nicht-Wachstum unter Bedingungen, die ein weiteres Wachstum nicht erlauben (Wick et al. 2001). Sind die Nährstoffe nicht limitiert, unterscheidet man die exponentielle und die stationäre Wachstumsphase. Die stationäre Wachstumsphase ist dadurch gekennzeichnet, dass keine Vermehrung mehr stattfindet, da die Nährstoffe weitgehend verbraucht sind, und es zu einer Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte kommen kann, so dass sich die Vermehrung mit der Absterberate die Waage hält. Die Bakterien müssen also auf Speicherstoffe und auf Nährstoffe zurückgreifen, die bei der Lyse abgestorbener Zellen frei werden (kryptisches Wachstum) (Mason et al. 1986; Ryan 1959). Befinden sich die Bakterien dagegen in der log-

Phase kann eine exponentielle Vermehrung stattfinden, da sie optimal an ihr Nährmedium adaptiert sind. In der Phase des langsamen Wachstums und der beginnenden stationären Phase bzw. des abrupten Übergangs von Wachstum zum Hunger wurden zahlreiche Untersuchungen zur Veränderung der Physiologie und Morphologie sowie deren Regulation durchgeführt (Hengge-Aronis 2002a; Hengge-Aronis 2002b; Kolter et al. 1993; Kolter 1999; Moreau 2004; Schweder und Hecker 2004; Siegele und Kolter 1992; Wright et al. 2009). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein komplexes Regulationsnetzwerk beschrieben, das neben alternativen Sigmafaktoren auch verschiedene kleinere Regulatormoleküle umfasst (Repoila et al. 2003; Riva et al. 2004; Schweder und Hecker 2004; Wick und Egli 2004), wobei die meisten Änderungen in der stationären Phase durch die alternative RNA-Polymerase RpoS reguliert werden (Saint-Ruf et al. 2007).

Mit dem Auftreten dieser verschiedenen Regulatoren werden die Eigenschaften der Bakterien, wie z.B. Kultivierbarkeit, Stoffwechsel oder Sensitivität gegenüber schädigenden Faktoren grundlegend verändert (Hengge-Aronis 2002b; Kabir et al. 2004). Unter diesen Bedingungen kann unter anderem auch die Aktivierung der Zellen zur Abwehr von Stressfaktoren und eine somit stärkere Resistenz gegenüber verschiedenen Stressoren beobachtet werden (Matin et al. 1989; Saint-Ruf et al. 2007). Zellen, die sich in der stationären Phase befinden, können zusätzlich Tage, sogar Monate ohne Nährstoffe überleben (McCann et al. 1991). Unter Substratlimitierung kommt es zu einer kokkoiden Zellform (Chen et al. 2009), wie sie ebenfalls für Mikroorganismen im VBNC (viable but nonculturable)-Stadium beschrieben werden (Jiang und Chai 1996). Der Vorteil einer Verringerung der Zellgröße unter limitierenden Bedingungen könnte in einem verbesserten Verhältnis von Zelloberfläche zum Zellvolumen gesehen werden.

Neben Veränderungen der Morphologie sind bei Bakterien eine Reihe weiterer Anpassungen an limitierende Bedingungen beobachtet worden, unter anderem die Anheftung an Oberflächen (Biofilmbildung), um dort adsorbierte organische Moleküle besser verwerten zu können (Freeman und Lock 1995). Weiterhin stellen die Bakterien verstärkt Schutzsubstanzen, wie Trehalose, und Speichersubstanzen, wie Glycogen oder Polyphosphat, her. Diese können mit der Lon-Protease einen Komplex bilden, wodurch die Degradation von freien ribosomalen Proteinen stimuliert wird (Kuroda et al. 2006). Polyphosphate spielen zudem bei weiteren Anpassungsstrategien wie der Resistenz gegen Schwermetalle, UV-Bestrahlung oder erhöhte Salzkonzentration und der Biofilmbildung eine Rolle, indem sie unter anderem an der Regulation des Sigmafaktors RpoS beteiligt sind (Kim et al. 2007; Seufferheld et al. 2008).

Weitere physiologische Anpassungsmöglichkeiten von Bakterien an nährstoffarme Lebensräume basieren auf veränderten Aktivitäten metabolischer Enzyme (Seshasayee et al. 2009). Bei der Limitierung eines bestimmten Nährstoffs erhöhen die Bakterien die

Produktion bestimmter Proteine, um den entsprechenden Nährstoff oder andere Nährstoffe der gleichen Gruppe aufzunehmen. Auch die Anzahl membrangebundener Permeasen, die für die Nährstoffaufnahme verantwortlichen sind, nimmt unter Substratlimitierung zu. So wurde zum Beispiel bei *Escherichia coli* unter Glukose-Limitierung eine 20fach verstärkte Expressierung des OmpF Proteins beobachtet (Liu und Ferenci 1998).

Die Untersuchung natürlicher Habitate zeigte, dass in vielen, möglicherweise in den meisten natürlichen Lebensräumen von Bakterien die Verfügbarkeit von Nährstoffen begrenzt ist (Molin und Givskov 1999). Einige typische Beispiele für solche nährstofflimitierten Lebensräume sind der offene Ozean, die Tiefsee, das Grundwasser, sowie viele Böden und Seen. Aber auch künstliche Wassersysteme, wie z.B. technische Anlagen oder Trinkwassersysteme, stellen nährstoffarme (oligotrophe) Habitate dar (Morita 1997). Da die meisten Habitate als oligotroph anzusehen sind, befindet sich der Großteil der Mikroorganismen in der Natur in einem Zustand des langsamen Wachstums oder in einer Art nicht-wachsendem Hungerzustand und kann somit als ein Stadium im natürlichen Lebenszyklus von Bakterien angesehen werden (Kjelleberg et al. 1993).

Da viele Gene aktiviert werden, die auch zum Überleben in Gegenwart anderer Stressoren, wie Hitze oder erhöhte Osmolarität notwendig sind, wurde die Reaktion auf eine Substratlimitierung zunehmend als reine Stressreaktion interpretiert. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Befunden der mikrobiellen Ökologie bei der Untersuchung nährstoffarmer Habitate, die nahe legen, dass der Zustand der Substratlimitierung und des Nicht-Wachstums wesentlich häufiger in der Natur vertreten sind als Wachstumsprozesse.

### **1.3 Allgemeine Anpassungsstrategien von Bakterien**

#### **1.3.1 Das VBNC-Stadium**

Erstmals wurde 1982 bei *Vibrio cholerae* und *Escherichia coli* ein Ruhestadium festgestellt, das den Bakterien nicht mehr ermöglicht, auf den üblicherweise zum Nachweis verwendeten Nährböden zu wachsen (Xu et al. 1982). Trotz des Verlusts der Kultivierbarkeit waren die Zellen jedoch nicht abgestorben, sondern lebensfähig. Dieser lebensfähige aber nicht kultivierbare Status von Bakterien, (engl.: VBNC = viable but nonculturable) wird auch für viele andere pathogene Bakterien einschließlich *Helicobacter pylori*, verschiedene Vibrionen, und *Legionella pneumophila* beschrieben (Oliver 2005; Signoretto et al. 2005). Während dieses Ruhestadiums ist der Metabolismus verlangsamt, die Zellwand verändert sich in der Fettsäure- und Proteinzusammensetzung und die Nukleinsäuren kondensieren zu einem

gewissen Maß (Oliver 2005). Wie auch bei Substratlimitierung ändert sich die Morphologie der Zellen, so kommt es beispielsweise bei Enterokokken zur Ausbildung von kleineren Zellen mit einem Zelldurchmesser von ca. 500 nm (BMBF-Projekt 02WT0488 und 02WT 0489). Bei *Vibrio cholerae* und *Vibrio parahaemolyticus* ist die Bildung kokkoider Formen beschrieben worden (Chaiyanan et al. 2007).

Die Folge dieses Ruhestadiums („dormancy“) ist eine erhöhte Toleranz oder Persistenz gegenüber feindlichen Umweltbedingungen. Ausgelöst wird der VBNC-Zustand durch Stress wie Nährstoffmangel, gravierende Temperaturveränderungen sowie chemische oder physikalische Desinfektionsmaßnahmen (Grey und Steck 2001).

Hygienisch relevant werden die VBNC-Stadien, wenn sich die Bakterien bei erneuter Veränderung zu günstigen Umweltbedingungen wieder in voll metabolisch aktive, kultivierbare Zellen zurückverwandeln. Pathogene Bakterien können so lebensungünstige Barrieren passieren und unter geeigneten Umweltbedingungen wieder zur vollen Lebensfähigkeit und Infektiosität gelangen. So konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Verdriftung von VBNC-*Vibrio cholerae* an Zooplankton im Meer kommt (Colwell 1996). Auch *Enterococcus faecalis* wird im VBNC-Zustand über Zooplankton verdriftet (Signoretto et al. 2005). Es ist ebenfalls bekannt, dass Pathogenitätsfaktoren für die Adhäsion an Wirtszellen offenbar im VBNC-Stadium erhalten bleiben (Asakura et al. 2007; Pruzzo et al. 2002). Die Möglichkeit, den VBNC-Zustand unter Stress zu erreichen und die volle metabolische Aktivität unter günstigen Lebensbedingungen wiederzuerlangen, ist genetisch determiniert, und viele Gram-negative und Gram-positive Bakterienspezies weisen dieses Potential auf (Oliver 2005). Es scheint allerdings keine typische VBNC-Gensequenz zu geben. Das VBNC-Potential ist offenbar ein Aspekt der vielfältigen bakteriellen Stressantworten und wie andere Resistenzmechanismen ähnlichen Regulationen unterworfen (Aertsen and Michiels 2004; Heim et al. 2002; Oliver 2005). Der VBNC-Zustand ist sowohl unter Labor- als auch unter Freilandbedingungen induzierbar (Colwell 2000; Oliver 2005), gleicht dem Verhalten von Bakterien in der stationären Phase (Chaiyanan et al. 2007; Oliver 2005; Roszak and Colwell 1987) und führt zu Veränderungen der Genexpression (Asakura et al. 2007; Asakura et al. 2008; Gonzalez-Escalona et al. 2006).

In der Fachwelt gehört der VBNC-Zustand zu den viel diskutierten mikrobiellen Phänomenen und ist noch nicht vollständig erforscht. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass neben dem Auftreten in natürlichen Habitaten in vielen Bereichen wie der Medizin, der Lebensmittel- und Trinkwasseraufbereitung etc. bislang unerkannte VBNC-Stadien vorkommen, die mit konventionellen Kultivierungsnachweisen nicht erfasst werden können (Dunaev et al. 2008). Möglicherweise ist dies der Grund für bakterielle Kontaminationen in aufbereiteten Produkten und desinfizierten Bereichen (Colwell 2000; Huq et al. 2000; Oliver 2000). So zeigten

Versuche mit Chlordesinfektion von Trinkwasser die dabei auftretenden VBNC-Zustände sowie die Wiedererlangung der metabolischen Aktivität nach Beendigung der Desinfektion. (McFeters and LeChevallier 2000).

### 1.3.2 Biofilme

Die Ausbildung von Biofilmen ist eine effiziente und weitverbreitete Möglichkeit für Mikroorganismen sich vor Umweltstress zu schützen. Der Begriff Biofilm beschreibt dabei eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die innerhalb einer selbst produzierten extrazellulären polymeren Matrix (EPS: extrazelluläre polymere Substanzen) eingeschlossen sind und sich auf einer Grenzfläche ansammeln (Emtiazi et al. 2004; Gehrke et al. 2001). Die meisten Bakterien kommen in ihren natürlichen Lebensräumen in einen Biofilm vor.

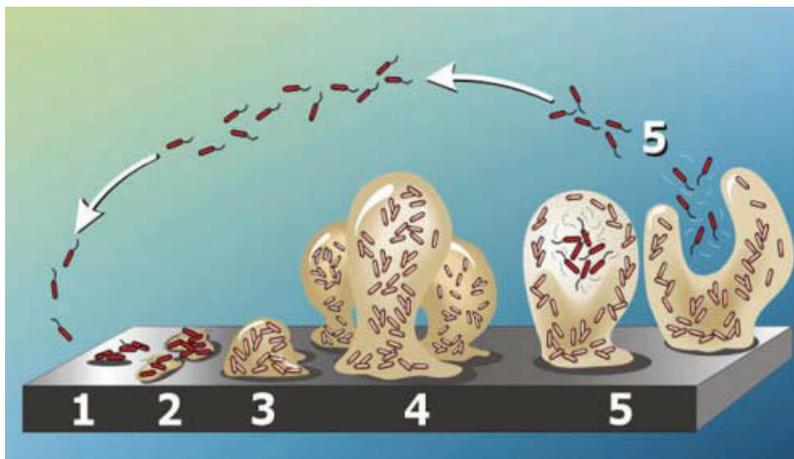
Beim Menschen werden verschiedene Grenzflächen besiedelt, zum Beispiel Haut, Zähne, Bereiche des Respirationstraktes und die Darmschleimhaut. Unter geeigneten Bedingungen können alle Bakterien einen Biofilm aufbauen. So bilden Staphylokokken häufig Biofilme auf implantierten medizinischen Geräten, wie intravenöse Katheter, Hüft- und Knieprothesen (Götz et al. 2002). *Pseudomonas aeruginosa* verursacht in ähnlicher Weise regelmäßig Infektionen bei Verbrennungen und anderen Wunden. Biofilme spielen also eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von Infektionen des Menschen. Wegen der teilweisen Resistenz dieser Strukturen gegen eine Reihe von antimikrobiellen Substanzen und gegen das Immunsystem des Menschen ist es schwierig, solche Infektionen wirksam zu behandeln. Auch bei technischen Prozessen und in der industriellen Produktion sind Biofilme von Relevanz. Trotz der anliegenden Bedingungen in technischen Prozessen, die für das Wachstum von Bakterien oftmals nicht optimal sind, wachsen Mikroorganismen als Biofilme auf Oberflächen. Bilden sich innerhalb technischer Anlagen Biofilme, die sich störend auf die Betriebsweise oder das herzustellende Produkt auswirken, so wird von Biofouling gesprochen, das mit erheblichen Kosten verbunden sein kann. Biofilme sind jedoch auch in ihrer Wirkung als „biologischer Filter“ ein entscheidender und bewährter Bestandteil der Aufbereitungstechniken.

Wichtig sind in diesem Zusammenhang auch die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) als Reaktionsraum. Die EPS sind organische Polymere (Kumar et al. 2007), die hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen, Nukleinsäuren und Lipiden bestehen. Sie dienen sowohl der Stabilität, der Sorption von Wasser, organischen und anorganischen Molekülen als auch als Diffusionsbarriere. Durch die Immobilisierung von Exoenzymen in der unmittelbaren Umgebung der Zelle kann die Effizienz des Abbaus, zum Beispiel von partikulärem Material, deutlich verbessert und die Aufnahme von

Spaltprodukten begünstigt werden (Romani et al. 2008). Von besonderer technischer Relevanz sind diese Fähigkeiten im Hinblick auf die Zerstörung von Materialien (Gilbert et al. 1990).

Für Mikroorganismen selbst stellt der Biofilm einen Schutz- und Lebensraum dar, der ein symbiotisches Zusammenleben verschiedenster Arten begünstigt. Vorteil gegenüber der planktonischen Lebensweise ist vor allem der Schutz vor Umwelteinflüssen, welche in Form von Austrocknung, extremen pH-Werten, Desinfektionsmitteln oder Antibiotika (Hoyle und Costerton 1991) sowie von Scherkräften auftreten können.

Zusätzlich kommt es zu einer besseren Versorgung mit metabolisierbaren Substraten an einer Oberfläche durch die ständige Adsorption und die dadurch erfolgende Konzentrierung der Nährstoffe. Durch Metabolite eines spezifischen Substratabbaus kann sich beispielsweise ein Biofilm entwickeln, der eine mögliche Grundlage für neue Besiedlungen von Mikroorganismen ist, die mit dem Ausgangsstoff alleine nicht hätten wachsen können. Es konnte gezeigt werden, dass sich Stämme von *Escherichia coli* in Biofilmen von Umweltbakterien vermehren können, obwohl sie im freien Wasser nicht wachsen konnten. Es wird daher angenommen, dass Umweltbakterien in den Biofilmen Nährstoffe abgeben, die von *Escherichia coli* zum Wachstum benötigt werden (Banning et al. 2003).



**Abb. 1.1: Stadien der Biofilmentwicklung.** 1: initiales Anheften; 2: irreversibles Anheften; 3: Maturation I; 4: Maturation II; 5: Streuung.  
([http://www.myutahwater.com/umws\\_biofilm.htm](http://www.myutahwater.com/umws_biofilm.htm))

Für eine Etablierung großer bakterieller Ökosysteme ist der Informationsaustausch zwischen den am Biofilm-Aufbau beteiligten Mikroorganismen notwendig. Dieser Informationsaustausch sorgt für die Regulation der Genexpression, welche die geordnete Bildung des

Biofilmsystems ermöglicht (Fuqua und Greenberg 1998; Kjelleberg 2002) und wird als Quorum sensing bezeichnet. Bei den dabei eingesetzten Signalmolekülen handelt es sich bei Gram-negativen Bakterien um eine Gruppe verschiedener N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL), bei Gram-positiven Bakterien meist um posttranslational modifizierte Peptide. Diese Moleküle spielen eine wichtige Rolle für die Ökologie komplexer bakterieller Konsortien, da sie sowohl die Kommunikation innerhalb der Bakterienpopulation als auch die mit dem eukaryotischen Wirt ermöglichen. Dies erlaubt den Bakterien sich an ständig wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, um so ihr Überleben zu sichern.

Im Vergleich zu planktonischen Bakterien besitzen Biofilme also eine erhöhte Stresstoleranz, die sie auf äußere Einflüsse besser reagieren lässt. Die Erforschung dieser Stresstoleranz würde einen genaueren Einblick in Biofilme geben und zudem die Möglichkeit aufweisen, diese zu manipulieren und zu vermeiden. Durch die Analyse der Genexpression von *Escherichia coli* während der Biofilmbildung wurde gezeigt, dass in verschiedenen Phasen der Biofilmbildung unterschiedliche Gene exprimiert werden (Beloin et al. 2004; Schembri et al. 2003). Für die initiale Phase sind unter anderem Proteine relevant, die für Adhäsion und Aggregation wichtig sind, aber auch solche, die eine Anpassung an sauerstoff- und nährstofflimitierende Bedingungen widerspiegeln (Schembri 2003).

In einem reifen Biofilm hingegen kommt es vor allem zur Expression von Genen der Stressantwort, interessanterweise besonders die zur Regulation der extrazytoplasmatischen Stressantwort (Beloin 2004). Generell gibt es dabei Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zum Wachstum der Bakterien in der stationären Phase, was sich in der Expression von Genen widerspiegelt, die durch den Sigmafaktor RpoS reguliert werden. Insgesamt ist in Biofilmen eine 1% - 38%ige Änderung der Genexpression beschrieben worden (Sauer 2003). *Escherichia coli* ist in Biofilmen einem erhöhten osmotischen Druck und einer verringerten Sauerstoffverfügbarkeit ausgesetzt (Prigent-Combaret et al. 1999). Für diese physikalisch-chemischen Parameter sind in Bakterien verschiedene Wahrnehmungssysteme beschrieben worden, wie z.B. das Rcs-Zwei-Komponentenregulationssystem, das an der Osmoregulation beteiligt ist (Ferrieres et al. 2003).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Oberflächenwahrnehmung durch Bakterien sind bis jetzt nur im Ansatz erforscht. Signaltransduktionssysteme, die extrazelluläre Reize wahrnehmen und durch die Bakterienmembran an Transkriptionsfaktoren weiterleiten, spielen eine entscheidende Rolle für die Reaktion auf eine Interaktion mit Oberflächen. Betrachtet man die Bedeutung der Oberflächenadhäsion für die Pathogenität von Bakterien, angefangen von der Besiedlung eines Habitats im Wirt bis zur Invasion intrazellulärer Erreger und auch der Biofilmbildung, ist offensichtlich, dass diese Untersuchungen zur

Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der Oberflächenwahrnehmung essentiell sind. Diese Informationen können zu einem besseren Verständnis von Stressreaktionen, insbesondere der Biofilmbildung, beitragen. So wäre es möglich, gezielt diese bakteriellen Populationen zu vermeiden oder sie zum Nutzen einzusetzen.

## 1.4 Untersuchte Regulatoren bei Anpassungsstrategien von Bakterien

Das folgende Kapitel beschreibt die in dieser Arbeit untersuchten Gene, deren Expression bei verschiedensten Stressparametern verändert sein kann:

- das *rpoS*-Gen gilt als Masterregulator bei verschiedenen Stressparametern
- das *rcaA*-Gen ist in die Biofilm- und EPS-Synthese, als Antwort auf verschiedene Umweltstimuli, involviert
- das *pbp5*-Gen spielt eine Rolle bei der Synthese der Zellwand, die zuerst von Änderungen in der Umgebung betroffen ist
- die „universelle Stressprotein“ (Usp)-Familie ist eine konservierte Proteingruppe, die an der Reaktion auf verschiedenen Stressoren beteiligt ist

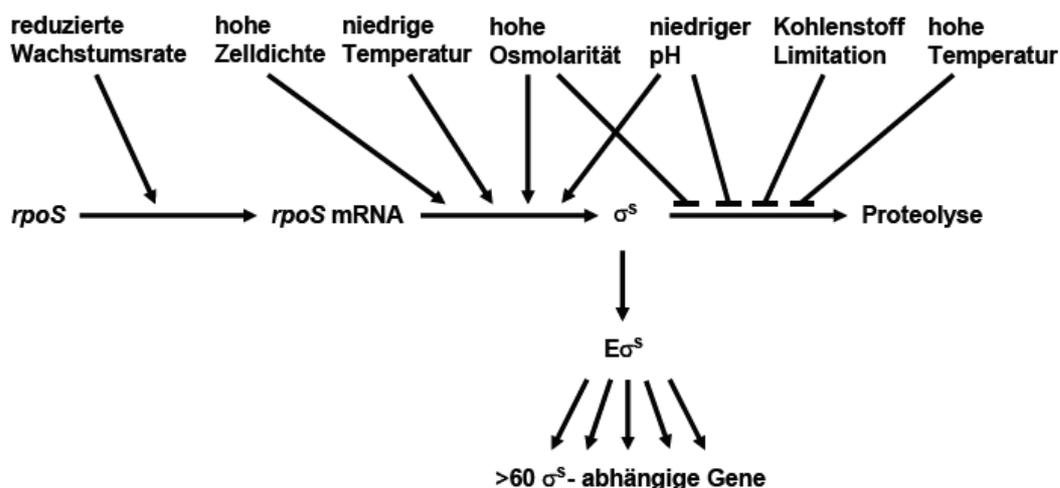
### 1.4.1 Das *rpoS*-Gen

RpoS ist ein Sigmafaktor, der unter Stressbedingungen die Expression eines speziellen Gen-Sets induziert, das für die Synthese von Proteinen für die zellulären Schutzfunktionen verantwortlich ist. Aufgrund der zahlreichen Funktionen des *rpoS*-Regulons wurde das *rpoS*-Gen mehrmals unabhängig entdeckt und zunächst unterschiedlich benannt (Loewen and Triggs 1984; Sak et al. 1989). 1991 wurde ihm als *csi*-Gen („carbon-starvation induced“) die Funktion des zentralen Regulators für die in der stationären Phase induzierten Gene zugeordnet (Lange und Hengge-Aronis 1991). Studien belegten später, dass die *rpoS*-abhängigen Gene nicht nur während der stationären Phase induziert werden, sondern auch als Antwort auf vielfältige Stresssituationen (Hengge-Aronis 1996; Hengge-Aronis et al. 1993; Lee et al. 1995; Muffler et al. 1997; Muffler et al. 1996). Infolgedessen wird das *rpoS*-Gen inzwischen als Masterregulator der generellen Stressantwort angesehen, der die bakterielle Zelle nicht nur dazu befähigt, den aktuellen Stress zu überleben, sondern darüber hinaus auch die Resistenz gegenüber anderen Stresssituationen fördert (Hengge-Aronis 2002b). Somit steht RpoS der spezifischen Stressantwort gegenüber, welche vorrangig der Eliminierung der Stressquelle dient und/oder die Reparatur der bis dahin verursachten

Schäden vermittelt (Matic et al. 2004). Die Hauptfunktion der generellen Stressantwort hingegen liegt in der Prävention, was sich in der *rpoS*-bedingten multiplen Stress-Resistenz widerspiegelt (Hengge-Aronis et al. 1993; McCann 1991).

Insgesamt ist bei *Escherichia coli* eine Kontrolle von mehreren hundert Genen durch RpoS bei Stressexposition beschrieben worden (Klauck et al. 2007). Auch bei Pseudomonaden spielt RpoS eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Stressfaktoren (Jorgensen et al. 1999; Suh et al. 1999) und wird neben der Stressresistenz auch mit der Produktion bestimmter Polymere, wie Alginat oder Virulenzfaktoren (Hogardt et al. 2004; Venturi 2003) sowie mit der Resistenz gegenüber Antibiotika in Verbindung gebracht (Potvin et al. 2008). RpoS ist ebenfalls in die Biofilmbildung als Stressantwort involviert (Collet et al. 2008), unter anderem durch die Regulation des Quorum sensing (Davies et al. 1998; Lafiti et al. 1996; Venturi 2006). Des Weiteren soll *rpoS* am programmierten Zelltod in der stationären Phase beteiligt sein (Bishop et al. 1998).

Allerdings wurden auch Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass ein Verlust oder eine Abschwächung der RpoS-Aktivität unter bestimmten Bedingungen von Nutzen sein kann (Robbe-Saule et al. 2003). Es wird berichtet, dass es zu Mutationen des *rpoS*-Gens in der stationären Phase (Chen et al. 2004) oder bei osmotischem Stress (Ferenci et al. 2007) kommt, die zu einem Aktivitätsverlust von RpoS führen. *rpoS*-defiziente *Escherichia coli*-Stämme synthetisieren bei osmotischem Stress verstärkt extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) (Ionescu und Belkin 2009).



**Abb. 1.2: Regulationsebenen von *rpoS*.** Die zelluläre Menge an  $\sigma^S$  wird durch verschiedene Stressparameter auf den Ebenen der *rpoS* Transkription, Translation oder  $\sigma^S$  Proteolyse reguliert (aus Hengge-Aronis 2002b).

Es wird davon ausgegangen, dass der Vorteil, der aus der Herunterregulierung des *rpoS*-Gens resultiert, aus dem Wettbewerb zwischen den Sigma-Faktoren RpoS und Sigma70 erfolgt (Farewell et al. 1998) und keinen direkten Effekt von RpoS selbst darstellt (King et al. 2006).

#### 1.4.2 Das *rcsA*-Gen

Das Rcs-System (regulator of capsule synthesis) wurde erstmals in *Escherichia coli* identifiziert, wo es für die transkriptionelle Kontrolle des Colansäure-Clusters verantwortlich ist (Gottesman et al. 1985) und konnte später auch in *Klebsiella*-, *Salmonella*- und *Erwinia*-Spezies nachgewiesen werden (Bereswill und Geider 1997; Coleman et al. 1990; Poetter und Coplin 1991; Stout et al. 1991). Das speziesübergreifend konservierte Rcs-System besteht aus drei Proteinen: RcsA, RcsB und RcsC. Das zentrale Element dieses Regulationsmechanismus bildet ein Zwei-Komponenten-System aus RcsC und RcsB.

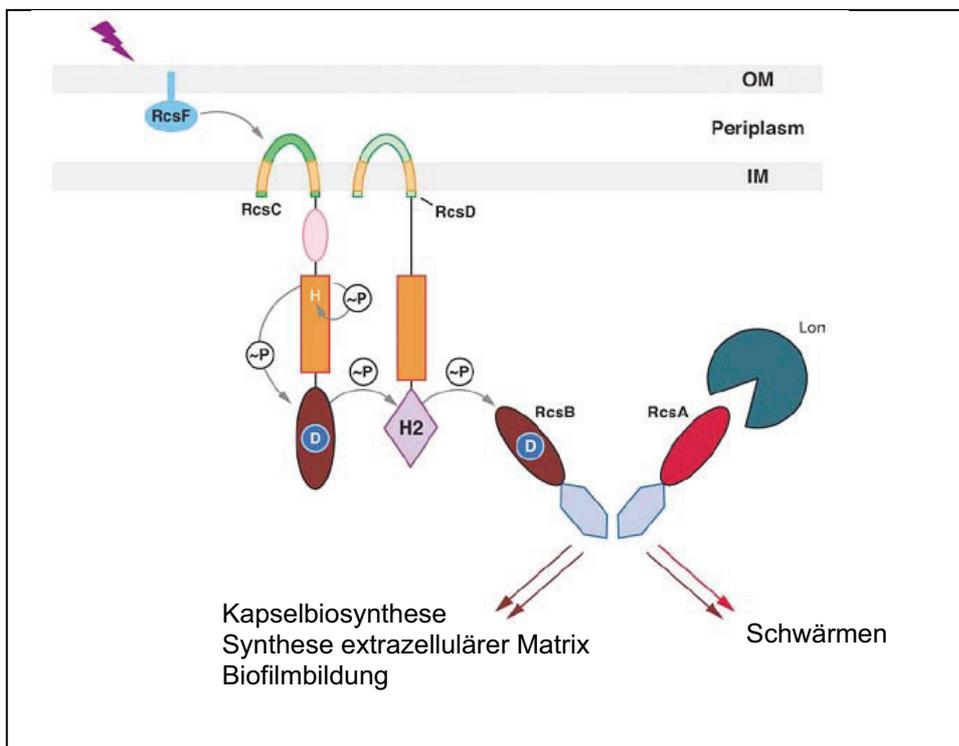
Bei dem Rcs-System nimmt RcsC die Änderungen der Umweltbedingungen wahr und leitet es über Phosphorylierungen an den Regulator (RcsB) weiter, der daraufhin als Transkriptionsfaktor wirkt und an die DNA bindet (Majdalani und Gottesman 2005; Takeda et al. 2001) (siehe Abbildung 1.3). Allerdings unterscheidet sich das Rcs-System in einigen Punkten von anderen, „klassischen“ Zwei-Komponenten-Systemen.

Die wichtigste Erweiterung des Rcs-Systems gegenüber anderen Zwei-Komponenten-Systemen stellt das Regulatorprotein RcsA dar. Es konnte am Beispiel des Rcs-Systems von *Erwinia amylovora* gezeigt werden, dass RcsA als Koinduktor mit RcsB ein Heterodimer bildet, dessen DNA-Bindungsaktivität größer ist als die der isolierten Proteine (Kelm et al. 1997). Das RcsA-Protein stellt somit einen wichtigen Zusatz des Rcs-Systems dar und fungiert als positiver Regulator der Kapselbiosynthese. Die Komplexität des Rcs-Signalwegs beruht auf der Entdeckung, dass RcsB alleine (Boulanger et al., 2005; Francez-Charlot et al., 2005) oder in Wechselwirkung mit RcsA an spezifischen Promotoren (Ebel und Trempey, 1999) wirken kann. Für die RcsA-unabhängige Klasse der RcsB-regulierten Gene liegt die Bindestelle in der Nähe der -35-Region (Davalos-Garcia et al. 2001), während sie sich für die RcsA-abhängige Regulation entweder weiter upstream (Wehland und Bernhard 2000) oder downstream (Francez-Charlot et al. 2003) des Promotors befindet. Sowohl RcsA als auch RcsB sind in verschiedenen Spezies mit 51% bzw. 93% Identität hoch konserviert.

So startet das Rcs-System zusammen mit RcsA diverse Regulatormechanismen und stellt somit eine Stressantwort dar. Dabei kontrolliert das Rcs-System unter anderem die Synthese der extrazellulären Matrix in *Escherichia coli* (Rahn und Whitfield 2003; Virlogeaux et al. 1996) und spielt eine Rolle bei der Biofilmbildung (Danese et al. 2000). Es reguliert das

Schwärmen von Bakterien (Francez-Charlot et al. 2003) und ist an der Antwort auf Austrocknung durch die Kapselbiosynthese und Änderung der Osmolarität und Membranzusammensetzung beteiligt (Ferrieres et al. 2003). Allerdings sind bis heute keine Untersuchungen des *rcaA*-Gens unabhängig vom gesamten Signalweg bei Stress durchgeführt worden.

Polysaccharid-Kapseln können die Haftung von Bakterien sowohl an Oberflächen als auch an andere Bakterien fördern. Dies wiederum würde die Bildung von Biofilmen und damit auch die Kolonisierung ansonsten schwierig erreichbarer Umgebungen erleichtern (Costerton et al. 1987). Auch bei der Infektion von einem geeigneten Wirtsorganismus und beim Schutz der Zelle vor dessen Abwehrmechanismen spielt die Kapsel eine große Rolle. Große Mengen des „schleimigen“ Exopolysaccharids können sowohl die Permeabilität der Zellmembran für Antibiotika stark herabsetzen als auch durch Maskierung von Zelloberflächenstrukturen Immunreaktionen, wie z.B. die Phagocytose oder den Angriff von Antikörpern, verhindern bzw. verlangsamen (Horwitz und Silverstein 1980; Moxon und Kroll 1990).



**Abb. 1.3: Der Rcs-Signalweg.** OM: outer membrane (äußere Membran), IM: inner membrane (innere Membran), nach Majdalani und Gottesman 2005.

Das RcsA-Protein wird unter anderem durch die Lon-Protease reguliert, welche eine Funktion bei der Zell-Differenzierung, Sporenbildung, Pathogenität und dem Überleben bei

Nahrungsmangel übernimmt (Lan et al. 2007; Luo et al. 2008). Die Lon-Protease hat in der Zelle eine Halbwertszeit von ca. 30 Sekunden und ist in uninduzierten Bakterien in praktisch nicht nachweisbaren Konzentrationen vorhanden. Sie stellt also den limitierenden Faktor der EPS-Biosynthese dar, da es in Abwesenheit der Lon-Protease in *Escherichia coli* zur Anreicherung des RcsA-Proteins kommt (Trisler und Gottesman 1984; Torres-Cabassa und Gottesman 1987; Stout et al. 1991). Die Lon-Protease ist auch an der Regulation anderer Gene beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass es bei Lon-defizienten *Escherichia coli* zu einer Induktion vieler Gene der *rpoS*-vermittelten Stressantwort kommt, wobei das Niveau oder die Aktivität von *rpoS* nicht beeinflusst wurde, was darauf schließen lässt, dass die Lon-Protease auf sekundäre Regulatoren wirkt, die an der Kontrolle *rpoS*-kontrollierter Gene beteiligt sind (Heuveling et al. 2008).

### 1.4.3 Das *pbp5*-Gen

Die Zellwand von Bakterien ist robust, um die Zellgeometrie aufrecht zu erhalten und dient als Schutz vor widrigen Umweltbedingungen. So ist sie die erste Stelle an der es zu einer Stressreaktion der Bakterien kommt. Sie ist aber auch flexibel, um Zellwachstum, Zellteilung und Transportvorgänge in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus zu ermöglichen.

Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterscheiden sich im Aufbau ihrer Zellwände, besitzen beide aber eine Cytoplasmamembran, auf die die Zellwand aufgelagert ist. Bei Gram-positiven Bakterien besteht diese aus vielen Schichten Peptidoglykan (Murein), in welche (Lipo)teichonsäuren und Proteine eingelagert sind. Bei Gram-negativen Mikroorganismen dagegen liegt auf der Cytoplasmamembran nur eine dünne Peptidoglykanschicht, auf der eine zweite, äußere Zellmembran, die sich aber von der Cytoplasmamembran unterscheidet, aufgelagert ist. Diese äußere Membran durchziehen Proteine, wie Porine, und sie weist außen Lipopolysaccharide auf, weshalb sie auch als Lipopolysaccharidschicht bezeichnet wird.

Murein besteht aus Strängen zwei miteinander verknüpfter Zuckerderivatmoleküle, N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, wobei die parallel angeordneten Stränge quervernetzt sind. Beim Wachstum eines Bakteriums muss das Mureinnetz erweitert werden, ohne dass eine größere Lücke entsteht. In dem außerhalb der Cytoplasmamembran gelegenen Mureinnetz werden durch spezifische lytische Enzyme lokal begrenzt Bindungen in den Rückgratsträngen und in den Oligopeptiden gelöst und die Mureinbausteine durch spezifische Enzyme integriert. Diese Enzyme können zum Beispiel die Penicillin-bindenden Proteine (PBPs) sein (Magnet et al. 2008). Sie katalysieren die Quervernetzung benachbarter Glykanstränge, d.h. sie sind essentiell für die Mureinsynthese, wobei sie

verschiedene Aufgaben wie Transpeptidierungen, Transglycosylierungen, Endo- und Carboxypeptidierungen übernehmen können (Goffin und Ghuysen 1998). Ihren Namen verdanken die Proteine ihrer Fähigkeit,  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Penicilline) zu binden, wodurch diese inaktiviert werden (Young 2001).

Jede Bakterienspezies besitzt eine bestimmte Anzahl verschiedener PBPs, die abhängig von der Größe durchnummeriert werden. Inzwischen sind sehr viele Sequenzen von PBP-Genen und entsprechend abgeleitete Proteinsequenzen bekannt. Homologievergleiche erlauben die Einteilung in drei Klassen: hochmolekulare PBPs der Klasse A und B, die für die Polymerisation und den Einbau in die bereits existierende Zellwand des Peptidoglykans verantwortlich sind (Born et al. 2006) sowie niedermolekulare PBPs. Enterokokken besitzen je 3 hochmolekulare PBPs der Klasse A und B (Arbeloa et al. 2004) und ein niedermolekulares PBP (el Kharroubi et al. 1989), wobei PBP5 zu den hochmolekularen PBPs der Klasse B gehört (el Kharroubi et al. 1991).

Hohe Resistenzen gegen Antibiotika, wie sie in klinischen Isolaten beobachtet werden, sind das Resultat von sehr komplexen Veränderungen, wie Überexpression oder verminderte Affinität (Rybkin et al. 1998), die nicht nur ein, sondern mehrere PBPs betreffen (Muñoz et al. 1992; Reichmann et al. 1997). Bei Enterokokken ist bei der Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika vor allem PBP5 von Bedeutung (Rice et al. 2001; Zapun et al. 2008).

In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass *Enterococcus faecalis* zum VBNC-Stadium (viable but nonculturable) fähig ist und damit unter natürlichen Bedingungen persistieren kann (Lleo et al. 2001; Lleo et al. 2005). Der Übergang in das VBNC-Stadium ist von Veränderungen in der Zellmembran gekennzeichnet, die zum spezifischen Nachweis dieser Stadien verwendet werden können. Besonders signifikant sind die vermehrten Anteile des Penicillin-bindenden Proteins 5 in der Zellwand (Signoretto et al. 2000).

#### **1.4.4 Die „universelle Stressprotein“ (Usp)-Familie**

Die Superfamilie der Usp-Proteine besteht aus einer konservierten Proteingruppe, die sowohl in Bakterien und Archaeen als auch in Eukaryoten vorkommt (Kvint et al. 2003) und bei einer Vielzahl verschiedener Stressparameter eine Rolle spielt. Viele Organismen besitzen dabei ein ganzes Repertoire an Usp-Proteinen. Diese Proteine liegen vielfach als „single-type“ Proteine vor und bestehen aus einer einzigen konservierten Usp-Domäne (ca. 140-160 Aminosäuren) (Bateman et al. 2004). In einigen Fällen sind zwei Usp-Domänen direkt hintereinander auf einer Polypeptidkette lokalisiert („tandem-type“-Usp-Proteine) (Nachin et al. 2005).

*Escherichia coli* besitzt insgesamt 6 über das gesamte Chromosom verteilte Gene, die für Proteine der Usp-Proteinfamilie kodieren und vermutlich durch Genduplikation entstanden sind (Gustavsson et al. 2002). Dazu gehören die Gene *uspA*, *uspC*, *uspD*, *uspE*, *uspF* und *uspG*, von denen einige in enger Nachbarschaft zu anderen Genen lokalisiert sind, deren Produkte wichtige Funktionen bei verschiedensten Stresssituationen übernehmen (Kvint et al. 2003).

Die *usp*-Genprodukte können aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen in zwei Subfamilien, die UspA-Subfamilie und die UspFG-Subfamilie, unterteilt werden (Gustavsson et al. 2002). Drei Usp-Proteine, UspA, UspC und UspD gehören zu der UspA-Subfamilie. Zwei weitere Proteine, UspF und UspG können der zweiten UspFG-Subfamilie zugeordnet werden. Bei dem sechsten Usp-Protein UspE handelt es sich um ein „tandem-type“-Usp-Protein, das aus zwei Usp-Domänen besteht. Die Kristallstrukturen mehrerer Usp-Proteine konnten aufgeklärt werden (Sousa und McKay 2001; Zarembinski et al. 1998), und es wurde gezeigt, dass Usp-Proteine einer Klasse in der Lage sind, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden (Nachin et al. 2008).

Anhand von Untersuchungen bei *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass das UspA-Protein eine wichtige Rolle beim Überleben in verschiedenen Stresssituationen spielt. So konnte bei wachstumsinhibierenden Bedingungen, wie bei höheren Mengen an Wasserstoffperoxid und osmotischem Stress (1 M NaCl), in *uspA*-Mutanten eine starke Reduktion der Überlebensrate nachgewiesen werden (Nyström und Neidhardt 1994). Das UspA-Protein wird dabei unter verschiedensten Bedingungen, wie dem Eintritt in die stationäre Phase (Liu et al. 2007), bei Nährstofflimitation von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphat, Schwefel und Aminosäuren, sowie bei moderater Hitze (bis 42°C) (Nyström und Neidhardt 1992), Ethanolstress (4%), osmotischem Stress, hohen pH-Werten (Yohannes et al. 2004) und in Anwesenheit einer ganzen Reihe toxischer Substanzen, beispielsweise bei Mitomycin C (Diez et al. 2000) oder Wasserstoffperoxid, verstärkt synthetisiert. Diese Bedingungen führen ebenfalls zu einer verstärkten Neusynthese der Usp-Proteine UspC, UspD und UspE in *Escherichia coli*, was für eine koordinierte Regulation spricht. Lediglich bei Kälteschock scheint die Synthese von UspA nicht induziert zu werden (Nyström und Neidhardt 1993). UspC wiederum wirkt als Gerüstprotein der KdpD/KdpE-Signalkaskade, indem es mit der Usp-Domäne von KdpD bei osmotischem Stress interagiert (Heerman et al. 2009).

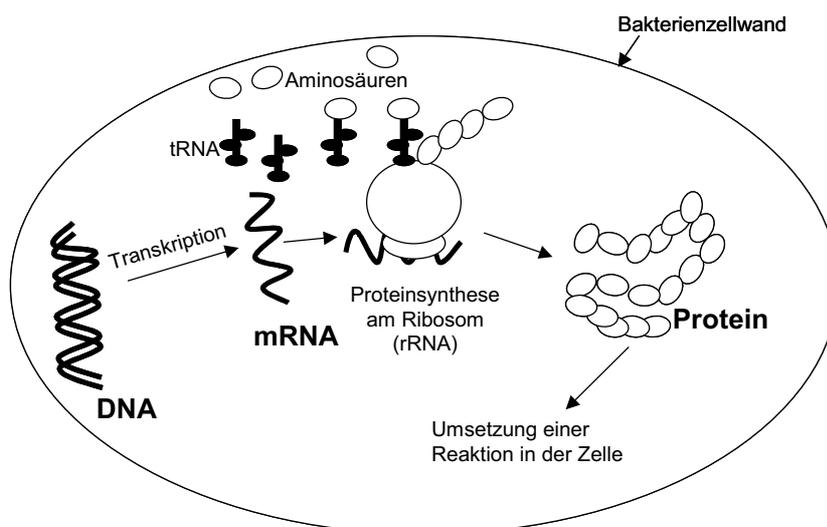
Für UspA, UspC, UspD und UspE konnte weiterhin eine wichtige kooperative Funktion bei der Resistenz gegen UV-Schäden gezeigt werden. Es werden alle 4 Usp-Proteine benötigt, um eine Resistenz zu ermöglichen, aber dennoch führen Mutationen in nur einem der *usp*-Gene bereits zu einer deutlichen Reduktion der Überlebensrate (Gustavsson et al. 2002).

Neben den *usp*-Genen bei *Escherichia coli* wurden auch bei anderen Organismen, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (Liu et al. 2007), *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella sonnei* (Chen 2007), *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*, *usp*- oder *usp*-ähnliche Gene beschrieben.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* sind verschiedene *usp*-Gene bekannt, von denen *uspK* (PA3309), *uspN* (PA4352), *uspL* (PA1789), *uspM* (PA4328) und *uspO* (PA5027) bei der Überlebensrate bei anaeroben Nährstoffmangel eine Rolle spielen (Schreiber et al. 2006; Boes et al. 2006; Boes et al. 2008). Auch bei dem pathogenen Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* wurde eine Beteiligung der Usp-Proteine beschrieben, um anaeroben Nährstoffmangel auszugleichen (O'Toole und Williams 2003).

### 1.5 Molekulare Grundlagen der angewandten Nachweismethoden

Die Expression der genetischen Information umfasst die Übersetzung der Nukleotide zum Protein (siehe Abbildung 1.4). Zuerst wird ein Gen in eine komplementäre Nukleotid-Kette von mRNA kopiert (Transkription) und anschließend in Protein übersetzt (Translation). Die mRNA macht etwa 5% der Gesamt-RNA der Zelle aus und hat eine kurze Lebensdauer. Die rRNA (ribosomale RNA) ist der Hauptbestandteil der Ribosomen, relativ stabil und macht den größten Teil der Gesamt-RNA aus (ca. 80%). Die tRNA bildet etwa 15% der Gesamt-RNA in der Zelle.



**Abb. 1.4:** Schema der Proteinbiosynthese.

Zum Nachweis der speziesspezifischen Gene und der möglichen universellen Stressgene und deren Induktion bzw. Repressionen wurden verschiedene molekularbiologische Methoden auf RNA-Ebene angewandt. Dafür wurde Gesamt-RNA aus den mit verschiedenen Stressoren behandelten Zellen isoliert. Nach photometrischer Quantifizierung des RNA-Gehalts wurde die Gesamt-RNA über das Northern Blot-Verfahren analysiert. Dafür wurden Gen-spezifische, Digoxigenin-markierte Sonden erstellt. Weiterhin wurde die mRNA mittels einer Reverse Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend mit spezifischen Primern und zum Teil mit fluoreszenzmarkierten Sonden in eine Real-Time-PCR eingesetzt. Die Induktion bzw. Repressionen der Gene konnte somit quantifiziert werden. Die Genexpressionsanalyse ist dabei ein wichtiger Bestandteil der Mikrobiologie. Solche Expressionsanalysen dienen der Identifikation von Genen und ihrer Regulation sowie der Aufklärung von physiologischen Signalwegen in Organismen.

Zur Analyse der molekularen Unterschiede nach Stressexposition, die nicht für ein Bakterium spezifisch waren, wurde die cDNA amplifiziert und gelelektrophoretisch getrennt. Dazu wurde einerseits die Gesamt-RNA bzw. die durch reverse Transkription entstandenen cDNA durch verschiedene Enzyme und Adapter modifiziert, um bekannte Sequenzen für die Amplifikation zur Verfügung zu haben. Andererseits wurden degenerierte Primer verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer konnten an die Shine-Dalgarno-Sequenz binden (Ping et al. 2008). Diese befindet sich bei Bakterien sieben bis neun Nukleotide upstream des AUG-Kodons am 5'-Ende der mRNA. Auf diese Weise wird eine Amplifikation ausschließlich der mRNA, also dem Transkript aktiver Gene, gewährleistet. Eine weitere Möglichkeit war der Gebrauch von random hexamer Primern (Peng et al. 1994), die aufgrund ihrer nicht näher bekannten Zusammensetzung und Sequenz, unbekannte Nukleinsäuren amplifizieren können.

## **1.6 Aufgabenstellung**

Ziel der Arbeit war es, bei hygienisch relevanten Bakterien speziesunabhängig molekulare Unterschiede als Antwort auf verschiedenen Stressparameter zu beschreiben, um physiologische Zustände von Bakterien in ihrem natürlichen Habitat zu erkennen. Dies soll zu Maßnahmen führen, bakterielle Populationen direkt vor Ort zu manipulieren. Untersucht wurden dabei sowohl spezifische Regulatoren zur Parametrierung und mögliche universelle Stressgene als auch Methoden, die Anpassungsstrategien speziesunabhängig anzeigen.

Die Abbildung 1.5. zeigt schematisch die Aufgabenstellung, Abbildung 1.6. das methodische Fließschema der vorliegenden Arbeit.

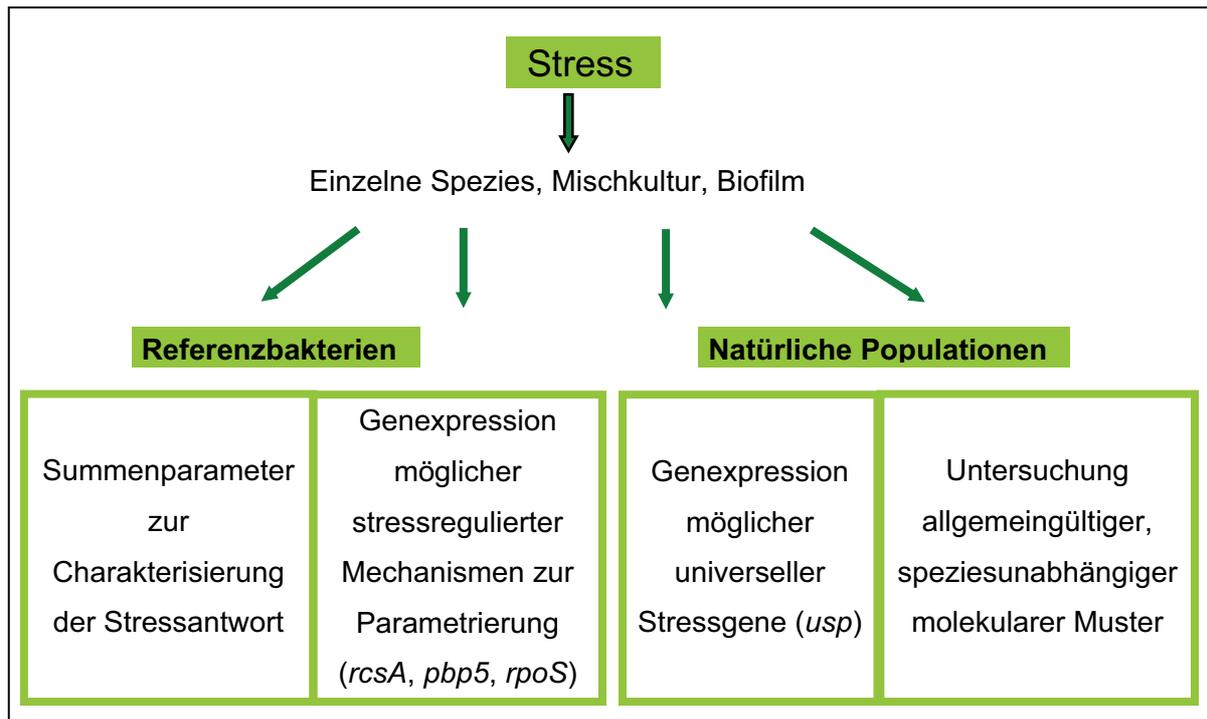


Abb. 1.5: Aufgabenstellung.

**Fragestellungen:**

Ergeben sich physiologische Unterschiede bei Stressexposition zwischen typisch hygienisch relevanten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien?

Untersucht wurden Summenparameter wie Gesamt-RNA-Gehalt und Anzahl der Koloniebildenden Einheiten. Bei den Gram-positiven Bakterien wurde zusätzlich eine Unterscheidung zwischen kultivierbaren und nicht-kultivierbaren Zellen getroffen.

Bei welchen Stressparametern und bei welcher Inkubationsdauer ergeben sich relevante Genexpressionsmuster?

Mit Hilfe der quantitativen PCR und Northern Blot-Analysen wurde auf mRNA-Ebene die Genexpression der möglichen speziesspezifischen Regulatoren *rpoS* von *Pseudomonas aeruginosa*, *rcaA* von *Escherichia coli* und *pbp5* von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* näher untersucht. Es wurden Kinetiken bei verschiedenen Stressoren aufgenommen und für die verschiedenen Gene spezifische Primer und Sonden hergestellt.

Gibt es Gene, die über Speziesgrenzen hinweg induziert oder reprimiert werden?

Mit den festgelegten Stressparametern, osmotischem Stress und Hungerstress bei einer

Inkubationsdauer von 5 Tagen sowie der Entnahme während verschiedener Wachstumsphasen, wurde die Genexpression des möglicherweise spezies-übergreifenden Stressgens *usp* (universal stress protein) gemessen.

Zeigen sich auf molekularer Ebene Stressmuster auch ohne die Durchführung von Expressionsanalysen einzelner, vorher selektierter Gene?

Für diese Fragestellung wurden die cDNA und DNA mittels verschiedener Methoden amplifiziert, elektrophoretische aufgetrennt und die entstandenen Muster verglichen.

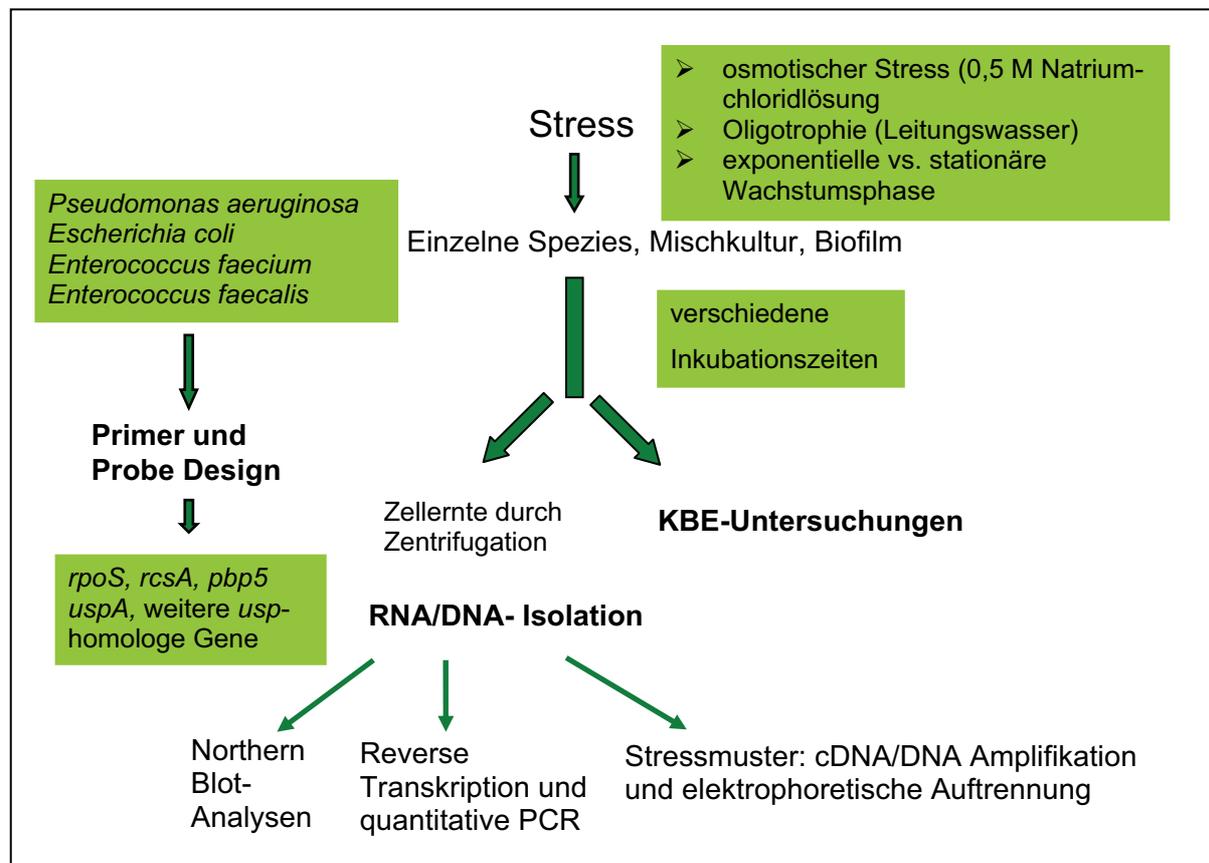


Abb. 1.6: Methodisches Fließschema der Arbeit.

### Ausgewählte Bakterien:

Die im Folgenden beschriebenen Mikroorganismen wurden in dieser Arbeit als Modellorganismen untersucht, da sie in der Umwelt, insbesondere im Wasser, häufig vorkommen und gleichzeitig ein pathogenes Potential besitzen.

- Das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommender Opportunist und gehört zur Gruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien. Dieser

Keim ist äußerst widerstandsfähig und ist oft in Biofilmen des Wasserverteilungssystems anzutreffen. Besondere Bedeutung hat er in Schwimmbädern und Krankenhäusern. Als pathogenes Bakterium ist er bekannt als Erreger der Cystischen Fibrose und spielt bei Sekundärinfektionen, besonders bei immunsupprimierten und alten Menschen sowie bei Kindern eine Rolle.

- *Escherichia coli* gehört zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen und dient als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen, zum Beispiel von Wasser. Als fakultativ pathogenes Bakterium ist es verantwortlich für Harnwegsinfekte, Bauchfellentzündungen oder Hirnhautentzündungen bei Neugeborenen. Des Weiteren sind einige Stämme für den Menschen darmpathogen. *Escherichia coli* gehört als Modellorganismus zu dem am besten untersuchten Bakterium.
- *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* sind Darmbewohner von Warmblütern. Wie *Escherichia coli* dienen sie als Indikatorkeime für fäkale Verunreinigungen. Sie gehören zu den Gram-positiven Bakterien und gelten als Erreger nosokomialer Infektionen, vor allem von Harnwegsinfektionen und Endokarditis. Sie sind sehr widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen sowie Desinfektionsmitteln und besitzen häufig eine natürliche Antibiotikaresistenz.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterien und Wachstumsbedingungen

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

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

Cetrimid-Agar (Merck)

DEV-Agar (Merck)

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

Referenzbakterien:

*Enterococcus faecium* (B7641)

*Enterococcus faecalis* (DSM 2570)

*Escherichia coli* (DSM 498)

*Pseudomonas aeruginosa* (Stamm 154, Umweltisolat)

Die verwendeten Bakterien lagen als Glycerinkultur vor.

Die Bakterien wurden in Brain-Heart-Infusion (BHI) oder Luria Broth-Medium (LB-Medium) bei 37°C gezüchtet. *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* wurden auf Kanamycin-Äsculin-Azid-(KAA)-Agar für 48 h, *Pseudomonas aeruginosa* auf Cetrimid-Agar und *Escherichia coli* auf DEV-Agar für 24 h kultiviert. Die Agarplatten wurden bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in einem 50 mL-Röhrchen angeimpft und ebenfalls bei 37°C auf dem Schüttler bei 170 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

### 2.2 Geräte und Materialien

Folgende Geräte und Materialien wurden oft verwendet und sind daher nicht bei jedem Versuch einzeln aufgeführt.

Geräte:

Vortex Mixer Stuart (Bibby Sterlin)

Lumi-Imager T1™ (Roche Diagnostics)

Waage BL 3100 (Sartorius)

Analysen-Waage Laboratory LC 220 S (Sartorius)

Zentrifuge 5403 (Eppendorf)

Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus)

Autoklav Dampfsterilisator (Varioklav)  
 Magnetrührer MR 3001 (Heidolph)  
 pH-Meter 776 Calimatic (Knick)

#### Materialien:

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

## 2.3 Primer und Oligonukleotide

**Tab. 2.1:** Primersequenzen für Sondenherstellung.

Primer	Zielgen	Nukleotidsequenz (5' > 3')	Bakterium
PaRpoSF	<i>rpoS</i>	AGAGCAACCTGCGGTTGGT	<i>P. aeruginosa</i>
PaRpoSRKlo 721		GAGATCGTCATCCTGCAGCAGCTCG	
EcRcsAFKlo11	<i>rcaA</i>	TTATTATGGATTTATGTAGTTACA	<i>E. coli</i>
EcRcsAR		TCCCTGACCTGCCATCCA	
Pbp55845KloF	<i>pbp5</i>	CAGCAGAAGATATTGATAAGAATCCAG	<i>E. faecium</i>
Pbp51262KloR		CCAGGAGCATAACCTGTCGCAAATC	
Elisppb5FKlo	<i>pbp5</i>	GCAATTTATTCAAGGATTCAAGCA	<i>E. faecalis</i>
Elisppb5R		GCAGCCCCTGTTGGTAATTC	

**Tab. 2.2:** Primersequenzen für RAPD-PCR.

Primer	Nukleotidsequenz (5' > 3')	Referenz
RP15	AATGGCGCAG	Venieri et al. 2004
1290	GTGGATGCCA	Venieri et al. 2004
1254	CCGCAGCCAA	Venieri et al. 2004
M13	GAGGGTGGCGTTCT	Gomes et al. 2008

**Tab. 2.3:** Primer- und Sondensequenzen für Real-Time-PCR.

Primer	Zielgen	Nukleotidsequenz (5' > 3')	Bakterium
PaRpoSF	<i>rpoS</i>	AGAGCAACCTGCGGTTGGT	<i>P. aeruginosa</i>
PaRpoSR		GGGACAGTCCGCGATTGA	
PaRpoSP		6-FAM-TGAAGATCGCCCGGCGCTA-TAMRA	
EcRcsAF	<i>rcaA</i>	TAAATATGCCGACGTTATCATTGA	<i>E. coli</i>
EcRcsAR		TCCCTGACCTGCCATCCA	
EcRcsAP		6-FAM- CCGAACCGAATCGAGTATGTTGCGA- TAMRA	
Pbp5828F	<i>pbp5</i>	ACCCGATTACTTTGTCCCATTG	<i>E. faecium</i>
Pbp5938R		GCTGCTTCACCCAAAGGATAATATCTGC	
Elisbp5F	<i>pbp5</i>	GCAGACTCCTTTGTACCAATCACA	<i>E. faecalis</i>
Elisbp5R		GCAGCCCCTGTTGGTAATTC	
PauspF	<i>usp</i>	AGGCATCCAGGCGTTCAC	<i>P. aeruginosa</i>
PauspR		TGGACCTGTTCGATGTTGCA	
PauspP		6-FAM-CCTGGTTCGAACTGC-TAMRA	
EcuspaF	<i>uspA</i>	TGCACTGACCGAGCTTTC	<i>E. coli</i>
EcuspaR		TGCCGCTCAGGGTTTCA	
EfuspF	<i>usp</i>	GAAGCAATGTCAATGGCAAAG	<i>E. faecalis</i>
EfuspR		GTCCCATATCCACCGCTTGT	
EfuspF1	<i>usp</i>	GGCAAGAACAGTTGGCGAAA	<i>E. faecalis</i>
EfuspR1		ATTCGCTAACGCTTCTTGTTGAT	
EfuspF2	<i>usp</i>	GACGAGCAACCTCAATTGCA	<i>E. faecalis</i>
EfuspR2		CGGCGTAGACGGTAGTGATCA	
EfuspF3	<i>usp</i>	AGGCAAACAAGCGAGTGAAA	<i>E. faecalis</i>
EfuspR3		GGGCTCCCAAGCTCAACA	
EUB 338F	16S rRNA	GATCAGCCCACTGGGACTGA	für Eubakterien
EUB 338R		TCAGGCTTGCGCCATT	
EUB 338P		6-FAM-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG- TAMRA	
ECST784F	23S rRNA	AGAAATTCCAAACGAACTTG	für Enterokokken
ENC854R		CAGTGCTCTACCTCCATCATT	
27F	16S rDNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	für Eubakterien
517R		ATTACCGCGGCTGCTGG	
Pa23FP	23S rDNA	TCCAAGTTTAAGGTGGTAGGCTG	<i>P. aeruginosa</i>
Pa23RPb		ACCACTTCGTCATCTAAAAGACGAC	
Pa23FAM		FAM-AGGTAAATCCGGGGTTTCAAGGCC- TAMRA	

**Tab. 2.4:** Primersequenzen für Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) der cDNA.

Primer	Zielgen	Nukleotidsequenz (5' > 3')
SDGC	universell	CCAGGAGGCGC
random hexamer		

**Tab. 2.5:** Oligonukleotidsequenzen für Capture-Hybridisierungsaufreinigung.

Primer	Nukleotidsequenz (5'→ 3')
16S-1	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTTCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGC
16S-2	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGT
16S-3	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAG
23S-1	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGACTTCCAGACGCTTCCACTAACA
23S-2	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTCATTAGTCGGTTCGGTCCTCCAGTTAGTGT
23S-3	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTCAACATTAGTCGGTTCGGTCCTCCAGT
23S-4	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTCGCACTTCTGATACCTCCAGCAAC
23S-5	Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTATTTCGCACTTCTGATACCTCCAGCAACCC

**Tab. 2.6:** Primersequenzen für 3' Modifikation von Nukleinsäuren, Reverse Transkription und PCR.

Primer	Nukleotidsequenz (5'→ 3')
RNAampli	CGCACGGAGGAGGAGAGTTGTTGTCGAT
RNAlig	ATCGACAACAACCTCTCCTCCTCCGTGCG-Propandiol
Poly-T	CGCGCTTTTTTTTTT
Oligo-dA16	AAAAAAAAAAAAAAAA

Die Primer in Tabelle 2.1, 2.3, 2.4 und 2.6 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt, mit Ausnahme der random hexamer Primer (siehe 2.16.), der Primer für die 16S rRNA (Jungfer et al. 2007) und 16S rDNA (Muyzer et al. 1993) von Eubakterien, der Primer für die 23S rRNA von Enterokokken (Meier 1999) und die Primer für die 23S rDNA von *Pseudomonas aeruginosa* (Volkman et al. 2007). Die Primer in der Tabelle 2.5 stammen von Pang et al. 2004. Die Primer der Tabelle 2.2 von Venieri et al. 2004 und Gomes et al. 2008.

## 2.4 Optische Vermessung von RNA und DNA

NanoDrop (peqlab)

RNA und DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Definitionsgemäß entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/mL und einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL. Daraus ergibt sich für die Berechnung der RNA/ DNA-Konzentration folgende Formel:

$E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA } [\mu\text{g/mL}]$

$E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA } [\mu\text{g/mL}]$

Neben der Messung bei 260 nm wurde eine weitere OD-Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) durchgeführt. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  erlaubt eine Aussage über die Reinheit der Präparation: Werte größer als 2,0 weisen auf eine hohe RNA-Reinheit hin, während Werte kleiner als 1,8 für eine Kontamination der Probe mit Proteinen sprechen.

## 2.5 Diskriminierung von DNA toter Zellen mit Propidium-Monoazid (PMA)

PMA (20 mM in 20% DMSO, Biotium)

Multi®-Sicherheitsreaktionsgefäße (1,5 mL, CarlRoth)

Halogenlampe (650 Watt, GE Commercial Lighting Products)

PMA ist eine zweifach positiv geladene Substanz und kann daher nicht in Zellen mit einer intakten Membran eindringen. In tote bzw. membrangeschädigte Zellen hingegen dringt PMA ein und lagert sich in die DNA ein. Durch Bestrahlung mit Licht mit einer Wellenlänge von 464 nm bildet sich eine kovalente Bindung zwischen PMA und der DNA aus. DNA, die auf diese Weise gebunden ist, steht für nachfolgende molekularbiologische Analysen nicht mehr zur Verfügung.

Da PMA eine lichtaktive Substanz ist, wurden alle Schritte, bei denen mit PMA gearbeitet wurde, im Dunkeln durchgeführt. 1 mL der Bakteriensuspension wurden mit 2,5  $\mu\text{L}$  PMA-Lösung versetzt (Endkonzentration 50  $\mu\text{M}$ ) und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis mit der Halogenlampe bestrahlt und für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet bis zur weiteren Verwendung eingefroren, oder es wurde die DNA sofort isoliert.



**Abb. 2.1:** Wirkmechanismus von PMA.

## 2.6 Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien

QIAamp Mini Kit (Qiagen)  
Tris-HCl (Merck)  
EDTA (Sigma)  
Triton® Nr. X-100 (Sigma)  
Ethanol (abs) (Merck)

Die DNA wurde laut Herstellerangaben isoliert.

## 2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Thermocycler GeneAmp®PCR-System 9700 (Applied Biosystems)  
Sterilbank (Holten Lamin Air)  
10x PCR-Puffer (Qiagen)  
dNTP Set, 100 mM Lösungen (Amersham Bioscience) je 10 mM Endkonzentration  
Vorwärts- und Rückwärts-Primer (siehe Tabelle 2.1, 2.4 und 2.6)  
HotStar-Taq™ Polymerase (5 units/μL, Qiagen)  
LiChroSolv PCR-Wasser (Merck)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion kann eine Template-DNA um ein Vielfaches *in vitro* amplifiziert werden. Dies erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert, anschließend die Temperatur herabgesenkt, um den Oligonukleotidprimern die Anlagerung an die nun einzelsträngige DNA zu ermöglichen (Annealing). Im darauf folgenden Elongationsschritt lagert sich die thermostabile DNA-Polymerase an das 3'-Ende der Primer an und verlängert sie in 5' → 3' Richtung. In einem Thermocycler können mehrere solcher Zyklen direkt hintereinander durchgeführt werden und es kommt zu einer exponentiellen Anreicherung der DNA.

Ein Ansatz (50 μL) enthielt:

- 5 μL 10xPCR-Puffer
- 1 μL dNTP-Lösung
- 2 μL Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 μM)
- 0,25 μL HotStar-Taq™ Polymerase
- 10 μL Template-DNA
- auf 50 μL mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

PCR-Bedingungen:

15 min	95°C	Aktivierung	35 Zyklen
30 sek	95°C	Denaturierung	
1 min	primerabhängig	Annealing	
2 min	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Extension	

Für die random hexamer Primer und die Amplifikation der modifizierten cDNA (RNAampli/PolyT) lag die Annealingtemperatur bei 48°C, für den Shine-Dalgarno-Primer bei 35°C. Für die Primer zur Sondeherstellung lag die Annealingtemperatur für das *rpoS*-Gen bei 58°C, für das *rcaA*-Gen bei 40°C, für das *pbp5*-Gen von *Enterococcus faecium* bei 49°C und für das *pbp5*-Gen von *Enterococcus faecalis* bei 60°C.

## 2.8 RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-PCR)

Thermocycler GeneAmp®PCR-System 9700 (Applied Biosystems)

Sterilbank (Holten Lamin Air)

10x PCR-Puffer (Qiagen)

dNTP Set, 100 mM Lösungen (Amersham Bioscience) je 10 mM Endkonzentration

Vorwärts- und Rückwärts-Primer (siehe Tabelle 2.2)

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

LiChroSolv PCR-Wasser (Merck)

Die RAPD-PCR ist eine besondere Form der PCR, bei der kurze, unspezifisch bindende Primer eingesetzt werden, die sich zufällig an verschiedene DNA-Abschnitte anlagern und als Amplifikationsstart dienen. Dadurch entstehen Fingerprints, die anschließend miteinander verglichen werden können.

Ein Ansatz (50 μL) enthielt:

- 5 μL 10x PCR-Puffer
- 1 μL dNTP-Lösung
- 2 μL Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 μM)
- 0,25 μL HotStar-Taq™ Polymerase
- 10 μL Template-DNA
- Auf 50 μL mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

PCR-Bedingungen:

15 min	95°C	Aktivierung	45 Zyklen
1 min	94°C	Denaturierung	
3 min	33°C auf 72°C	Annealing	
2 min	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Extension	

## 2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer (Renner)

Elektrophoresenetzgerät (Biorad)

QA-Agarose™ Multipurose (Qbiogen)

1% Ethidiumbromid Stammlösung

100x TAE-Puffer: 4 M Tris-Base (Sigma), 1 M Natriumacetat (Merck), 0,1 M EDTA (Sigma), Eisessig (Sigma), pH 8,0

Probenpuffer: 50 mM EDTA pH 8,0, 20% Ficoll (Sigma), 0,25% Bromphenolblau (Sigma), 0,25% Xylen-Cyanol (Sigma)

Längenstandard: 100bp-Ladder XIV (Roche)

Die Gelelektrophorese ist eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung von Nukleinsäuren. Während einer Elektrophorese wandern die geladenen Moleküle entlang einem elektrischen Feld mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Allgemein gilt: die Wanderungsgeschwindigkeit eines Fragmentes ist umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Grundlage der Gelelektrophorese ist ein durch Agarose entstehendes Fasernetzwerk im Gel. Die Porengröße des Gels hat ebenfalls einen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle, und wird daher entsprechend zu der untersuchenden Probe durch die Konzentration der Agarose im Gel festgelegt.

Zur Herstellung eines Gels wurden 1% Agarose durch kurzes Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1 µg/mL Endkonzentration) zugegeben und am Lumilmager ausgewertet.

## 2.10 Stressparameter

Brutschrank 37°C (Mettler)

Photometer Aquamate (Thermo Spectronic)

Einmal-Küvetten 1,5 mL halbmikro (Brand)

Steriles Leitungswasser

Schüttler Unimax 2010 (Heidolph) mit Inkubatorhaube Certomat<sup>®</sup>H (Braun Biotech International)

0,5 M Natriumchloridlösung: 29,22 g NaCl (Merck) auf 1 L

BHI-Medium (Merck)

RNA-Protect<sup>™</sup> (Qiagen)

Die Bakterien wurden aus den Glycerinkulturen auf entsprechende Agarplatten (siehe 2.2) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Es wurde eine Vorkultur in einem 50 mL-Röhrchen hergestellt und über Nacht auf dem Schüttler bei 170 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Die Bakterien wurden jeweils mittels Zentrifugation bei 3000 g für 15 min geerntet.

### Stressparameter: exponentielle vs. stationäre Wachstumsphase

3 mL der Vorkultur wurden in 25 mL frisches Medium überimpft. Eine Probe wurde nach ca. 3 h (exponentiellen Wachstumsphase), eine weitere beim Erreichen der stationären Wachstumsphase (über-Nacht-Kultur) entnommen.

### Osmotischer Stress und Hungerstress

Die Bakterien wurden bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen, zentrifugiert und das entstandene Pellet in dem gleichen Volumen frischen Mediums mit pH-Wert 2 oder 3, beziehungsweise verschiedener Stress auslösender Lösungen (0,9% Natriumchloridlösung, 0,5 M Natriumchloridlösung, 30% Wasserstoffperoxidlösung (1 mM bis 50 mM), Natriumhypochlorid (0,03 mg/L bis 3 mg/L) oder steriles Leitungswasser) resuspendiert.

Es wurde 1 mL Bakteriensuspension entnommen, zur RNA-Isolierung mit 1 mL RNA-Protect<sup>™</sup> versetzt und bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde bei -80°C gelagert. Für die Isolation von DNA wurde ebenfalls 1 mL Bakteriensuspension zentrifugiert und bei -20 °C eingefroren.

## 2.11 Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)

Dampftopf (Varioklav)

Wasserbad SW1 (Julabo)

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

Agar (siehe 2.1)

0,9% Natriumchloridlösung: 9 g NaCl (Merck) auf 1 L

Zur Bestimmung der Bakterienzahl mit Kultivierungsverfahren wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Parallel zur Isolierung der RNA und DNA wurde dazu bei einigen Versuchen ein Aliquot der Bakteriensuspension für eine Verdünnungsreihe mit anschließendem Plattengussverfahren (KBE) verwendet. Von den jeweiligen Proben wurden Verdünnungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde im Doppelansatz je 1 mL in eine sterile Petrischale pipettiert. Der Agar wurde im Dampftopf geschmolzen, im Wasserbad auf ca. 50°C abgekühlt und in die Petrischalen mit der Bakteriensuspension gegossen und vermischt.

Nach Erstarren bei Raumtemperatur wurden die Platten für 1-2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Aus den Doppelansätzen wurde durch Bildung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Bakterienzahl der Ausgangssuspension bestimmt.

## 2.12 Gesamt-RNA-Isolierung

DEPC (Diethyl-Pyrocyanat)-Wasser: 1 mL DEPC (Sigma) auf 1 L dH<sub>2</sub>O,  
autoklavieren

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Lysozym: Stammlösung 100mg/mL (Sigma)

TE-Puffer: 10 mM TrisHCl (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma), pH 8,0

2-Mercaptoethanol (Sigma)

RNase-freie DNase (Qiagen)

Ethanol (Roth)

Ein kritischer Schritt bei der Isolierung von RNA aus lebenden Zellen ist der Zellaufschluß, bei dem endogene Ribonukleasen möglichst vollständig inaktiviert werden müssen, um den Abbau der zellulären RNA zu verhindern. Das ist insbesondere von Bedeutung, weil einerseits Ribonukleasen extrem stabile Proteine sind und andererseits die eigentlich

interessierende mRNA einer Zelle nur einen geringen Anteil an der Menge der Gesamt-RNA ausmacht. Daher wurden die verwendeten Lösungen vor Gebrauch mit DEPC behandelt und bei allen Versuchen Handschuhe zur Vermeidung von Kontaminationen getragen. DEPC wirkt durch Alkylierung des Histidinrestes der RNasen als Nuklease-Inhibitor. Eine übliche Methode zum Zellaufschluss ist die Verwendung von Zellaufschlußpuffern, die chaotrope Salze wie z.B. Guanidiniumisothiocyanat enthalten (Chirgwin et al. 1979). Durch dieses potente Denaturierungsmittel werden die zellulären RNasen inaktiviert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kit wurde die RNA mit einem Guanidinisothiocyanat-Puffer lysiert und homogenisiert, anschließend an eine Membran aus Silikagel gebunden, gewaschen und mit DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert. Auf diese Weise konnten alle RNA Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, isoliert werden. Kleinere RNAs, wie die 5,8S (~160 nt), die 5S (~120 nt) und tRNAs (~90 nt) wurden unter den genannten Bedingungen nicht quantitativ gebunden. Da solche RNAs 15-20% der Gesamt-RNA einer Zelle ausmachen, können die anderen RNAs auf diese Weise zugleich angereichert werden. Um DNA aus den Proben zu entfernen wurde RNase-freie DNase eingesetzt. Die RNA wurde in 50 µL H<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.13 Capture-Hybridisierungsaufreinigung nach Pang 2004

20x SSC: 87,7 g NaCl (Merck), 44,1 g Na<sub>3</sub>-Citrat (Sigma), auf 500 mL mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen, autoklavieren, pH 7.0

6x SSC: 20x SSC 1:3,33 verdünnen

Wasch- und Bindungspuffer: 0,5x SSC: 20x SSC 1:40 verdünnen

Hybridisierungspuffer: 6x SSC, 10 mM TrisHCl (Sigma), 1 mM EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat) (Sigma)

Magnetische Polyvinylalkohol-(M-PVA) SAV2 Partikel (Chemagen Biopolymer-Technologie AG)

Magnetic Particle Concentrator for eppendorf microtubes (Invitrogen)

Oligonukleotid-Mix: Mischen der einzelnen Oligonukleotide (16S und 23S Oligonukleotid-Mix) (siehe Tabelle 2.5)

Die Capture-Hybridisierungsaufreinigung ermöglicht die Separation von Gesamt-RNA mit Hilfe magnetischer Partikel. Ziel ist die Trennung der mRNA (messenger RNA) und rRNA (ribosomale RNA).

Dazu wurden 0,25 mg M-PVA SAV2 Partikel an den Magneten appliziert, der Überstand verworfen und anschließend die Partikel 3 x mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Danach

erfolgte die Vorbereitung des Oligonukleotid-Mixes. Hierzu wurden 180 pmol des Mixes in 100  $\mu$ L Bindungspuffer aufgenommen, 5 min bei 90 °C denaturiert und dann für 3 min im Eisbad abgekühlt. Der Oligonukleotid-Mix wurde zu den Partikeln gegeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und 2x mit 100  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen.

Für die eigentliche Separation wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde in 200  $\mu$ L Hybridisierungspuffer aufgenommen, für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 3 min im Eisbad abgekühlt. Zu dem vorbereiteten Partikel-Oligonukleotid-Mix (180pmol) wurde die RNA gegeben und zur Hybridisierung 30 min bei 68°C inkubiert. Danach wurde mittels Magneten separiert und der Sorptionsüberstand, der die mRNA enthält, entnommen.

## 2.14 Northern Blot-Hybridisierung

Vakuumpumpe (Ilmvac Typ 4000481)

Dot-Blot-Apparatur (Biorad)

Nylon-Membran (positively charged, Roche)

Biodot Filterpapier (Biorad)

Hybridisierungsöfen (Biometra)

DEPC-Wasser

Prospekthüllen

20x SSC: 87,7 g NaCl (Merck), 44,1 g Na<sub>3</sub>-Citrat (Sigma), auf 500 mL mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen, autoklavieren, pH 7.0

30x SSC: 131,55 g NaCl, 66,15 g Na<sub>3</sub>-Citrat, auf 500 mL mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen, autoklavieren, pH 7.0

10% SDS: 50 g SDS (Sigma) auf 500 mL DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

Puffer 1: 11,6 g Maleinsäure (Sigma), 8,8 g NaCl, auf 1 L mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7.5 (7 g NaOH, 1 M NaOH), autoklavieren

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

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

Puffer 3: 15,76 g TrisHCl (Merck), pH 9.5 (NaOH), 5,84 g NaCl, 10,17 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (Merck) auf 1 L DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

10% N-Lauroylsarcosin-Lösung: 0,1 g N-Lauroylsarcosin (Sigma) in 1 mL DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

1 M Natriumphosphat-Puffer: 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), beide Lösungen so mischen, dass ein pH von 7,0 erreicht wird

High SDS-Puffer: 250 mL Formamid (100%) (Applichem, Darmstadt), 83 mL 30x SSC, 25 mL Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0, 100 mL 10% Blocking-Stammlösung, 5 mL 10% N-Lauroylsarcosin, 35 g SDS, auf 500 mL mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

Waschlösung 2x: 10 mL 20x SSC, 1 mL 10% SDS, auf 100 mL mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

Waschlösung 0,5x: 2,5 mL 20x SSC, 1 mL 10% SDS, auf 100 mL mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

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

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

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

### 2.14.1 Sondenherstellung

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

Mit Hilfe von Referenzbakterien und spezifischen Primern können durch die Polymerase-Ketten-Reaktion für bestimmte Genabschnitte spezifische, mit Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt werden. Dafür werden neben den dNTPs auch Digoxigenin-markierte dUTPs eingesetzt. Diese Sonden werden zum Nachweis in der Northern Blot-Hybridisierung verwendet.

Dafür wird dem PCR-Ansatz (siehe Kapitel 2.7) 0,5 µL DIG-11-dUTP (1 µM) zugefügt. Die Größe und Spezifität des Produktes wurde in einem Ethidiumbromid-haltigem 1%igen Agarosegel (siehe 2.9) kontrolliert.

### 2.14.2 Northern Blot-Hybridisierung

Der Nachweis von spezifischer mRNA erfolgte durch Hybridisierung auf einer Nylonmembran. Die Apparatur wurde vor Gebrauch mit 0,5% SDS in DEPC-Wasser von RNasen gereinigt. Unter Vakuum wurde eine definierte Menge an Gesamt-RNA (0,2 µg bzw. 0,5 µg) mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf eine Nylonmembran geblottet. Während des Blot-Vorgangs wurde ausschließlich mit DEPC-Wasser gearbeitet. Nach dem Auftrag der RNA auf die Membran wurde die Blot-Apparatur nochmals mit DEPC-Wasser gefüllt und dieses unter Vakuum abgesaugt. Die Membran wurde aus der Blot-Apparatur genommen und 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde 2 min im UV-Crosslinker auf der

Membran fixiert und anschließend in einem 50 mL-Röhrchen 1 h in 25 mL High SDS-Puffer prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend bis auf 3 mL verworfen. 5 µL einer spezifischen DIG-11-dUTP-markierten Gensonde (siehe oben) wurde 10 min durch Hitze bei 95°C im Thermocycler denaturiert und zu den 3 mL Prähybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde über Nacht mit der Sonde bei 51°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen, und es folgte ein stringentes Waschen der Membran bei Raumtemperatur für 2 x je 15 min. Danach wurde die Membran für 5 min mit 25 mL Puffer 1 gewaschen und mit Puffer 2 für 30 min geblockt. Anschließend wurde mit Antikörperlösung (Anti-DIG-AP Fab-Fragment 1: 10.000) für 30 min hybridisiert. Dann wurde 15 min mit Waschpuffer, zweimal 15 min mit Puffer 1 und 5 min mit Puffer 3 gewaschen. Die Membran wurde mit Substratlösung überschichtet und 90 min im Dunkeln inkubiert. Im Dunkeln entwickelte sich Chemilumineszenz durch Spaltung des Substrats Luminol. Diese konnte an der Lumi Imager Working Station via CCD-Kamera detektiert werden.

## 2.15 Reverse Transkription

TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)

Rückwärts-Primer, 2,5 µM (random hexamer Primer (Applied Biosystems))

Rückwärts-Primer: polyT (siehe Tabelle 2.6)

Thermocycler Gene Amp PCR-System<sup>®</sup> 9700 (Applied Biosystems)

Die Real-Time-PCR benötigt DNA als Ausgangsmaterial, daher erfolgt zunächst die Anfertigung einer komplementären DNA Kopie (cDNA). Die cDNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase hergestellt. Reverse Transkriptase ist ein Enzym, das aus Retroviren isoliert wird und in der Lage ist, einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA zu transkribieren. Die Reverse Transkriptase hat drei enzymatische Aktivitäten. Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine Exoribonuklease (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Im ersten Schritt transkribiert die RNA-abhängige DNA-Polymerase cDNA von der RNA (Reverse Transkription). Die Ribonuklease-Aktivität des Enzyms baut anschließend die RNA des RNA-DNA-Hybrid ab. Die RNA, die nicht mit DNA hybridisiert ist, wird nicht abgebaut. So entsteht durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase und die Exoribonuklease (RNase H) einzelsträngige cDNA. *In vivo* vervollständigt die DNA-abhängige DNA-Polymerase den einzelsträngigen cDNA-Strang in doppelsträngige cDNA.

Ein Ansatz (50  $\mu\text{L}$ ) enthielt:

- 5  $\mu\text{L}$  10xTaqMan RT Puffer
- 11  $\mu\text{L}$  25mM  $\text{MgCl}_2$
- 10  $\mu\text{L}$  desoxyNTPs Mixture
- 2,5  $\mu\text{L}$  Rückwärts-Primer
- 1  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor
- 1,25  $\mu\text{L}$  MultiScribe
- X  $\mu\text{L}$  RNA
- Auf 50  $\mu\text{L}$  mit RNase-freiem Wasser auffüllen

Je Ansatz wurden 1000 ng RNA eingesetzt. Wenn die Menge der isolierten Gesamt-RNA nicht ausreichend war, wurde entsprechend weniger RNA revers transkribiert.

PCR-Bedingungen:

10 min 25°C

30 min 48°C

5 min 95°C

## 2.16 Real-Time-PCR

Primer Express 2.0 ABI PRISM software (Applied Biosystems)

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

Universal Master Mix (uMM) (Applied Biosystems)

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen)

Primer (siehe Tabelle 2.3), 5  $\mu\text{M}$

Sonde mit Fluoreszenzfarbstoff FAM und TAMRA, 5  $\mu\text{M}$

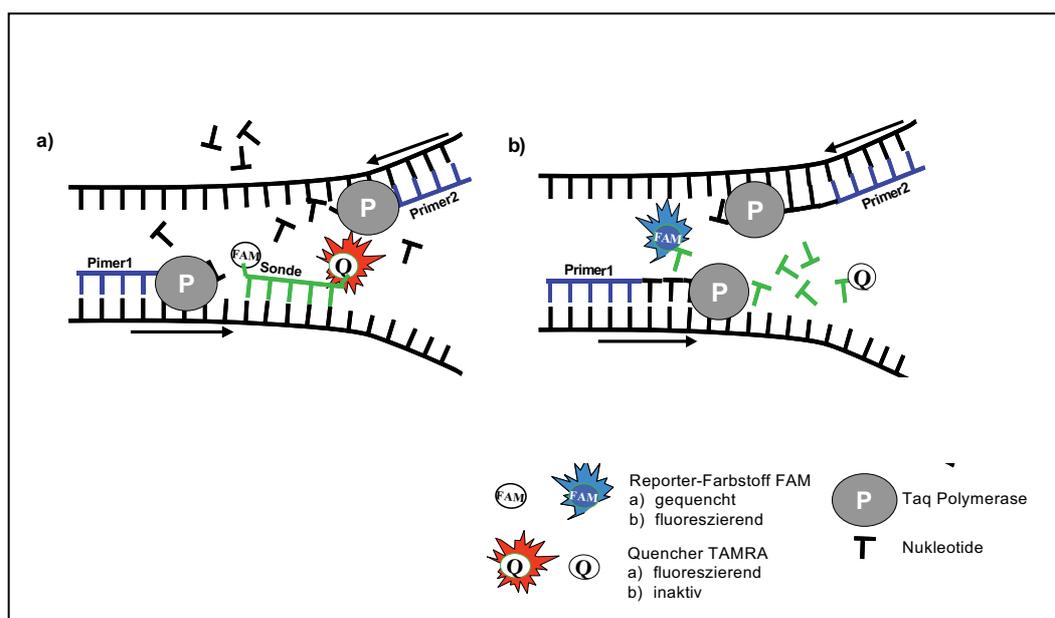
96-well-Platte (Applied Biosystems)

Optische Folie (Applied Biosystems)

Die Real-Time-PCR (Echtzeit-PCR) wurde von Higuchi und Mitarbeitern entwickelt und ermöglicht die Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels einer Fluoreszenzmessung. Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Verfahren, bei denen eine Bestimmung von Endprodukten im besten Falle semiquantitativ stattfindet, erfolgt bei der Real-Time-PCR eine Messung der DNA-Menge während oder nach jedem Zyklus und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge. Der Konzentrationsanstieg der zu amplifizierenden Zielsequenz wird entweder durch eine dem PCR-Ansatz zugefügte Sonde

oder durch den im Mastermix zugesetzten Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I ermöglicht, der während der Elongation in die neu gebildete doppelsträngige DNA interkaliert und nach Anregung fluoresziert. Bei den in der Real-Time-PCR eingesetzten Sonden, ist am 5'-Ende ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende ein Fluoreszenz-Quencher (TAMRA) angebracht (siehe Abbildung 2.2). Der Quencher leitet durch die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher die Energie des Reporterfarbstoffes ab. Lagert sich die Sonde nun an eine spezifische Sequenz an, spaltet die Polymerase während der Extensionsphase durch ihre Exonuklease-Aktivität Nukleotide ab und trennt somit Reporter und Quencher. Die Zunahme der für den Farbstoffe FAM spezifischen Fluoreszenz-Signale ist somit direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA-Fragmente. Durch die Software wird die detektierte Fluoreszenz auf eine logarithmische Skala übertragen. Die Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert (threshold cycle) (siehe Abbildung 2.3). Eine Kalibrierung erfolgt durch die Ct-Werte von Standards mit bekannter Kopienzahl.

Umso früher der Ct-Wert erreicht ist, desto mehr Kopien des Templates waren am Anfang in der Probe vorhanden. Frühe Ct-Werte bedeuten somit eine starke, späte Ct-Werte eine niedrige Expression des zu untersuchenden Gens. Durch die Vergleiche verschiedener Ct-Werte wird der  $\Delta Ct$ -Wert berechnet. Ein  $\Delta Ct$ -Wert von 3,3 entspricht etwa einer Zehnerpotenz. Die Induktion wird über  $2^{\Delta Ct}$  bestimmt. Die Auswertung der Real-Time-PCR erfolgt durch eine relative Quantifizierung. Das heißt die Expression des zu untersuchenden Gens wird im Verhältnis zu einem internen Referenzgen („housekeeping“-Gen) bestimmt.



**Abb. 2.2:** Nachweisprinzip der Real-Time-PCR.

Ein Ansatz (50  $\mu\text{L}$ ) enthielt:

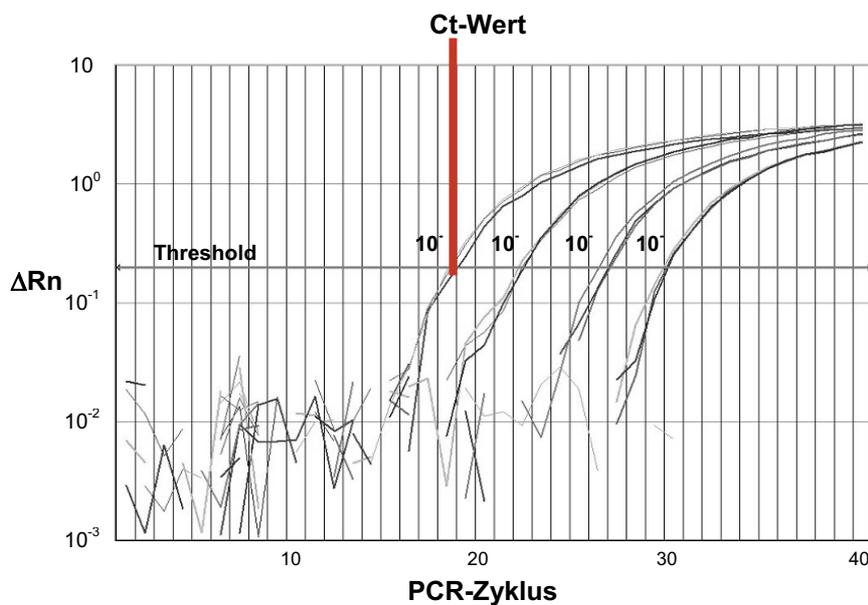
- 25  $\mu\text{L}$  2x uMM Puffer
- 3  $\mu\text{L}$  Vorwärts-Primer
- 3  $\mu\text{L}$  Rückwärts-Primer
- (2  $\mu\text{L}$  Sonde)
- X  $\mu\text{L}$  Template
- Auf 50  $\mu\text{L}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

PCR-Bedingungen für die Verwendung des Systems mit Sonde:

2 min	50°C	Inkubationsschritt	
10 min	95°C	Aktivierung	
15 sek	95°C	Denaturierung	40 Zyklen
1 min	60°C	Annealing und Elongation	

PCR-Bedingungen für die Verwendung des Systems mit SYBR® Green I:

2 min	50°C	Inkubationsschritt	
15 min	95°C	Aktivierung	
15 sek	95°C	Denaturierung	40 Zyklen
1 min	60°C	Annealing	
30 sek	72°C	Elongation	



**Abb. 2.3:** Amplifikationsverlauf der Real-Time-PCR.

## 2.17 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mini-Protean Elektrophorese Kammer

Gelgießapparatur: Gelgießstand, 10er Kämmen, Glasplatten mit Spacer 0,75 mm  
(Mini-Protean, Biorad)

Elektrophorese-Netzgerät (Biorad)

Probenpuffer: 50 mM EDTA pH 8,0, 20% Ficoll (Sigma), 0,25% Bromphenolblau  
(Sigma), 0,25% Xylen-Cyanol (Sigma)

Längenstandard: 100bp-Ladder XIV (Roche)

10x TBE: 1 M Tris-Base (Sigma), 1 M Borsäure (Sigma), 20 mM EDTA (Sigma)

1x TBE: 10x TBE 1:10 verdünnt

5% Trenngel mit 7 M Harnstoff (für 10 mL): 1,3 mL Acrylamid/Bis-Lösung 37,5:1  
(40% w/v, Serva), 1 mL 10x TBE, 7 M Harnstoff (Sigma), 60 µL 10% APS, 6  
µL TEMED

5% Sammelgel mit 7 M Harnstoff (für 10 mL): 1,3 mL Acrylamid/ Bis-Lösung 37,5:1  
(40% w/v, Serva), 1 mL 10x TBE, 60 µL 10% APS, 6 µL TEMED

SYBR<sup>®</sup>Gold (Invitrogen)

Denaturierende Polyacrylamidgele dienen der Auftrennung kürzerer Fragmente anhand ihrer Größe. Sie besitzen ein dichteres Maschenwerk als Agarosegele und erlauben somit eine bessere Auftrennung. Durch Wechselwirkungen von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) entstehen freie Radikale, die mit den Acrylamidmonomeren reagieren und eine radikalische Kettenreaktion einleiten. Durch die Co-Polymerisation von Acrylamid mit dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht ein komplexes und flexibles dreidimensionales Netzwerk. Harnstoff bewirkt denaturierende Bedingungen, um mögliche Sekundärstrukturen der zu analysierenden Nukleinsäuren aufzulösen. Durch Anlegen eines konstanten Stromflusses über das gesamte System wandern kleine Fragmente schneller, wohingegen größere eher in den engen „Maschen“ des Gels zurückbleiben.

Die PCR-Produkte wurden in einem 5% Trenngel aufgetrennt. Die Gele wurden nach oben genanntem Rezept gegossen und das Trenngel für mindestens 30 min und das Sammelgel für mindestens 15 min auspolymerisiert. Anschließend wurden die Gele in die mit 1x TBE gefüllten Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wurden 3 µl Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 1 h bei 120 V. Die Gele wurden mit einer 10%igen SYBR<sup>®</sup>Gold-Lösung für 20 min gefärbt und mit dem Lumi-Imager bei 520 nm ausgewertet.

## 2.18 Modifikation von Nukleinsäuren

Die Schwierigkeit in der Amplifikation der cDNA besteht darin, dass prokaryotische mRNA im Gegensatz zur eukaryotischen mRNA kein Poly(A)-Ende am 3'-Ende aufweist und somit keinerlei Kenntnis über die Sequenz der zu amplifizierenden Nukleinsäure vorhanden ist. Eine Lösungsmöglichkeit ist das Anbinden von verschiedenen Oligonukleotiden sowohl an das 3'-Ende als auch an das 5'-Ende der einzelsträngigen Nukleinsäure (Botero et al. 2005; Edwards et al. 1991; Gao et al. 2007; Kinoshita et al. 1997; Li und Weeks 2006). In dieser Arbeit wurde zur Modifikation der Nukleinsäuren die terminale Transferase (Weber et al. 1989) eingesetzt, die einzelne Nukleotide an einzelsträngige Nukleinsäuren anhängen kann. Als eine weitere Möglichkeit wurde die T4 RNA Ligase verwendet, die die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyltermini von Oligonukleotiden katalysiert und so Nukleinsäuren am 3'-Ende modifiziert (England und Uhlenbeck 1978). Durch die Modifizierung der RNA und der daraus resultierenden cDNA sind beidseitig bekannte Sequenzen vorhanden, die eine Amplifikation ermöglichen.

### 2.18.1 3' Modifikation von Nukleinsäuren mit T4 RNA Ligase

T4 RNA Ligase und Reaktionspuffer, BSA, ATP (Fermentas)  
Thermomixer compact (Eppendorf)  
RNeasy Micro Kit (Qiagen)  
Primer: RNAlig oder Oligo-dA16 (siehe Tabelle 2.6)  
DEPC-Wasser

Die cDNA oder RNA wurde auf Eis dem Reaktionsgemisch zugegeben und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mittels des RNeasy Micro Kit aufgereinigt und in 15 µL DEPC-Wasser eluiert. Die Aufreinigung erfolgte anhand des Hersteller-Handbuchs.

Ein Ansatz (20 µL) enthielt:

- 2 µL Ligationspuffer
- 1 µL BSA
- 1 µL ATP
- 1 µL T4 RNA Ligase
- 10 µL cDNA Template
- 5 µL mit Primer

### 2.18.2 3' Modifikation von Nukleinsäuren mit terminaler Transferase

Terminale Transferase (400U), Reaktionspuffer (Fermentas)  
CoCl<sub>2</sub>-Lösung aus 3' End Labeling Kit (Roche)  
Thermomixer compact (Eppendorf)  
0,2 M EDTA (Sigma)  
dATP: 10 mM 1:10 verdünnen (Applied Biosystems)  
RNeasy Micro Kit (Qiagen)

Die RNA wurde auf Eis dem Reaktionsgemisch zugegeben und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 µL EDTA abgestoppt und mittels dem RNeasy Micro Kit aufgereinigt und in 20 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die Aufreinigung erfolgte anhand des Hersteller-Handbuchs.

Ein Ansatz (20 µL) enthielt:

- 4 µL Reaktionspuffer
- 4 µL CoCl<sub>2</sub>-Lösung
- 1 µL Nukleotide
- 1 µL Terminale Transferase
- 10 µL Template
- Auf 20 µL mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### 2.19 Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen

Skalpell (VWR)  
UV-Tisch (Fröbel Labortechnik)  
Thermo Mixer (Eppendorf)  
Elutionspuffer: 0,5 M Ammoniumacetat (Merck), 1 mM EDTA (Sigma)

Die durch Elektrophorese aufgetrennte DNA wurde durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht. Die zu isolierenden Banden wurden mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten, in kleine Stücke geschnitten, mit Elutionspuffer überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde durch Ethanolpräzipitation (siehe Kapitel 2.21) entsalzt.

## 2.20 Ethanolpräzipitation

3 M Natriumacetatlösung (Sigma)  
100% Ethanol (Roth)  
LiChroSolcWasser (VWR)

Die DNA wurde zur Beseitigung von Salzen und anderen Verunreinigungen aus wässriger, monovalente Kationen enthaltender Lösung mittels Ethanol ausgefällt. Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 3 Volumen Ethanol (-20 °C, 100 %) versetzt. Die Präzipitation erfolgte für 1,5 h bei -20 °C. Anschließend wurde für 30 min bei 4°C und 13.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Wasser aufgenommen.

## 2.21 Sequenzierung

Sequenzierkit: BigDye<sup>®</sup> Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)  
Hi-Di-Formamid  
Glaskapillare (47 cm x 50 µm, Applied Biosystems)  
ABI PRISM<sup>®</sup> Genetic Analyser 310 (Applied Biosystems)  
LiChroSolcWasser (VWR)  
DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen)  
Polymer POP4 (Applied Biosystems)  
Buffer 10x mit EDTA (Applied Biosystems)  
Software Sequencing Analysis (Applied Biosystems)  
ExoSAP-IT<sup>®</sup> For PCR Product Clean-Up (Usb)

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger (1977). Neben einem Primer, Polymerase und dNTPs sind auch ddNTPs (Di-Desoxyribonukleosidtriphosphate) in dem Ansatz enthalten. Diese ddNTPs sind hierbei jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zeichnen sich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom aus. Zuerst wird die DNA denaturiert und während der Extension werden die fluoreszenzmarkierten ddNTPs eingebaut. Werden diese Analoga durch die Polymerase eingebaut, kann keine weitere Anknüpfung von Nukleotiden erfolgen, und die Elongation bricht ab. Durch den Einsatz des gleichen Primers, wie bei der vorhergehenden PCR, entstehen somit DNA-Fragmente mit 3'-terminaler Fluoreszenzmarkierung. Da der Einbau von Desoxyanaloga nach den Gesetzen der Statistik erfolgt, entsteht eine Reihe von

Fragmenten unterschiedlicher Länge. Bei der Kapillarelektrophorese werden die entstandenen Produkte unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt. Denaturierend wirkt hierbei Harnstoff, der dem Polymer bei der Befüllung der Kapillare zugesetzt wird. Die Glaskapillare wird mit den zu trennenden DNA-Molekülen durch Spannung beladen, und die DNA wandert entlang des Spannungsfeldes durch die Kapillare. Die DNA wird durch Wechselwirkungen mit dem Polymer und der Kapillarwand ihrer Größe nach aufgetrennt. Detektiert wird die DNA an einem Laserfenster durch die Aufnahme der Nukleotid-spezifischen Fluoreszenzsignale. Zur Herstellung des Templates wurde mit der isolierten DNA eine PCR durchgeführt (siehe Kapitel 2.8). Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.10) und der PCR-Ansatz mittels eines SAP/Exo1 Verdauung gereinigt.

Die Sequenzierreaktion wurde in 10 µL Ansätzen durchgeführt. Ein Ansatz enthielt jeweils 2 µL Premix, 5 pmol Vorwärts- oder Rückwärtsprimer, je nach Größe der zu sequenzierenden DNA-Stücke 3-10 µg DNA.

Sequenzierreaktionsbedingungen:

5 min	96°C	25 Zyklen
10 sek	96°C	
5 sek	58°C	
1 min	72°C	

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit, um überflüssige ddNTPs zu entfernen. Die Produkte wurden auf die Gelmatrix in einem Spin-Säulchen pipettiert und anschließend bei 2800 rpm für 3 min zentrifugiert. 6 µL dieser DNA wurden mit 9 µL Hi-Di-Formamid versetzt und in den ABI PRISM® Genetic Analyser 310 geladen.

**Tab. 2.7:** Bedingungen des Sequenzierlaufs.

Modul	P4rapidSeqE.md4
Injection time	10 sec
Electrophoresis voltage	20 min
EP voltage	15 kV
Heat plate temperature	50°C
Syringe pumping time	240 sec

Die Sequenzen wurden mit der Sequencing Analysis-Software ausgewertet und über die Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mit bekannten Sequenzen verglichen.

## 2.22 Biofilmuntersuchungen

Herz-Hirn-Bouillon (BHI, Merck)

Zellschaber (PE Blade, PS Handle, 23 cm<sup>2</sup>, Nalgene Nunc International)

Schüttler Unimax 2010 (Heidolph) mit Inkubatorhaube Certomat<sup>®</sup>H (Braun Biotech International)

Objektträger (Menzel)

Färbeküvetten (VWR)

RNA-Protect<sup>™</sup> (Qiagen)

0,9% Natriumchloridlösung: 9 g NaCl (Merck) auf 1 L

0,5M Natriumchloridlösung: 29,22 g NaCl (Merck) auf 1 L

Steriles Leitungswasser: Leitungswasser mit 0,2 µm-Polycarbonatfilter-Membranfilter (Costar) filtrieren und autoklavieren

Abwasser: Ablauf (Kläranlage Neureut)

*Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* wurden in 1:4 verdünntem BHI-Medium angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C und 170 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2,5 mL dieser Vorkultur mit 140 mL 1:4 verdünntem BHI-Medium vermischt und in die Färbeküvetten mit eingehängten Objektträgern gegeben. Die Färbeküvetten wurden zur Biofilmanzucht für 7 Tage auf dem Schüttler bei 37°C und 40 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Jeweils am 3. und 6. Tag wurde das Medium erneuert.

Nach 7 Tagen wurde eine Probe der planktonischen Bakterien im umgebenden Medium entnommen, mit 1 mL RNA-Protect<sup>™</sup> versetzt und bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Zur Entnahme adhärenter Bakterien wurde ein Objektträger 2x mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült, der Biofilm als Kontrolle mit RNA-Protect<sup>™</sup> abgeschabt und ebenfalls bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Aus diesen Proben wurde anschließend die RNA isoliert (siehe 2.12). Danach wurde das Medium entnommen und zur Stressbehandlung durch 0,5 M Natriumchloridlösung (osmotischer Stress) oder Leitungswasser (Oligotrophie) ersetzt. Die Färbeküvetten wurden weitere 4 Tage bei 37°C inkubiert und jeweils am 2., 3. und 4. Tag ein Objektträger für die RNA-Isolierung verwendet.

Zusätzlich zu den Versuchen mit Reinkulturen wurden Versuche mit Mischkulturen durchgeführt. Dazu wurden die Reinkulturen mit 70 mL 1:2 verdünntem BHI-Medium und 70 mL Abwasser vermischt und in die Färbeküvetten mit eingehängten Objektträgern

gegeben. Zur Anzucht der Biofilme wurden die Färbeküvetten ebenfalls für 7 Tage bei 37°C inkubiert. Das Wechseln und die Entnahme des Mediums und die Entnahme der Bakterien für die RNA-Isolation erfolgte analog zu den Versuchen mit Reinkulturen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Auswahl der Stressparameter

Aufgabe dieser Arbeit war es zunächst, bei hygienisch relevanten Bakterien mehrere, spezifische und möglicherweise stressregulierte Gensysteme bei verschiedenen ungünstigen Bedingungen, die in einem natürlichen Habitat vorkommen können, zu untersuchen. In einem nächsten Schritt wurden Expressionsanalysen mit spezieübergreifenden Gensystemen durchgeführt, um mögliche allgemeingültige Stressmarker zu identifizieren. Weiterführend sollten Anpassungsstrategien in Bakterien erfasst werden, die weniger auf spezifischen Mechanismen beruhen, als vielmehr übergreifende Veränderungen in der bakteriellen Physiologie auslösen. Dazu mussten grundlegende Untersuchungen zur Parametrierung von Stressbedingungen durchgeführt werden, bei denen Änderungen im pH-Wert, osmotischer, oxidativer und physikalischer Stress sowie Nährstofflimitierung eingesetzt wurden. Weiterhin wurde neben diesen spezifischen Stressfaktoren auch die stationäre Wachstumsphase bei Bakterien als Stressstimulus untersucht. Die folgenden Stressoren wurden für alle Versuche verwendet, da sie bei technischen Prozessen, wie der Wasserwirtschaft oder Lebensmittelindustrie, besondere Relevanz besitzen. Zusätzlich zeigte sich bei diesen Stressoren bei dem zu Parametrierung eingesetzten Gensystem eine eindeutige stressabhängige Regulation.

Stressparameter bei den ausgewählten hygienisch relevanten Bakterien:

- 0,5 M Natriumchloridlösung (osmotischer Stress)
- Leitungswasser (Hungerstress, Oligotrophie)
- Bakterielle Wachstumsphasen (optische Dichte)

Osmotischer Stress tritt für Bakterien unter anderem in der Lebensmittelverarbeitung, beispielsweise bei der Trocknung verschiedener Produkte, auf. Einige Beispiele für nährstofflimitierte Lebensräume sind künstliche Wassersysteme, wie sie z.B. in technischen Anlagen oder Trinkwassersystemen vorkommen. Die stationäre Wachstumsphase ist durch eine Verminderung der Nährstoffe, aber auch durch eine Anhäufung toxischer Produkte gekennzeichnet. Sie spiegelt das langsame Wachstum als auch das Nicht-Wachstum wieder, das möglicherweise in den meisten natürlichen Lebensräumen von Bakterien anzutreffen ist.

### 3.2 Untersuchung der Physiologie während Stressexposition bei Referenzbakterien

Zur näheren Charakterisierung der Stressantwort von hygienisch relevanten Bakterien wurden verschiedene Summenparameter, wie Gesamt-RNA-Gehalt und die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bei den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sowie bei den Gram-positiven Bakterien *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* näher untersucht. Der Gesamt-RNA-Gehalt gibt dabei Aufschluss über eine mögliche Veränderung der Genexpression, die Anzahl der KBE über ein Wachstum oder Absterben der Mikroorganismen durch die angewendeten Stressbedingungen.

Die Bakterien einer Vorkultur mit einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 2,5 bei Enterokokken, 1,6 bei *Pseudomonas aeruginosa* und 2,6 bei *Escherichia coli* (Kontrolle) wurden für unterschiedliche lange Inkubationszeiträume (3, 4 und 5 Tage) in einer 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) oder in Leitungswasser (Hungerstress/ Oligotrophie) inkubiert. Aus 1 mL Bakteriensuspension wurde die Gesamt-RNA isoliert, der Nukleinsäure-Gehalt photometrisch quantifiziert und KBE (Kolonie-bildende Einheiten)-Untersuchungen zur Bestimmung der kultivierbaren Zellen durchgeführt. Für die Messung des RNA-Gehalts wurde eine Dreifachbestimmung, für die Anzahl der KBE eine Doppelbestimmung durchgeführt.

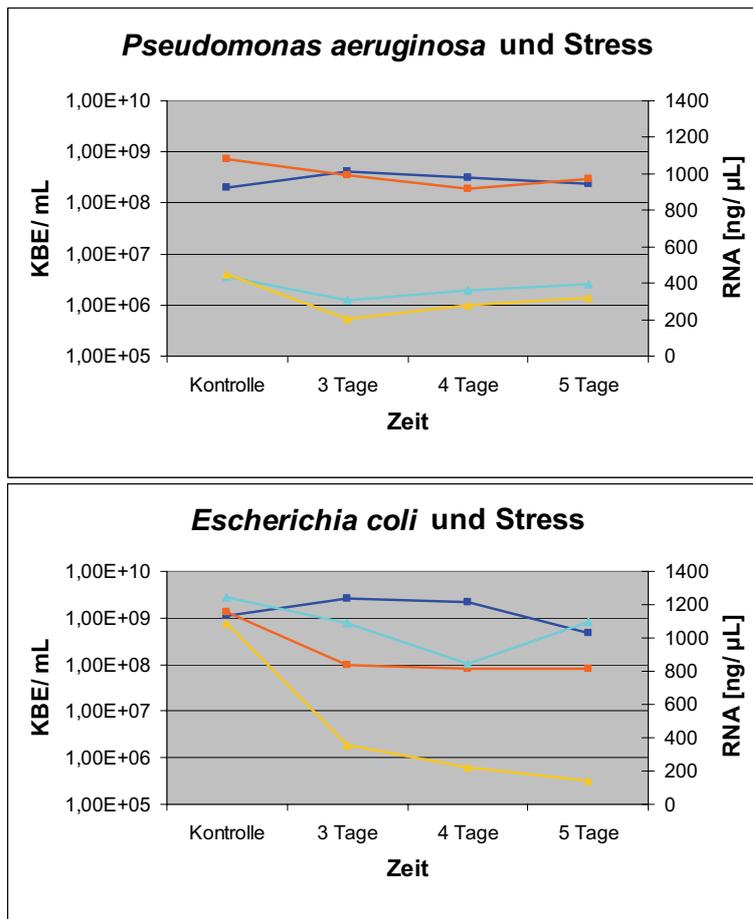
#### Gram-negative Bakterien

Abbildung 3.1 zeigt die Mittelwerte der isolierten RNA-Mengen und die Mittelwerte der KBE-Untersuchungen bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* nach Stressapplikation. Angegeben sind links die Kolonie-bildenden Einheiten pro mL, rechts der Gesamt-RNA-Gehalt in ng pro  $\mu$ L.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* war zu erkennen, dass die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten sowohl während osmotischem Stress als auch bei Nährstofflimitierung gleich blieb. Bei osmotischem Stress lagen die Zellzahlen zwischen  $1,8 \times 10^8$  Bakterien pro mL und  $7,3 \times 10^8$  Bakterien pro mL, bei Hungerstress zwischen  $2,0 \times 10^8$  Bakterien pro mL und  $4,1 \times 10^8$  Bakterien pro mL. Ebenso wurden keine signifikanten Änderungen im Gesamt-RNA-Gehalt festgestellt, der mit einer Menge zwischen 205 ng pro  $\mu$ L und 447 ng pro  $\mu$ L weitgehend konstant blieb.

Als weiteres Gram-negatives Bakterium wurde *Escherichia coli* untersucht. Bei Inkubation in Leitungswasser blieb die Zellzahl mit  $1,1 \times 10^9$  Bakterien pro mL bis  $4,9 \times 10^8$  Bakterien pro mL weitgehend gleich, auch der RNA-Gehalt blieb mit Werten von 1244 ng pro  $\mu$ L bis 847 ng pro  $\mu$ L ähnlich. Bei osmotischem Stress hingegen war eine deutliche Abnahme der Zellzahl

von  $1,4 \times 10^9$  Bakterien pro mL auf  $7,9 \times 10^7$  Bakterien pro mL nach einer Inkubationsdauer von 5 Tagen um mehr als eine log-Stufe erkennbar, auch der RNA-Gehalt nahm ab. Die RNA-Menge sank von 1089 ng pro  $\mu\text{L}$  auf 141 ng pro  $\mu\text{L}$ , was einer Reduktion um den Faktor 7,7 entsprach. Bei weiteren Versuchen war die Abnahme des RNA-Gehalts sogar noch stärker ausgeprägt, sie lag bisweilen bei einem Faktor von 15.



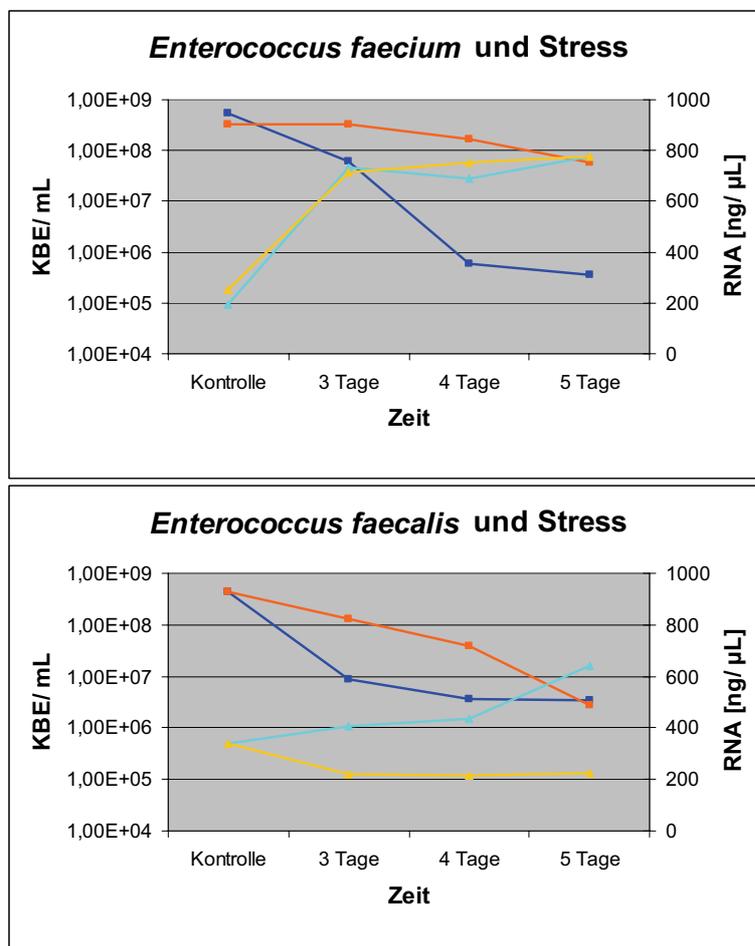
**Abb. 3.1:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. LW: Behandlung mit Leitungswasser. N: Behandlung mit Salzlösung. SD: Standardabweichung. ■ : KBE LW (SD:  $1,4 \times 10^8$ ), ■ : KBE N (SD:  $7,9 \times 10^8$ ), ▲ : RNA LW (SD: 15,99), ▲ : RNA N (SD: 57,04).

Zusammenfassend konnte bei *Escherichia coli* eine Abnahme der Zellzahl und der Gesamt-RNA-Menge um 1 log-Stufe bei osmotischem Stress festgestellt werden, während bei Oligotrophie keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden. Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurden bei beiden Stressparametern keine stärkeren Änderungen festgestellt.

### Gram-positive Bakterien

In Abbildung 3.2 sind die Untersuchungsergebnisse von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* dargestellt. Angegeben sind links die Mittelwerte der Kolonie-bildenden Einheiten pro mL, rechts die Mittelwerte des Gesamt-RNA-Gehalts in ng pro  $\mu\text{L}$ .

Bei *Enterococcus faecium* reduzierten sich die Kolonie-bildenden Einheiten nach einer Behandlung von 5 Tagen bei osmotischem Stress von  $3,4 \times 10^8$  Bakterien pro mL bei auf  $5,8 \times 10^7$  Zellen pro mL. Dies entsprach einer Abnahme von etwas mehr als einer log-Stufe. Weitere Versuche ergaben sogar eine Abnahme von bis zu 2 log-Stufen. Der Gesamt-RNA-Gehalt stieg hingegen von 253 ng pro  $\mu\text{L}$  auf 776 ng pro  $\mu\text{L}$  nach 5 Tagen Behandlung um den Faktor 3 an.



**Abb. 3.2:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. LW: Behandlung mit Leitungswasser. N: Behandlung mit Salzlösung. SD: Standardabweichung. ■ : KBE LW (SD:  $2,1 \times 10^8$ ), ■ : KBE N (SD:  $1,5 \times 10^8$ ), ▲ : RNA LW (SD: 24,96), ▲ : RNA N (39,04).

Bei Hungerstress durch die Inkubation in nährstoffarmem Leitungswasser kam es zu einer Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten von  $5,3 \times 10^8$  Bakterien pro mL bis zu  $3,5 \times 10^5$  Zellen pro mL nach einer Inkubation von 5 Tagen. Dies entsprach einem Rückgang von etwas mehr als 3 log-Stufen. Die Gesamt-RNA-Menge währenddessen stieg von 195 ng pro  $\mu\text{L}$  auf 778 ng pro  $\mu\text{L}$ , was einer Zunahme um den Faktor 4 entsprach.

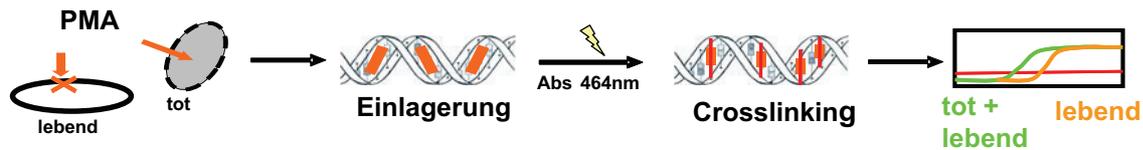
*Enterococcus faecalis* zeigte bei osmotischem Stress eine deutliche Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten von  $4,3 \times 10^8$  Bakterien pro mL bei der Kontrolle auf  $2,8 \times 10^6$  Zellen pro mL nach 5 Tagen, was einem Rückgang von etwas mehr als 2 log-Stufen entsprach. Im gleichen Zeitraum blieb der Gesamt-RNA-Gehalt mit einer Schwankung von 217 ng pro  $\mu\text{L}$  bis 337 ng pro  $\mu\text{L}$  weitgehend konstant.

Unter oligotrophen Bedingungen nahmen die Kolonie-bildenden Einheiten ebenfalls ab. Bei den unbehandelten Zellen wurden  $4,0 \times 10^8$  Bakterien pro mL detektiert, nach einer Behandlungsdauer von 5 Tagen lag die Zellzahl bei  $3,4 \times 10^6$  Bakterien pro mL. Dies war eine Reduktion von etwas mehr als zwei log-Stufen, welche auch bei osmotischem Stress festgestellt werden konnte. Der Gehalt an Gesamt-RNA stieg von 332 ng pro  $\mu\text{L}$  bei den Referenzbakterien auf 639 ng pro  $\mu\text{L}$  nach 5 Behandlungstagen um den Faktor 2 an, der bei weiteren Versuchen zwischen 1,5 und 3,7 variierte.

Zusammenfassend sieht man deutliche Unterschiede zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Während sich bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* keine deutlichen Auswirkungen auf den Gesamt-RNA-Gehalt und die Anzahl der KBE bei Stress zeigten, fällt bei den Enterokokken eine Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten bei gleichzeitiger Zunahme des Gesamt-RNA-Gehalts auf.

### **Weiterführende Untersuchungen**

Auf Grund dieser Feststellung wurde bei den Gram-positiven Bakterien zusätzlich zum Gesamt-RNA-Gehalt und der Anzahl der KBE, der Anteil der ribosomalen RNA (rRNA), sowie die Anzahl der nicht-kultivierbaren Zellen bestimmt, um die Bakterien zu erfassen, die noch lebend sind, aber mit herkömmlichen Verfahren nicht mehr detektiert werden können. Dazu wurden Vitalitätstests mit Propidiummonoazid (PMA) durchgeführt. PMA ist zweifach positiv geladen und in der Lage, in membrangeschädigte und damit nicht mehr kultivierbare Zellen einzudringen und an die DNA zu binden, die somit für nachfolgende PCR-Amplifikationen nicht mehr zu Verfügung steht (siehe Abbildung 3.3).



**Abb. 3.3:** Wirkungsmechanismus von PMA zur Unterscheidung geschädigter und intakter Bakterien.

Diese Versuche wurden durchgeführt, da es Hinweise darauf gibt, dass Bakterien bei Stressbedingungen einen VBNC (viable but nonculturable)-Zustand erlangen, der durch eine Nichtkultivierbarkeit der Bakterien mit herkömmlichen mikrobiologischen Methoden gekennzeichnet ist.

Daher wurde zusätzlich 1 mL Bakteriensuspension mit PMA behandelt, die DNA isoliert und 1:1000 verdünnt. Mit Hilfe der quantitativen PCR und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I sowie den Primern, die spezifisch für die 16S rDNA sind (siehe Tabelle 2.3), wurde der Menge der DNA lebender Zellen, die sowohl aus kultivierbaren als auch aus nicht-kultivierbaren Zellen stammt, gemessen. Die Real-Time-PCR ermöglicht die Quantifizierung von Nucleinsäuren mittels einer Fluoreszenzmessung der DNA-Menge während oder nach jedem Zyklus (siehe Kapitel 2.17). Durch die Software wird die detektierte Fluoreszenz auf eine logarithmische Skala übertragen. Die Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert (threshold cycle). Je früher der Ct-Wert erreicht ist, desto mehr Kopien der Zielsequenz waren in der Probe vorhanden, niedrige Ct-Werte bedeuten viel, hohe Ct-Werte wenig Ausgangsmaterial. Durch die Vergleiche dieser verschiedener Ct-Werte wird der  $\Delta$ Ct-Wert berechnet, wobei ein  $\Delta$ Ct-Wert von 3,3 etwa einer Zehnerpotenz Unterschied in der Zielsequenz oder einer log-Stufe entspricht. Für jede Untersuchung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Ferner wurde der Anteil der ribosomalen RNA (rRNA) in der Gesamt-RNA untersucht, um auszuschließen, dass es sich bei der Zunahme der Gesamt-RNA um eine Schwankung der rRNA-Menge handelt. Dafür wurden 250 ng Gesamt-RNA mit Hilfe der random hexamer Primer (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR mit 0,5 ng cDNA durchgeführt. Für die Detektion der 16S rDNA wurden dafür spezifische Primer (siehe Tabelle 2.3) verwendet.

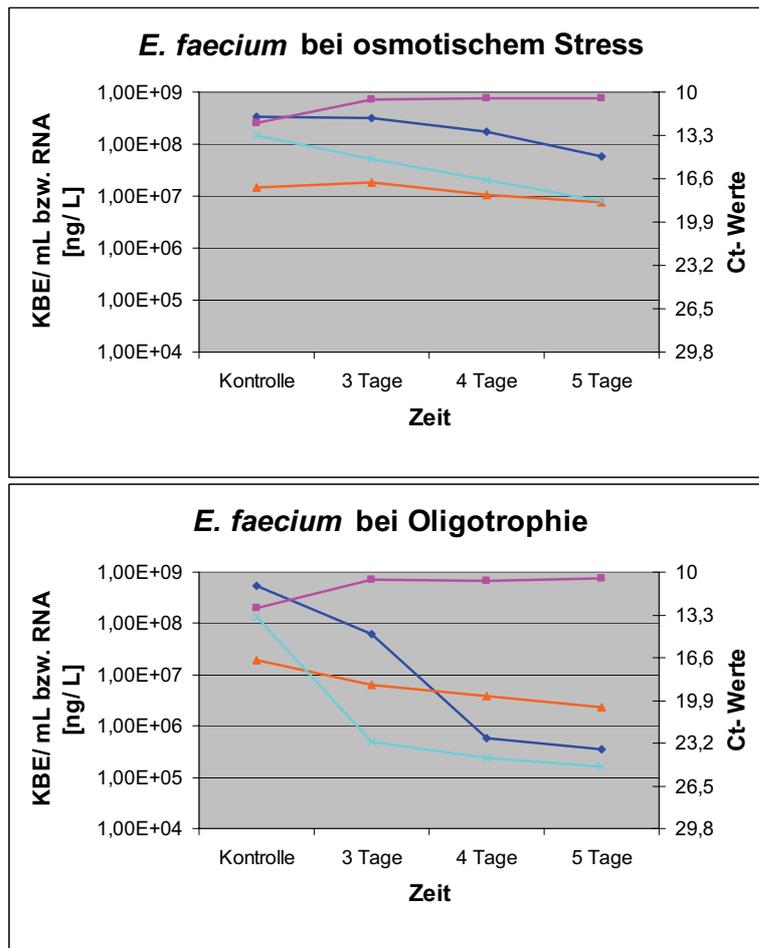
Die Abbildungen 3.4 sowie 3.5 zeigen die Untersuchungsergebnisse von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*. Angegeben sind jeweils links die Mittelwerte der Koloniebildenden Einheiten pro mL und die Mittelwerte des Gesamt-RNA-Gehalts in ng pro L, rechts

die Mittelwerte der Ct-Werte der ribosomalen RNA und der mit PMA behandelten DNA (DNA lebender Zellen).

### ***Enterococcus faecium***

Bei osmotischem Stress nahm die Anzahl der kultivierbaren Zellen um etwa eine log-Stufe ab, während der Gesamt-RNA-Gehalt um den Faktor 3 stieg. Die Ct-Werte für die Bestimmung der 16S crDNA blieben mit einem geringen Anstieg von 17,24 auf 18,37 annähernd auf gleichem Niveau, was einen konstanten 16S rRNA-Anteil in der Gesamt-RNA anzeigte. Bei der Bestimmung der DNA-Menge lebender Zellen durch die Verwendung von PMA konnte eine Abnahme der Zellzahl um etwa 1,5 log-Stufen festgestellt werden. Die Ct-Werte stiegen von 13,27 bei der Kontrolle auf 18,34 nach 5 Inkubationstagen. Der errechnete  $\Delta Ct$  lag bei 5,07. Die ermittelte Reduktion der DNA-Menge korrelierte mit dem Ergebnis der KBE-Untersuchung, bei dem eine Abnahme von etwas mehr als einer log-Stufe festgestellt wurde.

Bei Hungerstress durch die Inkubation in Leitungswasser kam es zu einer Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten um etwas mehr als 3 log-Stufen. Der Gesamt-RNA-Gehalt stieg um circa den Faktor 4 an. Die quantitative PCR für die Messung des Anteils an 16S crDNA lieferte ansteigende Ct-Werte von 16,83 auf 20,42 um 3,59, was einem sinkenden Anteil an 16S rRNA um eine log-Stufe entsprach. Die DNA-Menge lebender Zellen nahm um 3,5 log-Stufen ab, was durch den Anstieg der Ct-Werte von 13,42 bei der Kontrolle auf 24,98 nach 5 Inkubationstagen gezeigt wurde. Dieses Ergebnis korreliert mit den KBE-Messungen, bei denen eine Abnahme der Zellzahl von etwas mehr als 3 log-Stufen ermittelt wurde.

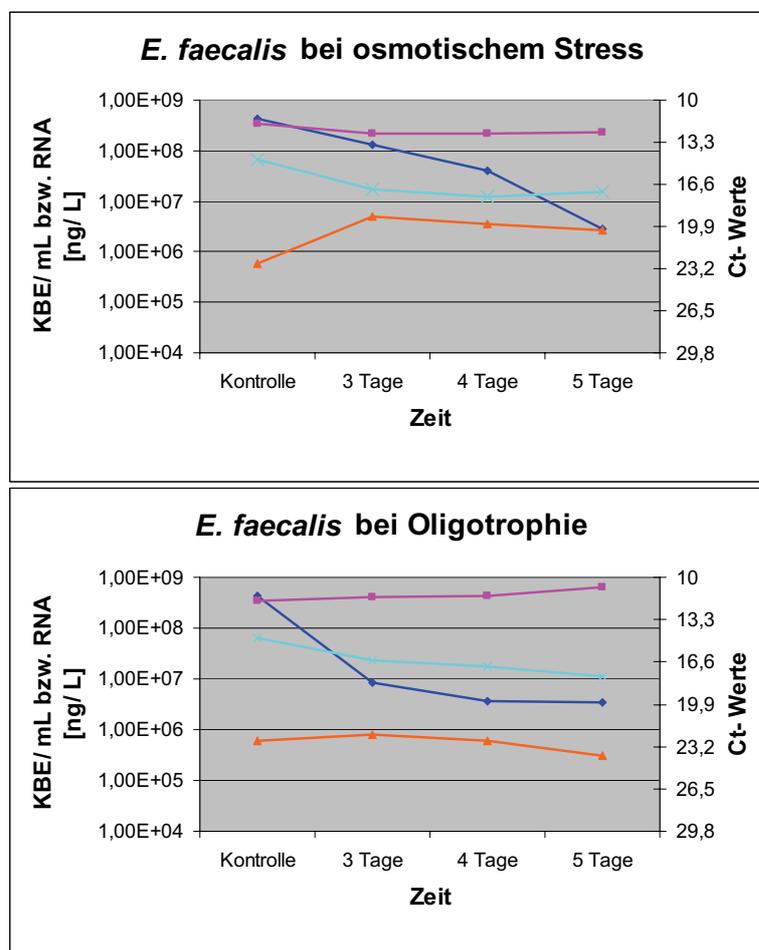


**Abb. 3.4:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt, dem rRNA-Gehalt und PMA-Versuchen bei *Enterococcus faecium* während osmotischem Stress und Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. ◆ : KBE (SD: 1,5E+08), ■ : RNA (SD: 39,04), ▲ : rRNA (SD: 1,01), ◆ : DNA (SD: 0,12).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei *Enterococcus faecium* bei osmotischem Stress eine Zunahme der Gesamt-RNA-Menge um den Faktor 3, bei gleichzeitiger Abnahme der KBE um 1-2 log-Stufen festgestellt wurde. Die Reduktion der Zellzahl konnte durch die Untersuchungen der mit PMA behandelten DNA zur Bestimmung der DNA lebender Zellen bestätigt werden. Der Anteil an ribosomaler RNA in der Gesamt-RNA blieb gleich. Bei Oligotrophie nahm die Gesamt-RNA um den Faktor 4 zu, während der Anteil der ribosomalen RNA um 1 log-Stufe sank. Die Anzahl der kultivierbaren Zellen nahm um 3 log-Stufen ab. Die Ergebnisse der PMA-Untersuchungen korrelierten mit den KBE-Angaben. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Anzahl der kultivierbaren Bakterien und dem DNA-Gehalt lebender Zellen und folglich keine Hinweise auf ein VBNC-Zustand festgestellt werden.

**Enterococcus faecalis**

Die Kolonie-bildenden Einheiten nahmen bei osmotischem Stress um etwa 2 log-Stufen ab. Im gleichen Zeitraum blieb der Gesamt-RNA-Gehalt gleich. Die Ct-Werte für die Messung der 16S crDNA sanken mit Werten von 22,77 bis 20,19 leicht ab, was auf eine geringe Zunahme des Anteils an 16S rRNA hindeutete. Die Abnahme der Bakterienanzahl von weniger als einer log-Stufe wurde anhand der steigenden Ct-Werte von 14,63 auf 17,20, was einem  $\Delta$ Ct-Werte von 2,57 entspricht, ermittelt. Diese Reduktion korrelierte nicht mit dem Ergebnis der KBE-Untersuchungen, bei denen eine Abnahme um etwas mehr als 2 log-Stufen festgestellt wurde.



**Abb. 3.5:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt, dem rRNA-Gehalt und PMA-Versuchen bei *Enterococcus faecalis* während osmotischem Stress und Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. ◆ : KBE (SD: 2,1E+08), ■ : RNA (SD: 13,71), ▲ : rRNA (SD: 0,54), ◆ : DNA (SD: 0,39).

Durch Inkubation in Leitungswasser nahmen die Kolonie-bildenden Einheiten um etwa zwei log-Stufe ab, was auch bei osmotischem Stress festgestellt wurde. Der Gesamt-RNA-Gehalt

stieg im gleichen Zeitraum um fast den Faktor 2 an. Der konstant bleibende Anteil der 16S rRNA-Menge bei Oligotrophie zeigte sich durch die sich nicht wesentlich verändernden Ct-Werte. Die Ct-Werte für die Messung der 16S rDNA stiegen von 14,75 auf 17,71. Der  $\Delta$ Ct-Wert lag bei 2,96, aus dem sich eine Abnahme der Bakterienanzahl von weniger als einer log-Stufe ergab. Die Ergebnisse der KBE-Untersuchungen hingegen zeigten eine Abnahme um etwa 2 log-Stufen.

Zusammenfassend wurde bei *Enterococcus faecalis* bei osmotischem Stress eine Abnahme der KBE um 2 log-Stufen festgestellt, während die Detektion lebender Zellen nur eine Abnahme um weniger als eine log-Stufe erbrachte. Die Gesamt-RNA-Menge blieb konstant, während der Anteil an ribosomaler RNA leicht anstieg. Die Untersuchungen bei Oligotrophie ergaben die gleichen Ergebnisse, allerdings stieg die Gesamt-RNA-Menge um den Faktor 2 an. Die Differenzen in den Ergebnissen der KBE-Untersuchungen und den Vitalitätstests mit PMA sind ein erster Hinweis auf ein möglicherweise beginnendes VBNC-Stadium bei *Enterococcus faecalis*, das als Antwort auf Stress auftreten kann.

### **3.3. Untersuchung möglicher stressregulierter, speziesspezifischer Faktoren bei Referenzbakterien**

Zur Untersuchung der Stressantwort mittels Genexpressionsanalysen wurden die Gram-positiven Bakterien *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* sowie die Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* und ihre speziesspezifischen Gensysteme bei verschiedenen Stressparametern untersucht. Für jedes zu untersuchende Gensystem wurden jeweils spezifisch Primer und Sonden berechnet und validiert (siehe Tabelle 3.1 und 3.2). Die Gesamt-RNA wurde isoliert und einerseits mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese mittels quantitativer PCR untersucht. Parallel wurde der Anteil genspezifischer RNA in der Gesamt-RNA durch Northern Blot-Hybridisierungen näher charakterisiert.

Sämtliche Primer in den Tabellen 3.1 und 3.2 wurden in dieser Arbeit erstellt. Ausnahmen bilden die Primer für die 16S rRNA (Jungfer et al. 2007) von Eubakterien, die Primer für die 23S rRNA von Enterokokken (Meier 1999) und die Primer für die 23S rDNA von *Pseudomonas aeruginosa* (Volkman et al. 2007).

**Tab. 3.1:** Primersequenzen für die quantitative PCR.

Primer	Zielgen	Nukleotidsequenz (5' > 3')	Bakterium
PaRpoSF	<i>rpoS</i>	AGAGCAACCTGCGGTTGGT	<i>P. aeruginosa</i>
PaRpoSR		GGGACAGTCCGCGATTGA	
PaRpoSP		6-FAM-TGAAGATCGCCCCGGCGCTA-TAMRA	
EcRcsAF	<i>rcaA</i>	TAAATATGCCGACGTTATCATTGA	<i>E. coli</i>
EcRcsAR		TCCCTGACCTGCCATCCA	
EcRcsAP		6-FAM-CCGAACCGAATCGAGTATGTTGCGA-TAMRA	
Pbp5828F	<i>pbp5</i>	ACCCGATTACTTTGTCCCATTG	<i>E. faecium</i>
Pbp5938R		GCTGCTTCACCCAAAGGATAATATCTGC	
Elisbp5F	<i>pbp5</i>	GCAGACTCCTTTGTACCAATCACA	<i>E. faecalis</i>
Elisbp5R		GCAGCCCCTGTTGGTAATTC	
EUB 338F	16S rRNA	GATCAGCCACACTGGGACTGA	für Eubakterien
EUB 338R		TCAGGCTTGCGCCCATT	
EUB 338P		6-FAM-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-TAMRA	
ECST784F	23S rRNA	AGAAATTCCAAACGAACTTG	für Enterokokken
ENC854R		CAGTGCTCTACCTCCATCATT	
Pa23FP	23S rDNA	TCCAAGTTTAAGGTGGTAGGCTG	<i>P. aeruginosa</i>
Pa23RPb		ACCACTTCGTCATCTAAAAGACGAC	
Pa23FAM		FAM-AGGTAAATCCGGGGTTTCAAGGCC-TAMRA	

**Tab. 3.2:** Primersequenzen für die Sondenherstellung der Northern Blot-Analysen.

Primer	Zielgen	Nukleotidsequenz (5' > 3')	Bakterium
PaRpoSF	<i>rpoS</i>	AGAGCAACCTGCGGTTGGT	<i>P. aeruginosa</i>
PaRpoSRKlo 721		GAGATCGTCATCCTGCAGCAGCTCG	
EcRcsAFKlo11	<i>rcaA</i>	TTATTATGGATTTATGTAGTTACA	<i>E. coli</i>
EcRcsAR		TCCCTGACCTGCCATCCA	
Pbp55845KloF	<i>pbp5</i>	CAGCAGAAGATATTGATAAGAATCCAG	<i>E. faecium</i>
Pbp51262KloR		CCAGGAGCATAACCTGTGCGCAAATC	
Elisbp5FKlo	<i>pbp5</i>	GCAATTTATTCAGGGATTCAAGCA	<i>E. faecalis</i>
Elisbp5R		GCAGCCCCTGTTGGTAATTC	

### 3.3.1 Expression speziesspezifischer Regulatoren bei Gram-negativen Bakterien

Für die Analyse möglicher stressregulierter Gensysteme bei Gram-negativen Bakterien wurde die Expression des *rpoS*-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* und des *rcaA*-Gens von *Escherichia coli* näher betrachtet.

- Das *rpoS*-Gen codiert für einen alternativen Sigmafaktor, der unter verschiedenen Stressbedingungen die Expression unterschiedlicher Gene induziert, die für die

Synthese von Proteinen für die zellulären Schutzfunktionen verantwortlich sind. RpoS wird aus diesem Grund auch als ein Masterregulator der generellen Stressantwort bezeichnet. Dabei werden die entstandenen Schäden weniger repariert, als vielmehr verhindert.

- Das *rcsA*-Gen ist ein Regulatorprotein des Rcs-Signalwegs, der spezieübergreifend konserviert ist und aus drei Proteinen RcsA, RcsB und RcsC besteht. Das Rcs-System kontrolliert unter anderem die Synthese der extrazellulären Matrix bei *Escherichia coli* (Rahn und Whitfield 2003; Virlogeaux et al. 1996) und spielt eine Rolle bei der Biofilmbildung (Danese et al. 2000). Es reguliert das Schwärmen von Bakterien (Francez-Charlot et al. 2003) und ist an der Antwort auf Austrocknung durch die Kapselbiosynthese sowie Änderung der Osmolarität und Membranzusammensetzung beteiligt (Ferrieres et al. 2003). Bis heute sind keine Untersuchungen des *rcsA*-Gens bei Stressexposition durchgeführt worden.

Die Bakterien einer Vorkultur mit einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,6 bei *Pseudomonas aeruginosa* und 2,1 bei *Escherichia coli* (Kontrolle) wurden für verschieden lange Inkubationszeiträume (1, 2, 3, 4 und 5 Tage) mit einer 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) oder mit Leitungswasser (Oligotrophie) behandelt. Zusätzlich wurden sie während verschiedener Wachstumsphasen (exponentielle und stationäre Phase) entnommen. Die stationäre Phase wird durch eine ansteigende optische Dichte im Medium, was einer zunehmenden Bakterienanzahl entspricht, angezeigt. Die Gesamt-RNA wurde aus jeweils 1 mL Bakteriensuspension isoliert und der RNA-Gehalt photometrisch quantifiziert. Die Werte der einzelnen RNA-Isolationen sind im Anhang aufgeführt (siehe Abbildung 7.7 und 7.8).

#### **Quantitative Bestimmung der *rpoS*- und *rcsA*-mRNA**

Für die Untersuchung der *rpoS*-mRNA von *Pseudomonas aeruginosa* und der *rcsA*-mRNA von *Escherichia coli* wurden 100-1000 ng Gesamt-RNA, je nach der zu Verfügung stehenden Menge der zuvor isolierten RNA, mit den kommerziell erhältlichen random hexamer Primern und der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Zur Quantifizierung von *rpoS* bei *Pseudomonas aeruginosa* wurden jeweils 10 ng der cDNA bei osmotischem Stress und Oligotrophie sowie 1 ng bei den verschiedenen Wachstumsphasen eingesetzt und mit Hilfe der quantitativen PCR analysiert. Als Primer wurde das TaqMan-System PaRpoSF (Vorwärtsprimer)/ R (Rückwärtsprimer)/ P (Gensonde) (siehe Tabelle 3.1) verwendet. Für die Quantifizierung der *rcsA*-mRNA von *Escherichia coli* wurde das Primer/Probe-System EcRcsA mit den jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimern sowie der Gensonde (siehe Tabelle 3.1) benutzt. Bei osmotischem Stress und

Oligotrophie wurden jeweils 10 ng cDNA, bei den verschiedenen Wachstumsphasen 20 ng cDNA eingesetzt.

Die Real-Time-PCR ermöglicht die direkte Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Fluoreszenzmessung durch die dem PCR-Ansatz zugefügte flurogene Gen-Sonde oder des Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I. Je früher die Fluoreszenz-Intensität erreicht ist, umso mehr Kopien der Zielsequenz waren vorhanden. Das bedeutet, dass eine starke Expression eines Gens einen frühen Anstieg der Fluoreszenz und damit einen niedrigen Ct-Wert ergibt, während hohe Ct-Werte eine niedrige Expression des Gens anzeigen. Durch den Vergleich der Ct-Werte von einer behandelten mit einer unbehandelten Probe kann der  $\Delta$ Ct-Wert kalkuliert werden, wobei ein  $\Delta$ Ct-Wert von 3,3 ungefähr einer Zehnerpotenz Unterschied in der Gen-Zielsequenz entspricht. Anhand dieser Werte können der Induktionsfaktor (IF) oder auch der Repressionsfaktor (RF) ermittelt werden, die sich mit  $2^{\Delta Ct}$  berechnen lassen. Die Auswertung erfolgte durch eine relative Quantifizierung, bei der die Expression des zu untersuchenden Gens im Verhältnis zu einem internen ribosomalen Referenzgen, das konstitutiv exprimiert wird, bestimmt wird. Dafür wurde bei beiden Gram-negativen Bakterien das EUB338-Gensystem (siehe Tabelle 3.1) verwendet. Für alle zu untersuchenden Gene wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 3.3 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen des *rpoS*-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* bei osmotischem Stress, Oligotrophie und während unterschiedlicher Wachstumsphasen. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse des *rcaA*-Gens von *Escherichia coli* dargestellt. Angegeben sind die für jede Inkubationszeit gemessenen Ct-Werte mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), die daraus errechneten  $\Delta$ Ct-Werte sowie die Induktionsfaktoren (IF).

#### Osmotischer Stress:

Bei *Pseudomonas aeruginosa* war eine deutliche Expressionszunahme von *rpoS* bis zu einer Inkubation von 4 Tagen erkennbar, was sich aus der Abnahme der Ct-Werte von 24,71 auf 19,55 bestimmen ließ. Danach nahm die Expression wieder leicht ab, was aus der Zunahme der Ct-Werte auf 20,93 hervorging. Die stärkste Induktion des *rpoS*-Gens wurde nach einer Inkubationsdauer von 4 Tagen mit einem  $\Delta$ Ct-Wert von 5,16 und einem Induktionsfaktor von 36 ermittelt.

Auch bei *Escherichia coli* war eine deutliche Zunahme der Expression von *rcaA* in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zu erkennen. Die Ct-Werte nahmen von 28,02 auf 23,79 ab. Der  $\Delta$ Ct-Wert lag bei 4,23. Am 5. Tag der Behandlung wurde der höchste Induktionsfaktor von 19 berechnet.

**Tab. 3.3:** Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	24,74	24,74	24,64	24,71	0,058		
1 Tag	23,13	23,14	22,96	23,08	0,101	1,63	3,10
2 Tage	25,55	25,56	25,58	25,56	0,015	-0,85	-
3 Tage	21,05	21,05	21,04	21,05	0,006	3,66	12,64
4 Tage	19,53	19,57	19,55	19,55	0,020	5,16	35,75
5 Tage	20,81	21,01	20,97	20,93	0,106	3,78	13,74
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	28,30	28,27	28,18	28,25	0,062		
1 Tag	25,23	25,17	25,09	25,16	0,070	3,09	8,51
2 Tage	24,55	24,63	24,54	24,57	0,049	3,68	12,82
3 Tage	24,24	24,23	24,20	24,22	0,021	4,03	16,34
4 Tage	23,31	23,31	23,21	23,28	0,058	4,97	31,34
5 Tage	24,14	24,23	24,25	24,21	0,059	4,04	16,45
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,2	32,41	32,58	32,32	32,44	0,132		
0,4	30,58	30,59	30,14	30,44	0,257	2,00	4,00
0,6	29,98	29,54	29,64	29,72	0,231	2,72	6,59
1,1	31,21	31,12	30,96	31,10	0,127	1,34	2,53
1,3	27,01	26,94	26,93	26,96	0,044	5,48	44,63
1,6	28,89	29,08	28,92	28,96	0,083	3,48	11,16

Oligotrophie:

Wie bei osmotischem Stress konnte bei *Pseudomonas aeruginosa* eine Expressionszunahme des *rpoS*-Gens bis zum 4. Tag beobachtet werden. Die Ct-Werte fielen von 28,25 auf 23,28, was einem  $\Delta$ Ct-Wert von 4,97 und einem Induktionsfaktor von 31 entsprach. Nach 5 Tagen Inkubation in nährstoffarmem Leitungswasser nahm die *rpoS*-Expression wieder ab.

Bei *Escherichia coli* wurde die höchste Expression von *rcaA* nach 3 Tagen ermittelt. Die Ct-Werte sanken von 29,23 auf 25,54, dies war ein Induktionsfaktor von 13. Durch eine weitere Behandlung kam es zu einer Zunahme der Ct-Werte auf 28,44, dies bedeutete, dass die Expression des untersuchten Gens wieder schwächer wurde.

**Tab. 3.4:** Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das *rcaA*-Gen von *Escherichia coli*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	28,18	27,87	28,00	28,02	0,156		
1 Tag	29,66	29,88	29,49	29,68	0,196	-1,66	-
2 Tage	29,31	29,40	29,07	29,26	0,171	-1,24	-
3 Tage	26,44	26,28	26,38	26,37	0,081	1,65	3,14
4 Tage	25,50	25,48	25,53	25,50	0,025	2,52	5,74
5 Tage	23,85	23,76	23,76	23,79	0,052	4,23	18,77
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	29,45	29,20	29,04	29,23	0,207		
1 Tag	30,87	30,78	30,70	30,78	0,085	-1,66	-
2 Tage	27,46	27,47	27,47	27,47	0,006	1,76	3,39
3 Tage	25,51	25,61	25,49	25,54	0,064	3,69	12,91
4 Tage	28,18	28,25	28,24	28,22	0,038	1,01	2,01
5 Tage	28,45	28,39	28,47	28,44	0,042	0,42	1,34
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,1	30,33	30,20	30,28	30,27	0,066		
0,2	30,27	30,47	30,37	30,37	0,100	-0,10	-
0,4	30,53	30,40	30,48	30,47	0,066	-0,20	-
0,8	29,55	29,41	29,48	29,48	0,070	0,79	1,73
1,4	28,98	28,86	28,92	28,92	0,060	1,35	2,55
2,1	26,86	26,65	26,58	26,70	0,146	3,57	11,88

Unterschiedliche Wachstumsphasen:

Bei der Messung der *rpoS*-Expression bei unterschiedlichen Bakteriendichten von *Pseudomonas aeruginosa* nahm der Ct-Wert von 32,44 bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 auf 26,96 bei einer OD<sub>600</sub> von 1,3 ab, danach stieg der Ct-Wert wieder auf 28,96. Ein OD-Wert von 0,2 entsprach der exponentiellen Wachstumsphase, während sich die Bakterien bei einem OD-Wert von 1,3 in der stationären Wachstumsphase befanden. Die stärkste Expression, mit einem Induktionsfaktor 45, wurde somit in der stationären Phase bestimmt.

Die Bestimmung der Expression von *rcaA* bei der Entnahme von *Escherichia coli* bei steigender optischer Dichte im Medium führte zu einer Abnahme der Ct-Werte von 30,27 auf 26,70 bei einer optischen Dichte von 2,1. Dies ergab einen  $\Delta$ Ct-Wert von 3,57, aus dem sich der Induktionsfaktor um 12 des *rcaA*-Gens bei einer optischen Dichte von 2,1 ermitteln ließ. Ein OD-Wert von 0,1 bis 0,4 bedeutete, dass sich die Mikroorganismen in der exponentiellen Phase befanden, danach traten sie in die stationäre Wachstumsphase ein.

### Northern Blot-Hybridisierung

Parallel zur Quantifizierung der Expression von *rpoS* und *rcaA* mittels Real-Time-PCR und zur Absicherung der Ergebnisse kamen Northern Blot-Analysen als ein alternatives RNA-bezogenes Verfahren zum Einsatz. Für die Genexpressionsanalyse von *Pseudomonas aeruginosa* wurde mit dem spezifischen Primerpaar PaRpoSF (Vorwärtsprimer) und PaRpoSRKlo721 (Rückwärtsprimer) (siehe Tab. 3.2) durch PCR eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt. Mit Hilfe dieser Sonde wurde die Expression der *rpoS*-spezifischen mRNA durch Northern Blot-Hybridisierungen untersucht. Bei *Escherichia coli* wurden die Primer EcRcsAFKlo11 (Vorwärtsprimer) und EcRcsAR (Rückwärtsprimer) (siehe Tabelle 3.2) zur Synthese der Digoxigenin-markierte Sonde verwendet.

Für die Versuche wurden jeweils 200 ng der zuvor isolierten Gesamt-RNA von *Pseudomonas aeruginosa* und 500 ng von *Escherichia coli* auf die Nylon-Membran geblottet und mit der denaturierten Sonde spezifisch die *rpoS*- bzw. *rcaA* mRNA-Anteile in der Gesamt-RNA nachgewiesen.

Die Abbildungen 3.6 und 3.8 zeigen die Ergebnisse der Northern Blot-Hybridisierung bei *Pseudomonas aeruginosa*, Abbildung 3.7 und 3.9 bei *Escherichia coli*.

#### Osmotischer Stress:

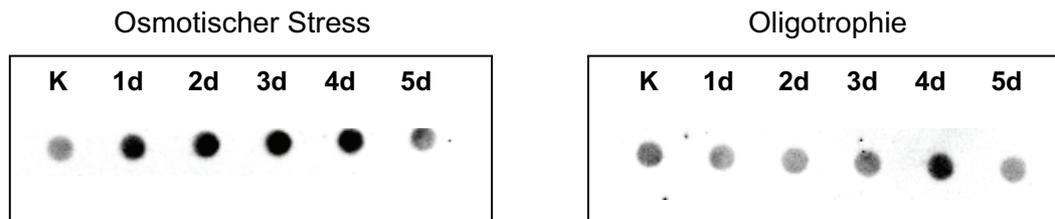
Es war deutlich zu erkennen, dass die Anteile der *rpoS*-mRNA von *Pseudomonas aeruginosa* in der Gesamt-RNA nach 1 bis 4 Tagen Inkubation am höchsten waren. Bei der Kontrolle hingegen war die *rpoS*-Expression niedrig. Dies bestätigte die Ergebnisse der quantitativen PCR, bei denen eine Induktion von *rpoS* bei erhöhter Salzkonzentration ermittelt wurde.

Bei *Escherichia coli* war das Signal am 5. Tag der Inkubation stark ausgeprägt. Auch nach einem Tag Behandlung war es schon deutlich sichtbar. Bei den nicht gestressten Bakterien und während der übrigen Entnahmezeitpunkte war die Expression des *rcaA*-Gens niedriger. Auch dieses Ergebnis korreliert mit dem Resultat der Real-Time-PCR überein, bei der die stärkste Induktion von *rcaA* nach einer Inkubation von 5 Tagen ermittelt wurde. Lediglich die Induktion des *rcaA*-Gens nach dem 1. Behandlungstag konnte durch die quantitative PCR nicht bestätigt werden.

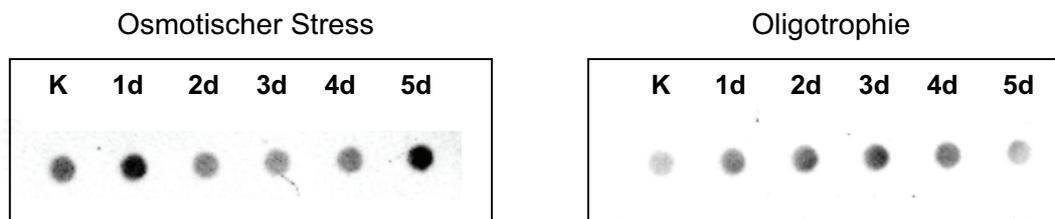
#### Oligotrophie:

Bei *Pseudomonas aeruginosa* war das Signal der *rpoS*-mRNA nach einer viertägigen Inkubation in Leitungswasser am stärksten ausgeprägt. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der quantitativen PCR, bei denen ebenfalls die stärkste Induktion des *rpoS*-Gens nach 4 Tagen Behandlung nachgewiesen wurde.

Die Anteile der *rscA*-mRNA bei den Northern Blot-Analysen von *Escherichia coli* waren nach dreitägiger Inkubation am deutlichsten sichtbar, während die Signale bei der Kontrolle und den übrigen Zeitpunkten nur schwach vorhanden waren. Diese Resultate stimmen weitgehend mit den Ergebnissen der Real-Time-PCR überein, bei denen eine Induktion des *rscA*-Gens bei osmotischem Stress nach 3 Tagen Inkubation gezeigt werden konnte.



**Abb. 3.6:** Northern Blot-Analyse von *rpoS* in der Gesamt-RNA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (rechts). *rpoS* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert. K: Kontrolle, d: Tage.

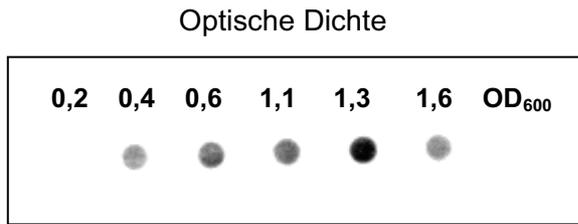


**Abb. 3.7:** Northern Blot-Analyse von *rscA* in der Gesamt-RNA aus *Escherichia coli*. Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (rechts). *RcsA* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert. K: Kontrolle, d: Tage.

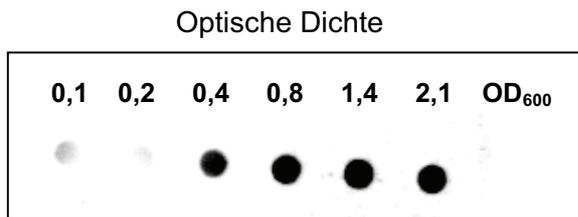
Unterschiedliche Wachstumsphasen:

Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, waren die mRNA-Anteile der *rpoS*-Transkripte bei einer optischen Dichte von 1,3, bei der sich *Pseudomonas aeruginosa* in der stationären Wachstumsphase befindet, im Vergleich zu einer optischen Dichte von 0,2, die der exponentiellen Phase entsprach, deutlich stärker vorhanden. Die wachstumsabhängige Induktion des *rpoS*-Gens wurde somit bestätigt.

Bei *Escherichia coli* konnten bei steigender Bakteriendichte verstärkt mRNA-Anteile des *rscA*-Gens nachgewiesen werden. Die Induktion des *rscA*-Gens während der stationären Phase, die ab einer optischen Dichte von 0,8 begann und ihren stärksten Induktionsfaktor bei einer OD<sub>600</sub> von 2,1 mit 11,88 aufweist, wurde ebenfalls bestätigt.



**Abb. 3.8:** Northern Blot-Analyse von *rpoS* in der Gesamt-RNA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Entnahme bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD<sub>600</sub>). *RpoS* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten *rpoS*- Sonde detektiert.



**Abb. 3.9:** Northern Blot-Analyse von *rcsA* in der Gesamt-RNA aus *Escherichia coli*. Entnahme bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD<sub>600</sub>). *RcsA* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert.

Bezogen auf die Gram-negativen Referenzbakterien konnte bei den Analysen mittels der quantitativen PCR sowohl bei dem untersuchten *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa*, das als Masterregulator der generellen Stressantwort gilt, als auch beim *rcsA*-Gen von *Escherichia coli* eine Induktion bei allen drei Stressformen nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine unmittelbare Beteiligung des *rcsA*-Gens an der Stressantwort des Rcs-Signalwegs hin, der unter anderem bei der EPS-Synthese und der Biofilmbildung eine Rolle spielt. Die Induktion der beiden speziesspezifischen Regulatoren bei Stress wurde durch ein alternatives RNA-bezogenes Verfahren bestätigt.

### 3.3.2 Expression speziesspezifischer Regulatoren bei Gram-positiven Bakterien

Für die Untersuchung möglicher stressregulierter Gensysteme bei Gram-positiven Bakterien wurde die Expression des *pbp5*-Gen von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* quantifiziert.

- Das *pbp5*-Gen gehört zur Familie der Penicillin-bindenden Proteine, die die Quervernetzung benachbarter Glykanstränge katalysieren und somit essentiell für die

Mureinsynthese in den Zellwänden sind. Die bakterielle Zellwand stellt die erste Stelle dar, an der es zu einer Stressreaktion kommen kann.

Besonders signifikant sind die vermehrten Anteile des Penicillin-bindenden Proteins 5 (PBP5) in der Zellwand von *Enterococcus faecalis* im VBNC (viable but nonculturable)-Stadium (Signoretto et al. 2000). Allerdings konnte bis heute keine veränderte Expression des *pbp5*-Gens nachgewiesen werden (Lleo et al. 2001; Lleo et al. 2000).

Beide Enterokokken-Spezies einer Vorkultur mit einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 2,5 (Kontrolle) wurden für 1, 2, 3, 4 und 5 Tage mit einer 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) und mit Leitungswasser (Oligotrophie) behandelt oder sie wurden während verschiedener Wachstumsphasen (exponentielle und stationäre Phase) entnommen. Bei *Enterococcus faecalis* wurde erst nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen die Genexpression gemessen und nur die stationäre mit der exponentiellen Phase verglichen, da bei diesen Zeitpunkten die Expressionsunterschiede bei *Enterococcus faecium* am deutlichsten waren. Aus jeweils 1 mL Bakteriensuspension wurde die Gesamt-RNA isoliert und der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Die Werte der einzelnen RNA-Isolationen sind im Anhang aufgeführt (siehe Abbildung 7.9 und 7.10).

### **Quantitative Bestimmung der *pbp5*-mRNA**

Die Analyse der *pbp5*-mRNA von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* erfolgte mit Hilfe von spezifischen Primer-Systemen und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I, der während der Elongation in die doppelsträngige DNA interkaliert. Für *Enterococcus faecium* wurden die Primer Pbp5828F (Vorwärtsprimer) und Pbp5938R (Rückwärtsprimer) verwendet, für *Enterococcus faecalis* das Primerpaar Elispbp5F (Vorwärtsprimer) und Elispbp5R (Rückwärtsprimer) (siehe Tabelle 3.1). Zur Untersuchung des ribosomalen Referenzgens, das konstitutiv exprimiert wird, kamen die Primer ECST784F (Vorwärtsprimer) und ENC854R (Rückwärtsprimer) (siehe Tabelle 3.1) zum Einsatz. Die Expression des zu untersuchenden Gens wurde im Verhältnis zum internen Referenzgen bestimmt.

Es wurden jeweils 100-1000 ng Gesamt-RNA, je nach der zu Verfügung stehenden Menge der zuvor isolierten RNA, mit random hexamer Primern und der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Quantifizierung des *pbp5*-Gens wurden bei beiden Gram-positiven Bakterien jeweils 10 ng der cDNA eingesetzt. Für die zu untersuchenden Gene wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Tabellen 3.5 und 3.6 zeigen die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* bei osmotischem Stress sowie bei Oligotrophie und während unterschiedlicher Bakteriendichten. Dargestellt sind die für die

jeweiligen Inkubationszeiten gemessenen Ct-Werte mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), die daraus errechneten  $\Delta$ Ct-Werte sowie die Induktionsfaktoren (IF) bzw. Repressionsfaktoren (RF).

Osmotischer Stress:

Bei der Messung der *pbp5*-Expression von *Enterococcus faecium* war deutlich zu erkennen, dass die Ct-Werte von 23,78 auf 28,70 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer zunahmen. Dies ergab einen  $\Delta$ Ct-Wert von 4,92. Das näher betrachtete Gen wurde um den Faktor 30 am 5. Tag der Inkubation reprimiert.

Beim zweiten Vertreter der Gram-positiven Bakterien - *Enterococcus faecalis* - wurde ebenfalls eine Repression des zu untersuchenden Gens festgestellt. Die Ct-Werte nahmen von 17,57 auf 22,42 nach 3 Tagen Inkubation zu, aus denen sich der  $\Delta$ Ct-Wert von 4,85 ermitteln ließ. Der berechnete Repressionsfaktor lag bei 29. Eine weitere Inkubation in einer 0,5 M Salzlösung führte zu einer wieder stärker werdenden *pbp5*-Expression, die Ct-Werte stiegen bis auf 20,20 an.

Oligotrophie:

Die Expressionsbestimmung von *pbp5* bei Nährstofflimitierung führte bei *Enterococcus faecium* zu einer Zunahme der Ct-Werte von 24,55 auf 30,02 nach einer Inkubation von 4 Tagen, danach sanken die Werte wieder auf 28,97 ab. Damit ließ sich mit einem  $\Delta$ Ct-Wert von 5,47 eine Repression des untersuchten Gens um den Faktor 44 am 4. Tag ermitteln.

Bei *Enterococcus faecalis* wurde das *pbp5*-Gen bei Inkubation in nährstoffarmem Leitungswasser ebenfalls reprimiert. Die Ct-Werte nahmen von 17,81 auf 25,53 bei einer Inkubationszeit von 4 Tagen zu. Die stärkste Repression von *pbp5* lag bei einem Faktor von 211. Eine verlängerte Inkubation führte zu einer zunehmenden Expression des *pbp5*-Gens. Die gemessenen Ct-Werte sanken auf 24,58.

Unterschiedliche Wachstumsphasen:

Bei zunehmender Dichte der Bakterien im Medium sank die *pbp5*-Expression bei *Enterococcus faecium*. Die Messung der Ct-Werte ergab eine Zunahme von 21,12 auf 25,30 bei einer optischen Dichte von 2,5. Dies entsprach einer Repression um den Faktor 18 des *pbp5*-Gens in der stationären Phase, da bei einem OD-Wert von 0,2 bis 0,7 die Bakterien sich in der exponentiellen Phase befanden, während es ab einer optischen Dichte von 0,8 bei *Enterococcus faecium* zum Eintritt in die stationäre Phase kam.

Die Bestimmung der *pbp5*-Expression von *Enterococcus faecalis* bei steigender optischer Dichte im Medium führte zu einer Abnahme der Ct-Werte von 23,56 auf 17,27 bei einem OD-Wert von 2,5. Dies entsprach einem  $\Delta$ Ct-Wert von 6,33, aus dem sich ein Induktionsfaktor

um 80 des *pbp5*-Gens in der stationären Wachstumsphase ermitteln ließ. Auch bei *Enterococcus faecalis* war die Expression des *pbp5*-Gens abhängig vom Zellwachstum. Allerdings wurde im Gegensatz zu *Enterococcus faecium* eine Induktion von *pbp5* festgestellt.

**Tab. 3.5:** Quantitative PCR mit dem Primer-System spezifisch für das *pbp5*-Gen von *Enterococcus faecium*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung. -: keine Repression messbar.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	ΔCt	RF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	24,15	23,65	23,54	23,78	0,325		
1 Tag	23,70	23,91	23,86	23,82	0,110	0,04	-
2 Tage	24,80	24,66	24,53	24,66	0,135	-0,88	1,84
3 Tage	25,26	25,53	26,47	25,75	0,635	-1,97	3,92
4 Tage	26,30	26,26	26,45	26,34	0,100	-2,56	5,90
5 Tage	28,89	28,68	28,52	28,70	0,186	-4,92	30,27
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	24,54	24,55	24,56	24,55	0,010		
1 Tag	26,97	27,03	27,27	27,09	0,159	-2,54	5,82
2 Tage	27,83	28,23	28,05	28,04	0,200	-3,49	11,24
3 Tage	29,03	28,91	28,93	28,96	0,064	-4,41	21,26
4 Tage	30,13	30,10	29,82	30,02	0,171	-5,47	44,32
5 Tage	29,05	29,03	28,84	28,97	0,116	-4,42	21,41
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,2	21,07	21,16	21,12	21,12	0,045		
0,4	20,82	20,82	20,84	20,83	0,012	0,29	-
0,6	23,26	23,24	23,25	23,25	0,010	-2,13	4,38
0,7	24,43	24,47	24,52	24,47	0,045	-3,35	10,20
0,8	24,95	24,92	25,03	24,97	0,057	-3,85	14,42
2,5	25,35	25,23	25,32	25,30	0,062	-4,18	18,13

**Tab. 3.6:** Quantitative PCR mit dem Primer-System spezifisch für das *pbp5*-Gen von *Enterococcus faecalis*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. RF: Repressionsfaktor. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	ΔCt	RF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	17,65	17,64	17,42	17,57	0,130		
3 Tage	22,50	22,42	22,35	22,42	0,075	-4,85	28,84
4 Tage	21,33	21,24	21,05	21,21	0,143	-3,64	12,47
5 Tage	20,45	20,17	19,98	20,20	0,236	-2,63	6,19
<b>Leitungswasser ( Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	18,72	17,58	17,14	17,81	0,815		
3 Tage	25,08	24,63	24,50	24,74	0,304	-6,93	121,94
4 Tage	25,75	25,51	25,33	25,53	0,211	-7,72	210,84
5 Tage	24,59	24,55	24,60	24,58	0,026	-6,77	109,14
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
	Ct-Werte			MW Ct		ΔCt	IF
0,2	23,61	23,63	23,56	23,60	0,036		
2,5	17,27	17,43	17,10	17,27	0,165	6,33	80,45

### Northern Blot-Hybridisierung

Parallel zur Quantifizierung der Expression des *pbp5*-Gens mittels der quantitativen PCR wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt, um die Ergebnisse der Genexpression zu verifizieren. Für die Genexpressionsanalyse von *Enterococcus faecium* wurden mit den spezifischen Primern Pbp5845KloF (Vorwärtsprimer) und Pbp51262KloR (Rückwärtsprimer) und bei *Enterococcus faecalis* mit Hilfe der Primer Elispbp5FKlo (Vorwärtsprimer) und Elispbp5R (Rückwärtsprimer) (siehe Tabelle 3.2) durch PCR Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt.

Es wurden jeweils 200 ng der zuvor isolierten Gesamt-RNA auf die Nylon-Membran geblottet und mit der denaturierten Sonde spezifisch die *pbp5* mRNA-Anteile nachgewiesen.

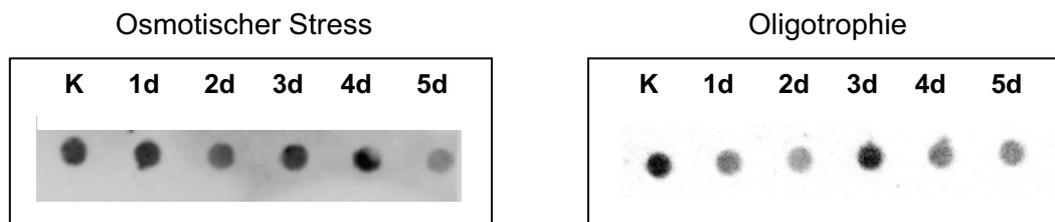
Die Abbildungen 3.10, 3.11 und 3.12 zeigen die Ergebnisse der Northern Blot-Hybridisierung bei *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*.

#### Osmotischer Stress:

Es ist zu erkennen, dass bei *Enterococcus faecium* die *pbp5* mRNA-Anteile in der Gesamt-RNA am 5. Behandlungstag am schwächsten waren. Bei den unbehandelten Bakterien und während der übrigen Entnahmezeitpunkte war die *pbp5*-Expression deutlich stärker. Dies

korrelierte mit den Ergebnissen der quantitativen PCR, bei der die stärkste Repression des Gens nach einer Inkubation von 5 Tagen ermittelt wurde.

Bei *Enterococcus faecalis* waren die mRNA-Anteile des *pbp5*-Gens am 3. und 4. Behandlungstag am wenigsten sichtbar. Bei der Kontrolle und nach fünftägiger Behandlung hingegen war die *pbp5*-Expression deutlich stärker. Damit konnten die Ergebnisse der Real-Time-PCR bestätigt werden, bei denen die höchste Repression von *pbp5* nach 3 und 4 Tagen berechnet wurde.

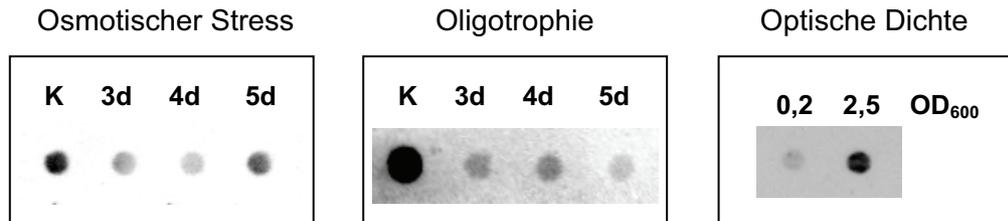


**Abb. 3.10:** Northern Blot- Analyse von *pbp5* in der Gesamt-RNA aus *Enterococcus faecium*. Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (rechts). *Pbp5* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert. K: Kontrolle, d: Tage.

Oligotrophie:

Während der Inkubation in Leitungswasser waren die Signale der *pbp5*-mRNA von *Enterococcus faecium* bei der Kontrolle und nach 3 Tagen Inkubation am stärksten ausgeprägt. Bei den übrigen Zeitpunkten waren die Signale nicht so deutlich erkennbar. Diese Ergebnisse stimmten mit den Resultaten der quantitativen PCR überein, bei denen ebenfalls eine Repression des *pbp5*-Gens bei Oligotrophie nachgewiesen wurde. Allerdings konnten die stark ausgeprägten *pbp5* mRNA-Anteile am dritten Tag, die eine verstärkte Expression des Gens anzeigten, durch die quantitative PCR nicht verifiziert werden.

Bei *Enterococcus faecalis* waren die Anteile der *pbp5*-mRNA bei der Kontrolle am deutlichsten sichtbar. Bei den weiteren Entnahmezeitpunkten war die Expression von *pbp5* schwächer. Diese Feststellungen konnten durch die Ergebnisse der quantitativen PCR bestätigt werden, bei denen eine Repression des *pbp5*-Gens bei Hungerstress festgestellt wurde. Auch war anhand der Signalintensität bei der Kontrolle im Vergleich zu den behandelten Bakterien erkennbar, dass die Repression von *pbp5* bei Oligotrophie deutlich stärker ausgeprägt war als bei osmotischem Stress.

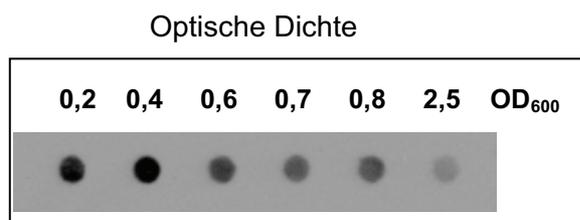


**Abb. 3.11:** Northern Blot- Analyse von *pbp5* in der Gesamt- RNA aus *Enterococcus faecalis*. Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (Mitte) und bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD<sub>600</sub>) (rechts). *Pbp5* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert. K: Kontrolle, d: Tage.

Unterschiedliche Wachstumsphasen:

Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse der Expression von *pbp5* in verschiedenen Wachstumsphasen bei *Enterococcus faecium*, bei denen eine deutlich schwächere Ausprägung der *pbp5*-mRNA bei steigender Bakteriendichte zu erkennen war. Die Repression des *pbp5*-Gens in der stationären Phase mittels quantitativer PCR wurde durch diese Untersuchung bestätigt.

Bei *Enterococcus faecalis* war ein deutlich stärkeres Signal der *pbp5*-RNA bei einer optischen Dichte von 2,5 zu erkennen. Die Induktion des Gens in der stationären Phase, berechnet mit Hilfe der Real-Time-PCR, wurde durch die Northern Blot-Analysen bewiesen.



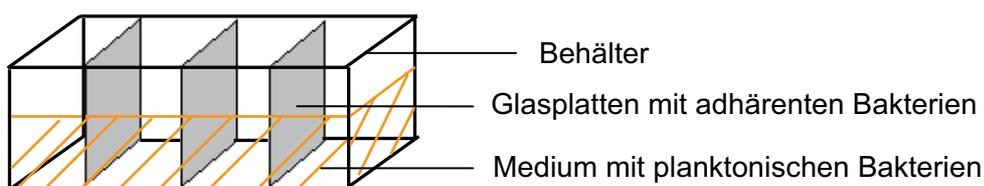
**Abb. 3.12:** Northern Blot- Analyse von *pbp5* in der Gesamt-RNA aus *Enterococcus faecium*. Entnahme bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD<sub>600</sub>). *Pbp5* wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert.

Die Untersuchungen der Gram-positiven Bakterien zeigten eine Repression des für die Peptidoglykansynthese verantwortlichen *pbp5*-Gens bei osmotischem Stress und bei Nährstoffmangel. In der stationären Phase wurde eine Induktion des Gens bei *Enterococcus faecalis* ermittelt, während *Enterococcus faecium* eine Repression des Gens aufwies. Diese Ergebnisse sprechen für eine stressabhängige Expression von *pbp5* bei Enterokokken.

### 3.4 Untersuchung der Expression des *rpoS*-Gens und des *rcsA*-Gens bei adhärenen Bakterien

Neben den Untersuchungen stressregulierter Faktoren bei planktonisch lebenden Gram-negativen Referenzbakterien wurde auch die Expression des Sigmafaktors *rpoS* bei adhärenen *Pseudomonas aeruginosa* und des an der Biofilm- und EPS (extrazelluläre polymere Substanzen)-Synthese beteiligten *rcsA*-Gens bei adhärenen *Escherichia coli* betrachtet. Für Mikroorganismen stellt die Fähigkeit der Biofilmbildung eine Möglichkeit dar, sich vor Umweltstress zu schützen. Vorteile gegenüber der planktonischen Lebensweise sind vor allem der Schutz vor Austrocknung, extremen pH-Werten, Desinfektionsmitteln oder Antibiotika (Hoyle 1991). Zusätzlich kommt es zu einer besseren Versorgung mit Nährstoffen.

Für die folgenden Analysen wurden die zu untersuchenden Bakterien in einer Färbeküvette mit einem Volumen von 250 mL, in dem sich Glasplatten mit einer Aufwuchsfläche von 13,75 cm<sup>2</sup> pro Seite befanden, über 7 Tage im Vollmedium bei 37 °C inkubiert (siehe Abbildung 3.13). Es handelte sich hierbei um einen Batch-Reaktor, daher wurde alle drei Tage das Medium erneuert. In dieser Zeit lagerten sich die Zellen an die Glasplatten an und bildeten einen Biofilm. Nach einer Woche wurde eine Probe der planktonischen Bakterien, die sich in der stationären Phase befanden, aus dem Anzuchtmedium sowie eine Glasplatte mit adhärenen Bakterien entnommen.



**Abb. 3.13:** Schematische Darstellung der Biofilmanzucht.

Danach wurde das Medium durch eine 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) oder Leitungswasser (Oligotrophie) ersetzt und die adhärenen Bakterien auf den Glasplatten für weitere 5 Tage inkubiert. Täglich wurde eine Glasplatte mit den sich darauf befindenden Bakterien entnommen.

Aus jeweils 1 mL Bakteriensuspension der planktonischen Bakterien bzw. aus der von einer Glasplatte abgeschabten adhärenen Bakterien wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe

der reversen Transkriptase und den kommerziell erhältlichen random hexamer Primer in cDNA umgeschrieben. Diese wurde näher untersucht mittels quantitativer PCR und den spezifischen Primern für das *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa*, den Primern für das *rscA*-Gen von *Escherichia coli* und dem EUB338-Gensystem (siehe Tabelle 3.1), für ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen als Normierungsparameter. Für die Analyse der Genexpression wurde bei beiden untersuchten Gensystemen jeweils nur 1 ng cDNA eingesetzt, da die Menge der isolierten Gesamt-RNA aus den adhärenen Bakterien sehr gering war. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Aufgrund der geringen Biomasse war es ebenfalls nicht möglich, ausreichende Mengen an Gesamt-RNA aus adhärenen Bakterien nach 5 Tagen Inkubation zu isolieren, daher wurden die Versuche nur bis zum 4. Tag durchgeführt. Nach dieser Zeitdauer konnte genug RNA für die folgenden Versuche gewonnen werden. Angegeben sind jeweils die Ct-Werte mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), die errechneten  $\Delta$ Ct-Werte sowie die Induktionsfaktoren (IF). IF1 stellt dabei den Induktionsfaktor dar, der bei dem Vergleich der Expression adhärenen gestresster Bakterien (nach 5tägiger Inkubation in einer 0,5 M Salzlösung oder Leitungswasser) im Vergleich zu planktonischen Bakterien ermittelt wurde, während IF2 die Unterschiede der gestressten adhärenen Bakterien mit den unbehandelten, adhärenen Zellen zeigt.

## ***Pseudomonas aeruginosa***

### **A) Reinkultur**

In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen des *rpoS*-Gens bei *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt.

Im Vergleich der planktonischen Bakterien zu den adhärenen Bakterien war eine deutliche Verstärkung der Expression von *rpoS* erkennbar. Die Ct-Werte nahmen von 27,35 bzw. 29,48 auf 24,34 bzw. 26,82 ab. Der  $\Delta$ Ct-Wert lag bei 3,01 bzw. 2,66, anhand diesem der Induktionsfaktor von 8 bzw. 6 berechnet werden konnte. Somit war die Expression von *rpoS* bei adhärenen Bakterien erhöht.

Durch osmotischen Stress stieg die Induktion auf den Faktor 12 nach 3 Tagen Inkubation an. Beim Vergleich der unbehandelten, adhärenen Bakterien mit den durch eine 0,5 M Salzlösung behandelten, adhärenen Bakterien (IF2) und ihren entsprechenden Ct-Werten von 24,34 und 23,77 wird allerdings deutlich, dass es zu keiner Induktion von *rpoS* durch osmotischen Stress kam. Am 4. Tag befand sich die Expression von *rpoS* wieder auf dem gleichen Niveau wie dem der planktonischen Bakterien.

Bei Hungerstress verstärkte sich die Induktion mit der Inkubationszeit bis auf einen Faktor von 60 am 4. Tag (IF1). Vergleicht man die unbehandelten, adhärenen Bakterien mit den behandelten (IF2) nahmen die Ct-Werte von 26,82 auf 23,57 ab, dies entsprach einem  $\Delta$ Ct-Wert von 3,25 und einem Induktionsfaktor von 10.

**Tab. 3.7:** Quantitative PCR mit dem Primer/Probe- System spezifisch für das *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Expression wurde bei planktonischen Bakterien, unbehandelten Biofilmen nach verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. IF1: IF im Vergleich zu planktonischen Bakterien. IF2: IF im Vergleich zu adhärenen Zellen. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF1/ IF2
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Plankton. Bakterien	27,34	27,42	27,28	27,35	0,070		
Biofilm (7 Tage alt)	24,35	24,42	24,26	24,34	0,080	3,01	8,06
+ Stress für 2 Tage	24,25	23,72	23,69	23,89	0,315	3,46	11,00/ -
+ Stress für 3 Tage	23,82	23,81	23,68	23,77	0,078	3,58	11,96/ -
+ Stress für 4 Tage	26,55	26,47	26,44	26,49	0,057	0,86	1,82/ -
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Plankton. Bakterien	29,60	29,47	29,38	29,48	0,111		
Biofilm (7 Tage alt)	27,03	26,80	26,62	26,82	0,206	2,66	6,32
+ Stress für 2 Tage	25,43	25,84	25,51	25,59	0,217	3,89	14,83/ -
+ Stress für 3 Tage	24,06	24,00	23,85	23,97	0,108	5,51	45,57/ 7,21
+ Stress für 4 Tage	23,62	23,56	23,52	23,57	0,050	5,91	60,13/ 9,51

Bei den oben aufgeführten Versuchen mit adhärenen Bakterien wurde deutlich, dass ein Biofilm eine Schutzfunktion für die Bakterien darstellt. Während bei planktonischen Bakterien die Induktion des an der generellen Stressantwort beteiligten *rpoS*-Gens bei einem Faktor von etwa 30 lag (vgl. Kapitel 3.3.1), wurde bei adhärenen Bakterien ein deutlich geringerer Induktionsfaktor ermittelt (osmotischer Stress: keine Induktion, Oligotrophie: Induktionsfaktor 10). Somit kam es auch bei Biofilmmzellen zu einer Stressantwort (IF2), die aber bei weitem schwächer ausgeprägt war als bei planktonischen Zellen.

## B) Mischkultur

Zusätzlich zu den Versuchen mit adhärenen Reinkulturen wurden Genexpressionsanalysen des *rpoS*-Gens bei adhärenen Mischkulturen durchgeführt, da es sich in natürlichen Habitaten bei Biofilmen um den Verband verschiedenster Bakterien handelt. Dazu wurden Biofilme mit *Pseudomonas aeruginosa* und einer natürlichen Mischpopulation aus dem Ablauf der Kläranlage in Neureut über 7 Tage auf Glasplatten im Vollmedium angezogen und dann osmotischem Stress (0,5 M Salzlösung) oder Oligotrophie (Leitungswasser) ausgesetzt. Um ausreichend Biomasse für eine RNA-Isolation und anschließender quantitativer PCR für das *rpoS*-Gen zur Verfügung zu haben, wurden etwa 600 mal mehr Pseudomonaden als Abwasserbakterien eingesetzt. Dazu wurde die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) der Abwasserbakterien sowie der Pseudomonaden vorher bestimmt. Analog zu den Versuchen mit Reinkulturen wurden Proben der planktonischen Zellen, unbehandelter Biofilme und der stressbehandelten Biofilme entnommen, die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase sowie den random hexamer Primer in cDNA umgeschrieben. 10 ng dieser cDNA wurde mittels quantitativer PCR und den spezifischen Primern für das *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa* (siehe Tabelle 3.1) näher untersucht. Für die Untersuchung des konstitutiv exprimierten Referenzgens wurden die Primer Pa23FP und Pa23RPb (siehe Tabelle 3.1) verwendet. Diese sind spezifisch für *Pseudomonas aeruginosa* und erfassen somit die Genexpression der natürlichen Mischpopulation nicht. Aufgrund der geringen Biomasse konnte bei osmotischem Stress lediglich eine Doppelbestimmung durchgeführt werden.

In Tabelle 3.8 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von *rpoS* bei adhärenen Mischkulturen dargestellt.

Es war eine Induktion des *rpoS*-Gens im Vergleich zu planktonischen Bakterien mit einem Faktor um 4 bzw. 6 erkennbar, da die Ct-Werte von 29,45 auf 27,46 bzw. von 33,11 auf 30,45 abnahmen.

Bei osmotischem Stress wurde das untersuchte Gen weiterhin induziert. Die Ct-Werte fielen auf 21,11, das bedeutete die Induktion stieg auf einen Faktor von 324 nach 2 Tagen Inkubation an. Danach wurde die Expression von *rpoS* wieder schwächer. Im Gegensatz zu den adhärenen Reinkulturen war eine verstärkte Expression am 2. Tag der Behandlung erkennbar, die nach 4 Tagen deutlich zurückging. Betrachtet man die Induktionsfaktoren der adhärenen, unbehandelten Mischkulturen mit der behandelten (IF2), so wurde das *rpoS*-Gen um den Faktor 82 induziert, was aus der Abnahme der Ct-Werte von 27,46 auf 21,11 am 2. Tag ermittelt werden konnte.

Beim Vergleich der planktonischen Bakterien mit den durch Hungerstress behandelten, adhärenen Mischkulturen wurde ein Induktionsfaktor von 49 aus der Abnahme der Ct-Werte

von 33,11 auf 27,51 nach zweitägiger Inkubation berechnet. Danach nahm die Expression von *rpoS* wieder ab. Vergleicht man die adhärenen Mischkulturen mit den durch Hungerstress behandelten (IF2), so kam es zu einer Induktion des *rpoS*-Gens um den Faktor 8, da die Ct-Werte von 30,45 auf 27,51 sanken. Die ermittelten Werte waren mit der Expression adhärenter Reinkulturen vergleichbar, allerdings stieg hier die Induktion mit zunehmender Inkubationszeit an.

**Tab. 3.8:** Quantitative PCR mit dem Primer/Probe- System spezifisch für das *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Expression wurde bei planktonischen Bakterien, unbehandelten Biofilmen nach verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. IF1: IF im Vergleich zu planktonischen Bakterien. IF2: IF im Vergleich zu adhärenen Zellen. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar.

	Ct-Werte		MW Ct	SD	ΔCt	IF1/ IF2
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>						
Plankton. Bakterien	29,29	29,61	29,45	0,226		
Biofilm (7 Tage alt)	27,69	27,22	27,46	0,332	1,99	3,97
+ Stress für 2 Tage	21,00	21,21	21,11	0,148	8,34	324,03/ 81,57
+ Stress für 3 Tage	22,94	22,97	22,96	0,021	6,49	89,88/ 22,63
+ Stress für 4 Tage	23,03	22,67	22,85	0,255	6,6	97,01/ 24,42
	Ct-Werte		MW Ct	SD	ΔCt	IF1/ IF2
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>						
Plankton. Bakterien	33,52	33,05	32,77	33,11	0,379	
Biofilm (7 Tage alt)	31,52	30,52	30,32	30,45	0,643	2,66
+ Stress für 2 Tage	27,78	27,49	27,25	27,51	0,265	5,60
+ Stress für 3 Tage	28,85	28,60	28,41	28,62	0,221	4,49
+ Stress für 4 Tage	30,22	29,98	29,67	29,96	0,276	3,15

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Expression des *rpoS*-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* in einer adhärenen Mischkultur im Vergleich zu einer adhärenen Reinkultur bei Oligotrophie nicht änderte (Reinkultur: Induktionsfaktor 10, Mischkultur: Induktionsfaktor 8), wenn man die unbehandelten und die Stress-behandelten Biofilmen betrachtet. Bei der Analyse des Gens bei osmotischem Stress wurde eine verstärkte *rpoS*-Expression bei Mischkulturen beobachtet. Bei Reinkulturen wurde keine Induktion gemessen, während es bei einer Mischkultur zu einer Induktion um den Faktor 82 kam.

**Escherichia coli**

**A) Reinkultur**

In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen des bei der Biofilm- und EPS-Synthese beteiligten *rcaA*-Gens bei adhärennten *Escherichia coli*-Reinkulturen dargestellt. Eine Untersuchung von Mischkulturen war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Wie bei dem *rpoS*-Gen von *Pseudomonas aeruginosa* war auch bei *Escherichia coli* eine Induktion des *rcaA*-Gens bei der Biofilmbildung erkennbar, dessen Faktor bei 6 lag.

Durch osmotischen Stress kam es zu einer Verstärkung der Induktion bis zu einem Faktor von 399 nach 4 Tagen Inkubation, da die Ct-Werte weiter auf 21,46 fielen. Beim Vergleich des unbehandelten Biofilms mit „gestressten“ adhärennten Bakterien (IF2) lag die Induktion bei einem Faktor von 68, da die Ct-Werte von 27,43 auf 21,46 abnahmen.

Bei Oligotrophie ließ sich eine Induktion um den Faktor 36 berechnen, die Ct-Werte sanken von 28,61 auf 24,43 am 4. Tag um einen  $\Delta$ Ct-Wert von 5,18 ab. Beim Vergleich der unbehandelten, adhärennten Bakterien mit den in Leitungswasser inkubierten Biofilmen (IF2) zeigte sich eine Induktion des *rcaA*-Gens um den Faktor 3, der sich aus der Abnahme der Ct-Werte von 25,95 auf 24,43 um 1,52 errechnen ließ.

**Tab. 3.9:** Quantitative PCR mit dem Primer/Probe- System spezifisch für das *rcaA*-Gen von *Escherichia coli*. Die Expression wurde bei planktonischen Bakterien, unbehandelten Biofilmen nach verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. IF1: IF im Vergleich zu planktonischen Bakterien. IF2: IF im Vergleich zu adhärennten Zellen. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar.

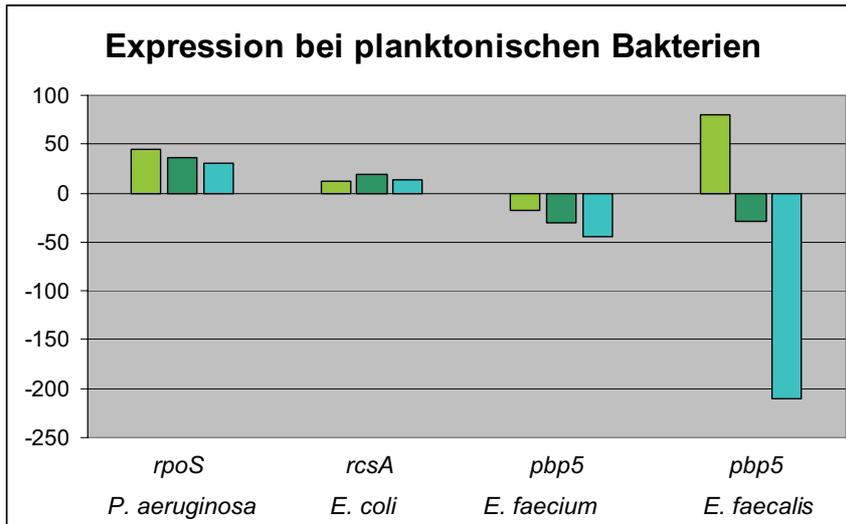
	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF1/ IF2
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Plankton. Bakterien	30,43	30,03	29,85	30,10	0,297		
Biofilm (7 Tage alt)	27,75	27,32	27,22	27,43	0,282	2,67	6,36
+ Stress für 2 Tage	23,81	23,19	22,93	23,31	0,452	6,79	110,66/17,39
+ Stress für 3 Tage	25,28	24,68	25,00	24,99	0,300	5,11	34,54/ 5,43
+ Stress für 4 Tage	21,29	21,76	21,34	21,46	0,258	8,64	398,93/68,12
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Plankton. Bakterien	28,70	28,60	28,53	28,61	0,085		
Biofilm (7 Tage alt)	26,12	25,87	25,85	25,95	0,150	2,66	6,32
+ Stress für 2 Tage	27,88	28,03	28,16	28,02	0,140	0,59	1,51/ -
+ Stress für 3 Tage	27,87	27,79	27,68	27,78	0,095	0,83	1,78/ -
+ Stress für 4 Tage	24,48	24,36	24,45	24,43	0,062	4,18	18,13/ -

Vergleicht man die Expression von *rcaA* bei planktonischen mit der adhärenter Bakterien ist der Induktionsfaktor bei osmotischem Stress um den Faktor 3,6 bei Biofilmpopulationen erhöht (planktonische *Escherichia coli*: Induktionsfaktor 19, adhärenente *Escherichia coli*: Induktionsfaktor 68). Bei Oligotrophie hingegen ist der Induktionsfaktor bei planktonischen Bakterien um den Faktor 4,3 höher als bei adhärenenten Bakterien (planktonische *Escherichia coli*: Induktionsfaktor 13, adhärenente *Escherichia coli*: Induktionsfaktor 3).

Auch bei den Untersuchungen des *rcaA*-Gens von *Escherichia coli* war die Schutzfunktion eines Biofilms bei Oligotrophie erkennbar (planktonische Bakterien: Induktionsfaktor 13 (vgl. Kapitel 3.3.1), adhärenente Bakterien: Induktionsfaktor: 3). Bei osmotischem Stress allerdings konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend sind in den Abbildung 3.14 bzw. 3.15 die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der speziesspezifischen Gensysteme bei planktonischen bzw. adhärenenten Bakterien gezeigt. Angegeben ist die Höhe der jeweiligen Induktion- oder Repressionsfaktoren.

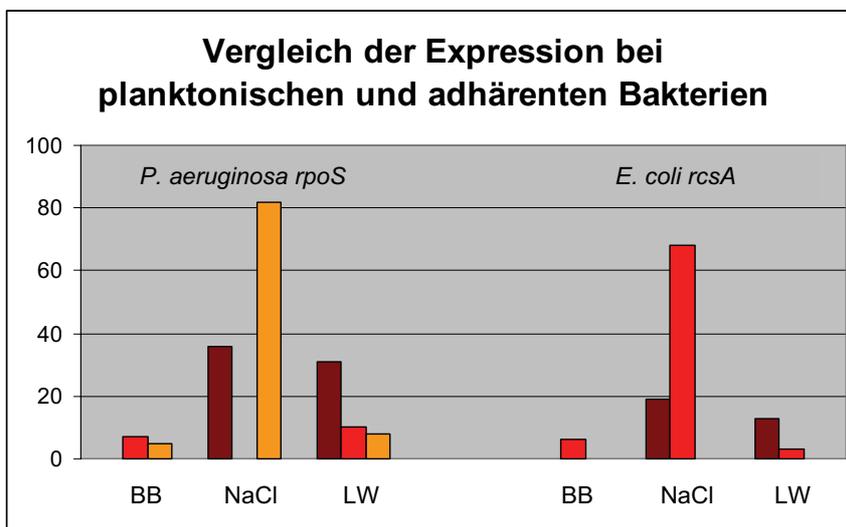
In Abbildung 3.14 ist deutlich erkennbar, dass der Sigmafaktor *rpoS* von *Pseudomonas aeruginosa*, der als Masterregulator der generellen Stressantwort gilt, bei allen Stressparametern induziert wurde. Der an der Biofilmbildung und EPS-Synthese beteiligte Faktor des Rcs-Signalwegs, *rcaA*, zeigte ebenfalls bei den verwendeten Stressfaktoren eine Induktion. Bei den Gram-positiven Bakterien wurde das *pbp5* (Penicillin-bindendes Protein)-Gen, welches bei der Peptidoglykansynthese eine Rolle spielt, bei osmotischem Stress und bei Oligotrophie reprimiert. In der stationären Phase lag bei *Enterococcus faecalis* eine Repression vor, während es bei *Enterococcus faecium* zu einer Induktion des untersuchten Gens kam.



**Abb. 3.14:** Genexpressionsanalysen bei planktonischen Bakterien während verschiedener Behandlungen und in der stationären Phase.

■ : stationäre Phase; ■ : osmotischer Stress; ■ : Oligotrophie.

Abbildung 3.15 zeigt, dass sowohl das *rpoS*-Gen als auch das *rcsA*-Gen bei der Biofilmbildung induziert wurden. Sowohl bei *Pseudomonas aeruginosa*-Reinkulturen als auch bei *Escherichia coli*-Reinkulturen war bei Oligotrophie die Schutzfunktion eines Biofilms anhand der höheren Induktionsfaktoren bei planktonischen Bakterien erkennbar.



**Abb. 3.15:** Genexpressionsanalysen bei planktonischen und adhärennten Bakterien während verschiedener Behandlungen und in der stationären Phase. BB: Biofilmbildung. NaCl: osmotischer Stress. LW: Oligotrophie.

■ : planktonische Bakterien; ■ : adhärente Bakterien (Reinkultur); ■ : adhärente Bakterien (Mischkultur).

### 3.5 Untersuchung des universellen Stressgens bei Referenzbakterien

Die Untersuchung von Genen der universellen Stressprotein (Usp)-Familie wurde bei den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sowie bei dem Gram-positiven Bakterium *Enterococcus faecalis* durchgeführt. Ziel dieser Analysen war einen allgemeinen Stressmarker zu finden, der nicht spezifisch für ein bestimmtes Bakterium ist, sondern bei unterschiedlichen Mikroorganismen zur Unterscheidung von Stresszuständen verwendet werden kann.

- Die Superfamilie der Usp-Proteine, bestehend aus einer konservierten Proteingruppe, kommt sowohl in Bakterien und Archaeen als auch in Eukaryonten vor (Kvint et al. 2003). Viele Organismen besitzen dabei ein ganzes Repertoire an Usp-Proteinen. Untersuchungen zeigten, dass das *uspA*-Gen bei *Escherichia coli* eine wichtige Rolle bei Stressexposition spielt (Gustavsson et al. 2002; Nyström und Neidhardt 1994 und 1992). Auch bei anderen Organismen, wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecalis*, sind *usp*- oder *usp*-homologe Gene beschrieben worden.

Untersuchte *usp*-homologe Gensysteme

- mögliches universelles Stressgen (PLES\_20451) bei *Pseudomonas aeruginosa*
- *uspA* bei *Escherichia coli*
- mögliche universelle Stressgene bei *Enterococcus faecalis*
  - EF1982
  - EF1058
  - EF3035
  - EF1048

Die Sequenzen der möglichen universellen Stressgene von *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecalis* als auch des *uspA*-Gens von *Escherichia coli* wurden aus der NCBI-Datenbank entnommen und anhand dieser die Primer und Sonden berechnet und erprobt (siehe Tabelle 3.10). Sämtliche Primer wurden in dieser Arbeit erstellt, mit Ausnahme der Primer für die 16S rRNA von Eubakterien und der Primer für die 23S rRNA von Enterokokken.

Die untersuchten Gene von *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecalis* wurden anhand von Homologien der Proteinsequenz identifiziert (siehe Kapitel 7), wobei die Aufgabe und Regulation der Gene *in vivo* bisher nicht geklärt werden konnte.

**Tab. 3.10:** Primersequenzen für die quantitative PCR.

Primer	Zielgen	Nukleotidsequenz (5'→ 3')	Bakterium
PauspF	<i>usp</i> (PLES_20451)	AGGCATCCAGGCGTTCAC	<i>P. aeruginosa</i>
PauspR		TGGACCTGTCGATGTTGCA	
PauspP		6-FAM-CCTGGTCGAACTGC-TAMRA	
EcuspaF	<i>uspA</i>	TGCACTGACCGAGCTTTC	<i>E. coli</i>
EcuspaR		TGCCGCTCAGGGTTTCA	
EfuspF	<i>Usp</i> (EF1982)	GAAGCAATGTCAATGGCAAAAAG	<i>E. faecalis</i>
EfuspR		GTCCCATATCCACCGCTTGT	
EfuspF1	<i>usp</i> (EF1058)	GGCAAGAACAGTTGGCGAAA	<i>E. faecalis</i>
EfuspR1		ATTCGCTAACGCTTCTTGTTGAT	
EfuspF2	<i>usp</i> (EF3035)	GACGAGCAACCTCAATTGCA	<i>E. faecalis</i>
EfuspR2		CGGCGTAGACGGTAGTGATCA	
EfuspF3	<i>usp</i> (EF1084)	AGGCAAAACAAGCGAGTGAAA	<i>E. faecalis</i>
EfuspR3		GGGCTCCCAAGCTCAACA	
EUB 338F	16S rRNA	GATCAGCCACACTGGGACTGA	für Eubakterien
EUB 338R		TCAGGCTTGCGCCCAT	
EUB 338P		6-FAM-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-TAMRA	
ECST784F	23S rRNA	AGAAATTCCAAACGAACTTG	für Enterokokken
ENC854R		CAGTGCTCTACCTCCATCATT	

### Quantitative Bestimmung der *usp*-mRNA

Für die Untersuchung der *usp*-mRNA mit Hilfe der quantitativen PCR wurde für *Pseudomonas aeruginosa* ein spezifisches Primer/Probe-System verwendet. Für *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* wurden die Untersuchungen mit spezifischen Primer-Systemen und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I durchgeführt. Für die Expressionsbestimmung der konstitutiv exprimierten Referenzgene zur Normalisierung der Expression wurde bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* das EUB338-Gen-System verwendet, bei *Enterococcus faecalis* die Primer ECST784F und ENC 854R (siehe Tabelle 3.10).

Es wurden 100-1000 ng Gesamt-RNA, je nach der zu Verfügung stehenden Menge der zuvor isolierten RNA, mit den kommerziell erhältlichen random hexamer Primern und der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die Expression mittels der quantitativen PCR ermittelt. Zur Quantifizierung der *usp*-Gene wurden bei *Pseudomonas aeruginosa* jeweils 20 ng cDNA, bei *Escherichia coli* 2 ng cDNA und bei *Enterococcus faecalis* jeweils 10 ng der cDNA eingesetzt. Für alle zu untersuchenden Gene wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Expression der *usp*-Gene wurde nach Behandlung mit einer 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) oder mit Leitungswasser (Oligotrophie) gemessen. Des Weiteren wurde die Expression in der exponentiellen mit der stationären Phase verglichen.

Angegeben sind jeweils die Ct-Werte mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), die errechneten  $\Delta$ Ct-Werte sowie die Induktions-(IF) und Repressionsfaktoren (RF). Tabelle 3.11 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen bei *Pseudomonas aeruginosa*, Tabelle 3.12 bei *Escherichia coli* und die Tabellen 3.13- 3.16 bei *Enterococcus faecalis*.

### 3.5.1 Expression eines *usp*-homologen Gens bei *Pseudomonas aeruginosa*

In Tabelle 3.11 sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen eines *usp*-homologen Gens (PLES\_20451) von *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt.

Bei osmotischem Stress wurde eine Induktion des *usp*-homologen Gens um den Faktor 55 nach 4 Tagen Inkubationsdauer festgestellt, da es zu einer Abnahme der Ct-Werte von 29,77 bei der Kontrolle auf 24,00 am 4. Behandlungstag kam. Am 5. Tag stiegen die Werte wieder auf 28,82 an.

**Tab. 3.11:** Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für ein *usp*-homologes Gen (PLES\_20451) von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	29,68	30,00	29,64	29,77	0,197		
3 Tage	25,62	25,71	25,59	25,64	0,062	4,13	17,51
4 Tage	24,12	23,98	23,91	24,00	0,107	5,77	54,57
5 Tage	28,88	28,93	28,65	28,82	0,149	0,95	1,93
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	26,92	26,77	26,85	26,85	0,075		
3 Tage	25,26	25,16	25,14	25,19	0,064	1,66	3,16
4 Tage	23,14	23,19	22,86	23,06	0,178	3,79	13,83
5 Tage	23,41	23,23	22,94	23,19	0,237	3,66	12,64
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,2	31,14	30,97	30,85	30,99	0,146		
1,3	28,79	28,53	28,70	28,67	0,132	2,32	4,99

Während der Inkubation in nährstoffarmem Leitungswasser wurde ebenfalls eine Induktion von PLES\_20451 ermittelt. Die Ct-Werte nahmen innerhalb einer Inkubationszeit von 5 Tagen von 26,85 auf 23,19 ab. Der höchste  $\Delta$ Ct-Wert lag bei 3,66, aus dem sich eine Induktion um den Faktor 13 errechnen ließ.

Bei der Entnahme der Bakterien während unterschiedlicher bakterieller Dichte kam es zu einer verstärkten Expression des untersuchten Gens. Die Ct-Werte sanken von 30,99 bei einer optischen Dichte von 0,2 (exponentielle Phase) auf 28,67 bei der Entnahme der Bakterien in der stationären Wachstumsphase (OD<sub>600</sub>: 1,3). Daraus ergab sich ein ΔCt-Wert von 2,32 und eine Induktion des untersuchten Gens in der stationären Phase bei *Pseudomonas aeruginosa* um den Faktor 5. Die Expression des *usp*-homologen Gens bei *Pseudomonas aeruginosa* war abhängig vom Zellwachstum.

### 3.5.2 Expression des *uspA*-Gens bei *Escherichia coli*

Tabelle 3.12 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen des *uspA*-Gens von *Escherichia coli*.

Bei osmotischen Änderungen lag eine Induktion des *uspA*-Gens vor, die sich aus der kontinuierlichen Abnahme der Ct-Werte von 28,54 auf 24,94 erkennen ließ.

**Tab. 3.12:** Quantitative PCR mit einem Primer-System spezifisch für das *uspA*-Gen von *Escherichia coli*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. RF: Repressionsfaktor. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	ΔCt	IF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	28,74	28,31	28,57	28,54	0,217		
3 Tage	26,96	26,47	26,46	26,63	0,286	1,91	3,76
4 Tage	26,97	26,74	26,39	26,70	0,292	1,84	3,58
5 Tage	25,05	24,92	24,84	24,94	0,106	3,60	12,13
	Ct-Werte			MW Ct	SD	ΔCt	RF
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	27,50	27,25	27,15	27,30	0,180		
3 Tage	28,82	28,56	28,37	28,58	0,226	-1,28	2,43
4 Tage	31,11	31,24	30,73	30,03	0,265	-3,73	13,27
5 Tage	28,78	28,09	28,26	28,38	0,359	-1,08	2,11
	Ct-Werte			MW Ct	SD	ΔCt	IF
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,1	28,43	28,19	28,23	28,28	0,129		
2,6	26,88	26,58	26,32	26,59	0,280	1,69	3,23

Die Induktion war am 5. Tag mit einem Faktor von 12 am höchsten. Bei Oligotrophie hingegen wurde das untersuchte Gen reprimiert. Die Ct-Werte stiegen bei der Kontrolle von 27,30 auf 30,03 nach einer Inkubation von 4 Tagen an, danach fielen die Werte wieder auf 28,38 ab. Mit Hilfe der Berechnung des  $\Delta\text{Ct}$ -Wert und der Formel  $2^{\Delta\text{Ct}}$  wurde eine Repression um den Faktor 13 am 4. Tag ermittelt. Dies steht im Gegensatz zur Expression des *rcaA*-Gens, das bei Oligotrophie eine Induktion zeigte. Bei der Messung der *uspA*-Expression bei unterschiedlichen Bakteriendichten von *Escherichia coli* nahm der Ct-Wert von 28,28 bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 auf 26,59 bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 2,6 ab. Die gemessene Induktion des *uspA*-Gens in der stationären Phase, mit einem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert von 1,69, lag bei einem Faktor von 3. Somit war die Expression des *uspA*-Gens bei *Escherichia coli*, wie bei *Pseudomonas aeruginosa*, wachstumsabhängig.

### 3.5.3 Expression *usp*-homologer Gene bei *Enterococcus faecalis*

In den Tabellen 3.13 (EF1982), 3.14 (EF1058), 3.15 (EF3035) und 3.16 (EF1084) sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen mehrerer *usp*-homologer Gene von *Enterococcus faecalis* dargestellt.

Osmotischer Stress:

Osmotische Änderungen im Medium führten bei allen untersuchten Genen zu einer Repression am 3. Behandlungstag.

Die Ct-Werte des *usp*-homologen Gens EF1982 nahmen von 17,77 auf 20,14 am 3. Behandlungstag zu, danach sanken die Werte wieder auf 20,14 ab. Es lag eine Repression von EF1982 um den Faktor 25 vor, was einem  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von 4,67 entspricht. Beim Gen EF1058 war eine Zunahme der Ct-Werte von 18,65 auf 23,61 am 3. Behandlungstag messbar, ab Tag 4 kam es zu einem Abfall der Werte auf 21,07. Der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert lag bei 4,96, aus dem sich mit  $2^{\Delta\text{Ct}}$  eine Repression um den Faktor 31 berechnen ließ. Die Untersuchungen des Gen EF3035 führten zu steigenden Ct-Werte von 21,79 auf 26,44 und einer daraus ermittelten Repression um den Faktor 25. Bei dem *usp*-homologen Gen EF1084 (siehe Tabelle 3.16) kam es zu einer Repression um den Faktor 17. Bei allen untersuchten Genen konnten vergleichbare Repressionsfaktoren ermittelt werden.

Oligotrophie:

Bei Inkubation in Leitungswasser wurde, analog zu den Ergebnissen bei osmotischem Stress, bei allen 4 *usp*-homologen Genen eine Repression nach 4 Tagen festgestellt.

Bei dem Gen EF1982 nahmen die Ct-Werte bei der Kontrolle von 19,48 auf 26,35 nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen zu. Am 5. Tag sanken die Werte auf 25,61. Es konnte eine Repression um den Faktor 117 berechnet werden. Die Ct-Werte bei Hungerstress nahmen bei dem Gen EF1058 ebenfalls bis zu einer Inkubation von 4 Tagen um einen  $\Delta$ Ct-Wert 6,86 zu und sanken am 5. Tag wieder ab. Es wurde eine Repression des untersuchten Gens um den Faktor 116 ermittelt. Die Ergebnisse der quantitativen PCR des Gens EF3035 (siehe Tabelle 3.15) lieferten einen Anstieg der Ct-Werte von 22,00 auf 29,54 nach 4 Inkubationstagen. Daraus ließ sich eine Repression um den Faktor 186 ermitteln. Tabelle 3.16 zeigt die Ergebnisse des *usp*-homologen Gens EF1084. Wie bei den anderen untersuchten *usp*-homologen Genen kam es zu einer Repression. Allerdings lagen die Werte deutlich höher als bei den zuvor untersuchten Genen. So wurde nach 4 Tagen Inkubation eine Repression um den Faktor 1201 gemessen, während die Repression der anderen Gene im gleichen Zeitraum etwa um den Faktor 10 schwächer war. Auch zu den anderen Entnahmezeitpunkten war die Repression stärker. Nach 3 Tagen wurde ein Repressionsfaktor von 605, nach 5 Tagen von 126 ermittelt. Dies entsprach einer stärkeren Repression im Vergleich zu den anderen Genen um etwa den Faktor 10 bzw. 2.

**Tab. 3.13:** Quantitative PCR mit einem Primer-System spezifisch für ein *usp*-homologes Gen (EF1982) von *Enterococcus faecalis*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	RF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	17,94	17,74	17,62	17,77	0,162		
3 Tage	22,53	22,40	22,39	22,44	0,078	-4,67	25,46
4 Tage	21,34	21,30	21,07	21,24	0,146	-3,47	11,08
5 Tage	20,28	20,16	19,98	20,14	0,151	-2,37	5,17
	Ct-Werte			MW Ct		$\Delta$ Ct	RF
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	20,57	19,26	18,62	19,48	0,994		
3 Tage	25,31	25,24	25,11	25,22	0,101	-5,74	53,45
4 Tage	26,67	26,29	26,08	26,35	0,299	-6,87	116,97
5 Tage	25,63	25,59	25,61	25,61	0,020	-6,13	70,03
	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,2	22,95	22,86	23,08	22,96	0,111		
2,5	17,64	17,59	17,54	17,59	0,050	5,37	41,36

**Tab. 3.14:** Quantitative PCR mit einem Primer-System spezifisch für ein *usp*-homologes Gen (EF1058) von *Enterococcus faecalis*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.

	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	RF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	18,68	18,58	18,69	18,65	0,061		
3 Tage	23,78	23,67	23,38	23,61	0,207	-4,96	31,12
4 Tage	22,57	22,50	22,08	22,38	0,265	-3,73	13,27
5 Tage	21,21	21,24	20,76	21,07	0,269	-2,42	5,35
	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	RF
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	22,95	22,89	22,86	22,90	0,046		
3 Tage	29,30	29,55	29,30	29,38	0,144	-6,48	89,26
4 Tage	29,68	29,77	29,82	29,76	0,071	-6,86	116,16
5 Tage	28,11	28,43	28,34	28,29	0,165	-5,39	41,93
	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,2	28,02	28,14	28,04	28,07	0,064		
2,5	22,73	22,81	22,79	22,78	0,042	5,29	39,12

Unterschiedliche Wachstumsphasen:

Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Stressparametern kam es in der stationären Wachstumsphase (OD<sub>600</sub>: 2,5) von *Enterococcus faecalis*, die durch eine begrenzte Verfügbarkeit von Nährstoffen und einer möglichen Ansammlung toxischer Stoffe gekennzeichnet sein kann, zu einer Induktion der 4 *usp*-homologen Gene.

Bei dem Gen EF1982 wurde eine Induktion um den Faktor 41 festgestellt, da die Ct-Werte von 22,96 auf 17,59 sanken. Beim Vergleich der exponentiellen und der stationären Phase bei dem Gen EF1058 fielen die Ct-Werte von 28,07 (OD<sub>600</sub>: 0,2) auf 22,78 (OD<sub>600</sub>: 2,5), daraus wurde, mit einem  $\Delta$ Ct-Wert von 5,29, eine Induktion um den Faktor 39 errechnet. Bei dem Gen EF3035 sanken die Ct-Werte ebenfalls. Es kam zu einer Abnahme um 4,37 von 25,58 auf 21,21 beim Vergleich der exponentiellen mit der stationären Wachstumsphase. Hier lag der Induktionsfaktor bei 21. Die Ct-Werte bei der Expressionsmessung des Gens EF1084 (siehe Tabelle 3.16) sanken von 37,86 auf 30,24. Dies ergab einen  $\Delta$ Ct-Wert von 7,62, aus dem sich ein Induktionsfaktor von 197 errechnen ließ, der um etwa den Faktor 6 höher war als bei den übrigen *usp*-homologen Genen.

**Tab. 3.15:** Quantitative PCR mit einem Primer-System spezifisch für ein *usp*-homologes Gen (EF3035) von *Enterococcus faecalis*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.

	Ct- Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	RF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>							
Kontrolle	22,03	21,80	21,56	21,79	0,235		
3 Tage	26,49	26,50	26,33	26,44	0,095	-4,65	25,11
4 Tage	25,26	25,23	24,95	25,15	0,171	-3,36	10,27
5 Tage	24,32	23,99	24,07	24,13	0,172	-2,34	5,06
	Ct-Werte			MW Ct		$\Delta$ Ct	RF
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>							
Kontrolle	22,14	21,94	21,93	22,00	0,118		
3 Tage	28,17	27,47	27,41	27,68	0,423	-5,68	51,27
4 Tage	29,74	29,60	29,28	29,54	0,236	-7,54	186,11
5 Tage	28,45	28,27	28,21	28,31	0,125	-6,31	79,34
	Ct-Werte			MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>							
0,2	25,68	25,58	25,49	25,58	0,095		
2,5	21,23	21,18	21,23	21,21	0,029	4,37	20,68

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es bei allen vier untersuchten *usp*-homologen Genen (EF1982, EF1058, EF3035 und EF 1084) von *Enterococcus faecalis* zu einer Repression bei osmotischem Stress sowie bei Oligotrophie kam. In der stationären Phase wurde eine Induktion der Gene ermittelt, was bedeutet, dass bei allen vier Genen die Expression wachstumsabhängig war. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es sich bei den untersuchten Genen um Faktoren handelt, deren Expression von Stress beeinflusst wird. Die gemessenen Induktionen und Repressionen waren bei allen vier Genen vergleichbar, auch wenn sie bei dem *usp*-homologen Gen EF1084 während der Inkubation in Leitungswasser und in der stationären Wachstumsphase deutlich stärker ausgeprägt waren.

**Tab. 3.16:** Quantitative PCR mit einem Primer-System spezifisch für ein *usp*-homologes Gen (EF1084) von *Enterococcus faecalis*. Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.

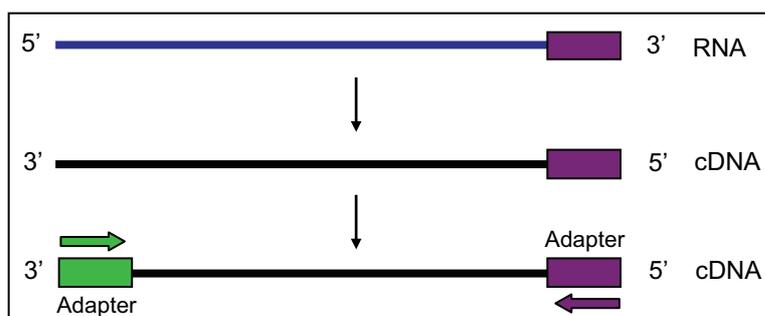
	Ct-Werte		MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	RF
<b>0,5 M NaCl-Lösung (osmotischer Stress)</b>						
Kontrolle	19,03	19,10	19,07	0,035		
3 Tage	23,16	23,20	23,18	0,020	-4,11	17,27
4 Tage	22,10	21,68	21,89	0,210	-2,82	7,06
5 Tage	21,35	21,38	21,37	0,015	-2,30	4,92
	Ct-Werte		MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	RF
<b>Leitungswasser (Oligotrophie)</b>						
Kontrolle	18,64	18,31	18,48	0,165		
3 Tage	27,62	27,82	27,72	0,100	-9,24	604,67
4 Tage	28,60	28,81	28,71	0,105	-10,23	1200,98
5 Tage	25,29	25,62	25,46	0,165	-6,98	126,24
	Ct-Werte		MW Ct	SD	$\Delta$ Ct	IF
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>						
0,2	38,05	37,66	37,86	0,195		
2,5	30,33	30,15	30,24	0,090	7,62	196,72

### 3.6 Ansatz zur Identifizierung neuer Stressmuster

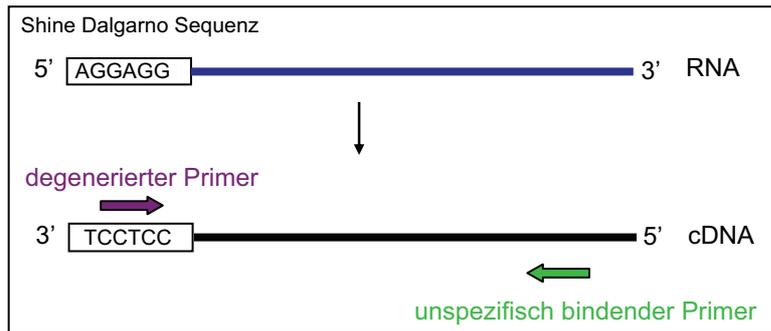
Im Folgenden wurden Versuche durchgeführt, um die Anpassungsstrategien der Bakterien an Stress auf eine unspezifische, das heißt nicht Gen-spezifische, Art und Weise zu beschreiben. Im Vorfeld wurden die Genexpressionsanalysen mit Hilfe der quantitativen PCR und Northern Blot-Verfahren durchgeführt, um Änderungen in der Expression von bestimmten, speziesspezifischen und möglichen universellen Stressgenen festzustellen. Die im folgenden beschriebenen Versuche dienen zur Analyse von Stressmustern auf DNA- und RNA-Ebene bei verschiedenen Bakterien, da sich die meisten Untersuchungen bis heute ausschließlich mit einer gezielten Stressform und ihrer Auswirkung auf eine bestimmte Bakterienspezies beschäftigen.

Dafür wurden die Bakterien wieder mit Leitungswasser (Oligotrophie) oder einer 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) behandelt, die Gesamt-RNA bzw. DNA aus 1 mL Bakteriensuspension isoliert und photometrisch quantifiziert. Die Gesamt-RNA wurde mittels den random hexamer Primern unspezifisch in cDNA umgeschrieben, diese mit Hilfe unterschiedlicher Methoden amplifiziert, gelelektrophoretisch getrennt und die entstandenen Bandenmuster analysiert. Idealerweise entspricht jede Bande genau einem amplifizierten Nukleinsäure-Molekül. Jeweils eine Bande im Polyacrylamidgel repräsentiert somit ein Gen, und dies könnte als Fingerprint-Technik eingesetzt werden. Die Schwierigkeit bei der Amplifikation von prokaryotischer RNA besteht allerdings darin, dass sie im Gegensatz zu eukaryotischer RNA kein PolyA-Ende besitzt und folglich keine Kenntnis der Sequenz vorliegt.

Aus diesem Grund wurden zum einen Adapter an die RNA und die daraus entstehende cDNA angebunden (siehe Abbildung 3.16), andererseits kamen sowohl degenerierte als auch unspezifisch bindende Primer zum Einsatz (siehe Abbildung 3.17). Diese Methoden bilden die Grundlage für eine schnelle und effektive RNA-Amplifikation und somit für Hochdurchsatz-Analysen.



**Abb. 3.16:** Amplifikation von cDNA. Verwendung externer Primer/ Adapter.



**Abb. 3.17:** Amplifikation von cDNA. Verwendung von internen Primern.

Die für die folgenden Versuche verwendeten Primer für die Amplifikation der cDNA wurden in dieser Arbeit erstellt, mit Ausnahme der random hexamer Primern.

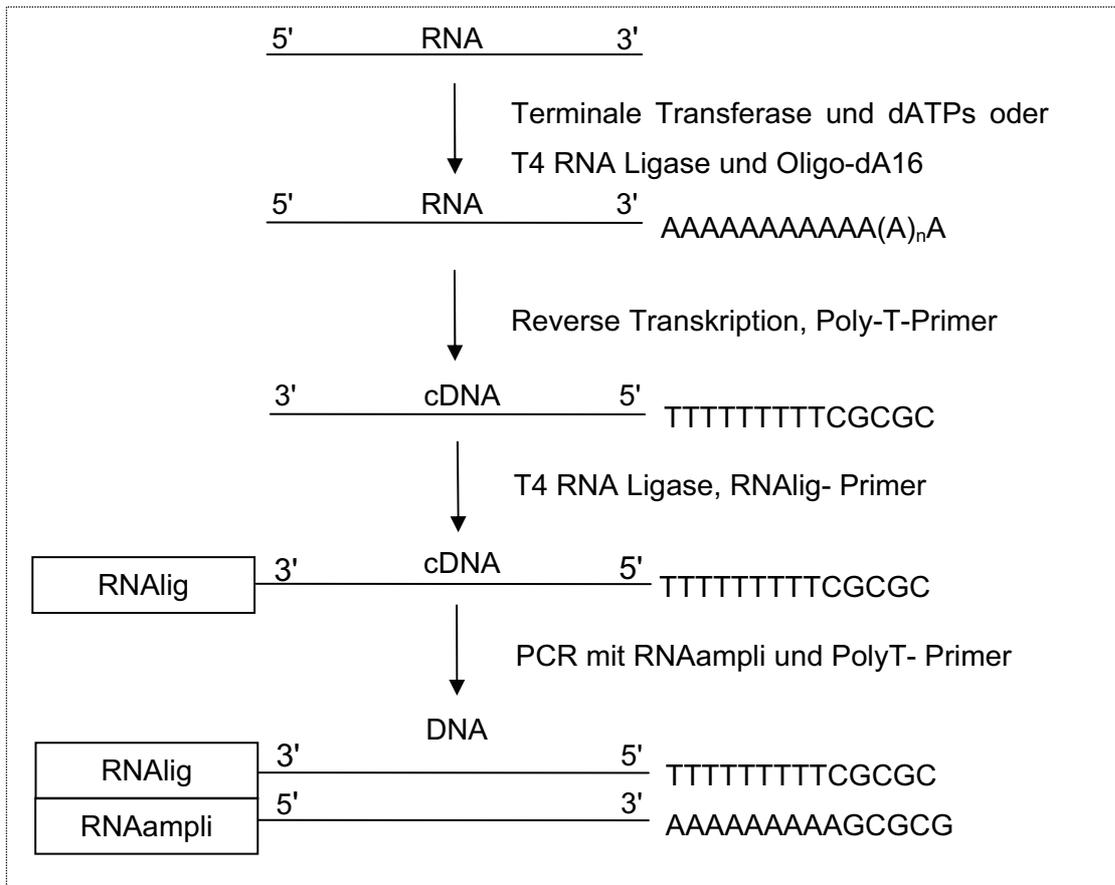
**Tab. 3.17:** Primersequenzen.

Primer	Nukleotidsequenz (5'→ 3')
RNAampli	CGCACGGAGGAGGAGAGTTGTTGTCGAT
RNAlig	ATCGACAACAACCTCTCCTCCTCCGTGCG-Propandiol
Poly-T	CGCGCTTTTTTTTTT
Oligo-dA16	AAAAAAAAAAAAAAAAAA
SDGC	CCAGGAGGCGC

### 3.6.1 Amplifikation durch Adapter

Abbildung 3.18 gibt einen schematischen Überblick über das Anbinden von Adaptern zur Amplifikation der Gesamt-cDNA.

In einem ersten Syntheseschritt wurde an das 3'-Ende der RNA mittels der Enzyme Terminale Transferase oder der T4 RNA Ligase eine Poly(A)-Sequenz angehängt und anschließend die RNA mit einem PolyT-Primer in cDNA umgeschrieben. Danach wurde an das 3'-Ende der cDNA durch das Enzym T4 RNA Ligase ein Primer (RNAlig) angebunden, der am 5'-Ende ein Phosphatrest und am 3'-Ende ein Propandiol trägt, welches dafür verantwortlich war, dass an dieses Ende kein weiterer Primer binden konnte. Mit Hilfe der jeweils komplementären Primer (RNAampli und PolyT) (siehe Tabelle 3.17) konnte die cDNA amplifiziert und elektrophoretisch aufgetrennt werden.



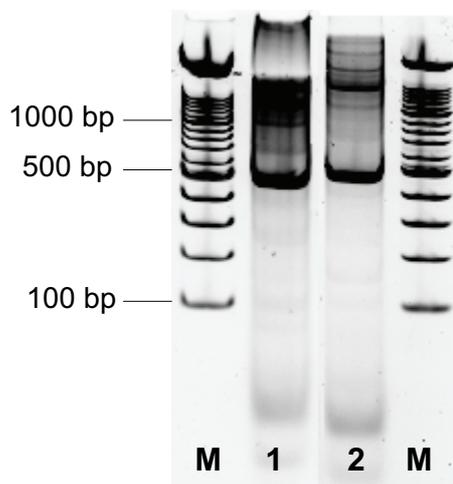
**Abb. 3.18:** Schematische Darstellung der unspezifischen Amplifikation.

In Abbildung 3.19 sind die Ergebnisse der Amplifikation dargestellt, bei der als Referenznukleinsäure 2000 ng Gesamt-RNA von *Pseudomonas aeruginosa* verwendet wurde, um die Möglichkeit der Amplifikation zu überprüfen. Es konnten nur Amplifikate aus dem Transkriptom entstehen, wenn einerseits die Polyadenylierung der RNA erfolgreich verlaufen war, da der verwendete Primer für die reverse Transkription nur dann binden konnte. Gleichzeitig musste das Oligonukleotid (RNAlig) mittels der T4 RNA Ligase an die cDNA angehängt worden sein, da sonst keine komplementären Sequenzen für den Vorwärts-Primer RNAampli vorliegen. Die amplifizierten cDNA-Moleküle in Spur 1 und 2 lieferten die Bestätigung der erfolgreichen 3'Modifikation mit der T4 RNA Ligase und dem aktivierten Primer (RNAlig) sowie der Polyadenylierung. In Spur 1 wurde das PCR-Produkt aufgetragen, bei dem das Enzym Terminale Transferase und dATPs für die Modifikation der RNA verwendet wurden.

Bei dem PCR-Produkt der Spur 2 kam die T4 RNA Ligase und das Oligo-dA16-Nukleotid zum Einsatz. Dieses PCR-Produkt besaß im Gegensatz zum ersten Ansatz mit der Terminalen Transferase eine definierte Länge. Durch den direkten Vergleich beider PCR-Produkte ließen sich Unterschiede feststellen. Das Bandenmuster nach zweimaliger T4 RNA

Ligation war distinkter und dadurch besser erkennbar. Die Banden in Spur 1 hingegen waren verschwommener und oberhalb von 1000 bp war kaum eine einzelne distinkte Bande zu erkennen, da hier viele Banden zu einem einzigen starken Signal verschmolzen. Einzelne Banden ließen sich nur in Spur 2 erkennen, da jedes Genprodukt einer bestimmten Länge nur gleich lange, flankierte DNAs lieferte und so nur eine Bande erzeugte.

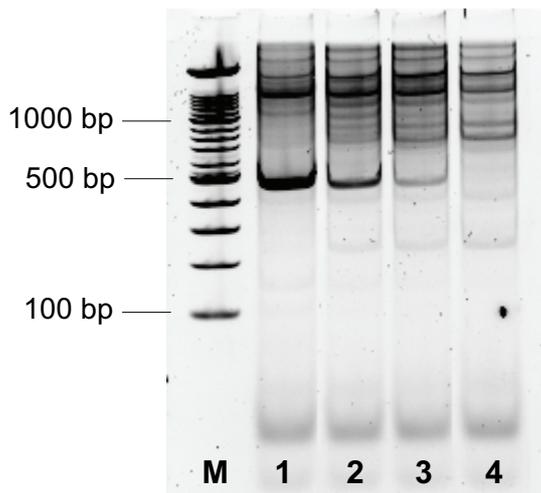
Somit lieferte diese Verfahrensweise ein eindeutigeres und klarer interpretierbares Ergebnis. Der Vorteil in der Verwendung des Enzyms T4 RNA Ligase lag in der Tatsache, dass ein definiertes Oligonukleotid und nicht nur einzelne Nukleotide angehängt werden konnten, so dass die Länge des Poly(A)-Endes bekannt war. Andererseits war dies die kostspieligere und zeitaufwändigere Alternative, von mindestens 2 Tagen Dauer, während ein Versuch mit der Terminalen Transferase innerhalb weniger Stunden abgeschlossen war.



**Abb. 3.19:** Elektrophoretische Auftrennung der modifizierten und amplifizierten Nukleinsäuren von *Pseudomonas aeruginosa*. M: 100 bp-Marker, 1: PCR-Produkt nach 3' Modifikation durch Terminale Transferase/ T4 RNA Ligase, 2: PCR-Produkt nach zweimaliger T4 RNA Ligation.

Aus diesem Grund wurde mit dem Enzym T4 RNA Ligase und einem Oligonukleotid (Oligo-dA16) für die Modifikation der RNA weitergearbeitet. Für den folgenden Versuch wurde das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* für einen Zeitraum von 5 Tagen osmotischem Stress ausgesetzt und für die anschließende Modifikation 2000 ng RNA verwendet. Danach wurde eine PCR mit den Primern RNAampli und PolyT durchgeführt und anschließend mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Es war deutlich erkennbar, dass die Intensität der Bande bei 500 bp mit zunehmender Inkubationszeit in einer Salzlösung abnahm, während mehrere Banden zwischen 700 bp und 1500 bp nach einer Stressbehandlung erst auftraten.



**Abb. 3.20:** Elektrophoretische Auftrennung der modifizierten und amplifizierten Nukleinsäuren von *Pseudomonas aeruginosa* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

Diese Methode scheint sich für die Amplifikation unbekannter Nukleinsäuresequenzen und zur Transkriptomanalyse zu eignen. Dabei besteht der Vorteil bei dieser Modifikation in der Möglichkeit, Restriktionsschnittstellen in die Adapter einzubauen, was die Grundlage für Klonierungen bildet.

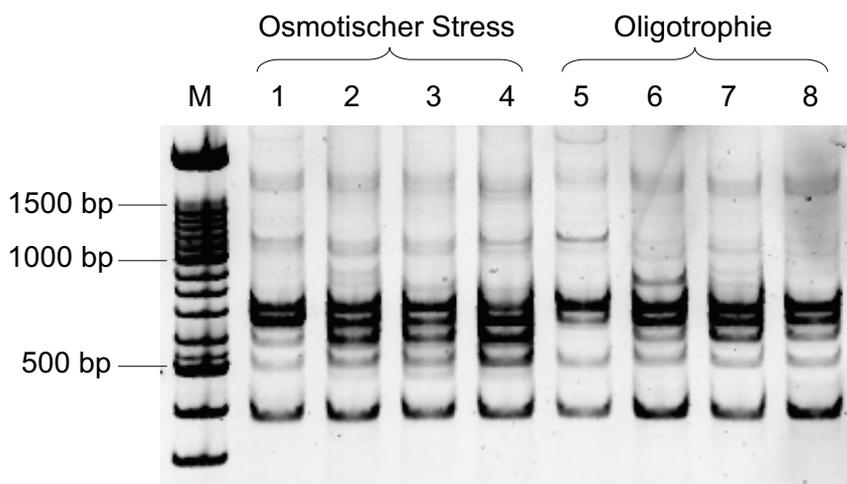
Allerdings waren die Unterschiede zwischen den „gestressten“ und den Kontrollbakterien nicht stark vorhanden, so dass eine weitere Möglichkeit für die Unterscheidung verschiedener Stresszustände bei Bakterien zur Anwendung kam.

### 3.6.2 Amplifikation durch degenerierte und unspezifisch bindende Primer

Für die Amplifikation der Gesamt-cDNA durch degenerierte und unspezifisch bindende Primer wurden 20 ng der cDNA eingesetzt. In diesem Ansatz wurde ein degenerierter Primer als Vorwärtsprimer verwendet, der die Sequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz aufweist (siehe Tabelle 3.17). Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist eine purinreiche Region, die sich sieben bis neun Nukleotide upstream des AUG-Kodons am 5'-Ende der bakteriellen mRNA befindet. Sie wird als Teil der ribosomalen Bindestelle von der 30S Untereinheit des Ribosoms erkannt und markiert damit den Startpunkt der Translation. Ihre Konsensussequenz, also konservierte Sequenz, lautet AGGAGG. Im Jahr 1974 entdeckten J. Shine und L. Dalgarno die Basenpaarung zwischen mRNA und 16S rRNA (Shine und Dalgarno 1974). Durch die gleiche Sequenz des Primers mit der Shine-Dalgarno-Sequenz, ist dieser in der Lage an alle cDNAs zu binden. Als Rückwärtsprimer wurden die kommerziell

erhältlichen random hexamer Primer verwendet. Diese wurden auch für die reverse Transkription benutzt und sind kurze, unspezifisch bindende Oligonukleotide. Anschließend wurde die amplifizierte cDNA mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

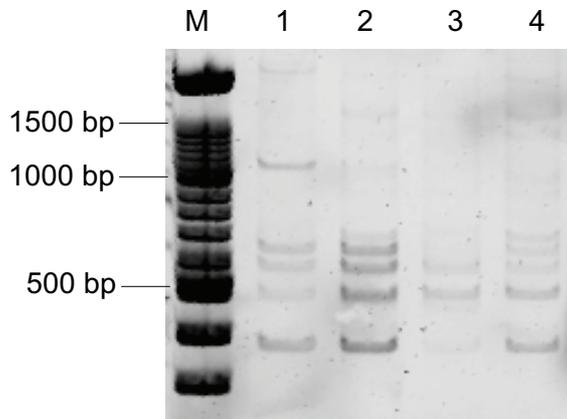
Abbildung 3.21 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für *Enterococcus faecium*. Sowohl bei osmotischem Stress als auch bei Oligotrophie ist ein homogenes Bandenmuster erkennbar, wenn auch die Banden bei 500 bp und 600 bp sich leicht in ihrer Intensität verändern. Da jeweils eine Bande im Polyacrylamidgel ein DNA-Fragment darstellen sollte und jedes Gen eine einzige Bande repräsentiert, wurden bei der großen Anzahl einzelner Gene mehr Banden als sichtbar erwartet. Diese Methode scheint sich daher mehr zur Selektion als zur Identifizierung neuer stressregulierter Gene zu eignen und ist für die angestrebten Untersuchungen nicht optimal.



**Abb. 3.21:** Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten cDNA von *Enterococcus faecium* während osmotischem Stress oder Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1/ 5: Kontrolle, 2/ 6: nach 3 Tagen, 3/ 7: nach 4 Tagen, 4/ 8: nach 5 Tagen Inkubation.

Für diese Arbeit wurden die sich in der Intensität unterscheidenden Banden dennoch sequenziert. Die Sequenzierung der Banden bei 500 bp und 600 bp bei osmotischem Stress und der Bande bei 500 bp bei Oligotrophie ergab, dass es sich hierbei um die 23S ribosomale RNA (rRNA) handelt. Dies liegt möglicherweise in der Tatsache begründet, dass 80% der Gesamt-RNA rRNA-Moleküle sind. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im Vorfeld von der Gesamt-RNA mit Hilfe der Capture-Hybridisierungsaufreinigung nach Pang die ribosomale RNA entfernt. Die so erhaltene mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und 20 ng dieser cDNA erneut mit den oben genannten Primern amplifiziert und elektrophoretisch

aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 exemplarisch für *Enterococcus faecium* bei osmotischem Stress dargestellt.



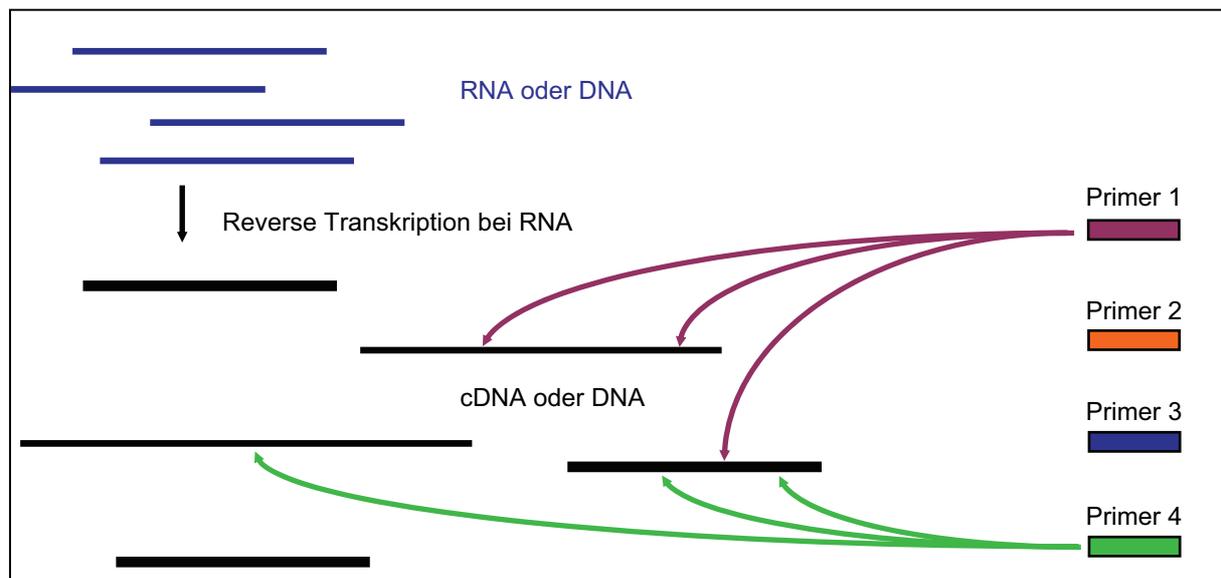
**Abb. 3.22:** Elektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten und amplifizierten cDNA von *Enterococcus faecium* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

Es ist erkennbar, dass die Banden generell im Vergleich zu Abbildung 3.21 schwächer ausgeprägt waren. Das Muster unterschied sich allerdings nicht wesentlich. Auch hier wurden beispielhaft Banden sequenziert, um die Reinheit der amplifizierten cDNA zu überprüfen. Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei ebenfalls um ribosomale RNA handelte, was für eine unvollständige Aufreinigung spricht.

Ribosomale RNA dient nicht wie die mRNA als ein zur Translation bestimmtes Transkript exprimierter Gensequenzen. Somit eignet sich diese Methode nicht zur Identifizierung möglicher neuer stressregulierter Gene, obwohl eigentlich nur eine Amplifikation der mRNA durch die Verwendung des Shine-Dalgarno-Primers erwartet wurde. Zusätzlich waren bei dieser Art der Amplifikation die Unterschiede der Bandenmuster bei Stress kaum sichtbar.

### 3.7 Muster klonaler Stressresistenz

Eine zusätzliche Option der unspezifischen Amplifikation von DNA und anschließender elektrophoretischer Auftrennung zur Identifikation von Mustern stellt die RAPD-PCR dar. Dabei werden mit Primern, von denen lediglich die Sequenz, nicht deren Bindeort auf der DNA bekannt ist, Fragmente unterschiedlicher Größe und Zahl vervielfältigt. Diese Form der Polymerase-Ketten-Reaktion wird meist zur molekularen Unterscheidung verschiedener Stämme eines bestimmten Bakteriums verwendet (Krüger et al. 2006; Werner et al. 2003), allerdings gibt es auch Untersuchungen von *Escherichia coli* bei Stressexposition (Tamanai-Shacoori 2006). Entgegen der üblichen Verwendung von DNA wurde hier zusätzlich cDNA als Template benutzt, um mögliche Unterschiede durch Stress auf der Ebene der veränderten Genexpression nachweisen zu können und damit Transkriptomanalysen zu betreiben. Dazu wurden 4 verschieden kurze, unspezifisch bindende Primer, die aus der Literatur entnommen wurden, verwendet (siehe Tabelle 2.3), wobei für jede Amplifikation nur ein Primer genutzt wurde (siehe Abbildung 3.23).



**Abb. 3.23:** Schema der RAPD-PCR.

Für die RAPD-PCR wurden die Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sowie die Gram-positiven *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* näher untersucht. Dazu wurden sie mit den schon beschriebenen Stressparametern für 5 Tage behandelt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Parallel wurde

aus 1 mL Bakteriensuspension die DNA isoliert und jeweils 40 ng der cDNA oder DNA als Template verwendet. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch ein 1,2%iges Agarosegel.

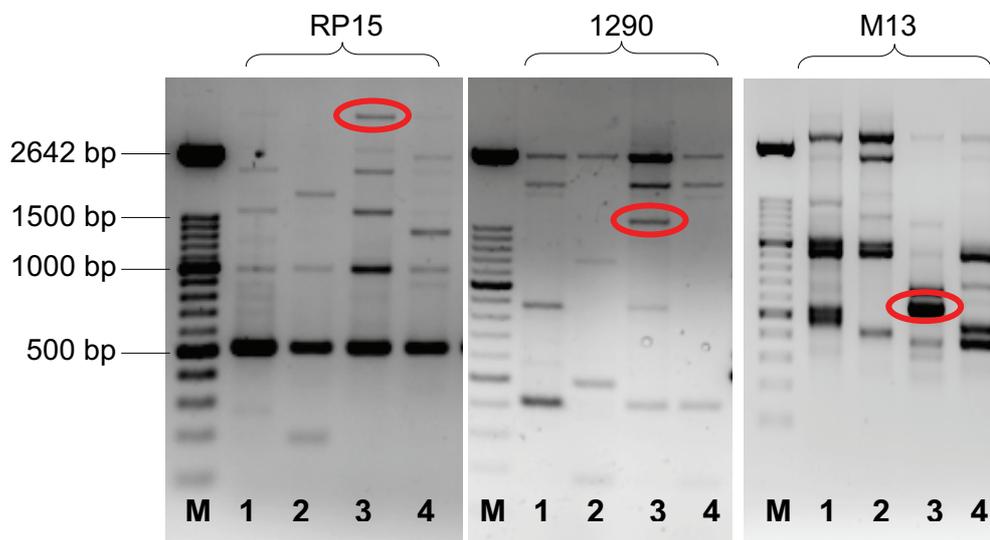
### A) RAPD-PCR nach reverser Transkription der RNA

#### *Enterococcus faecium*

Die RAPD-PCR bei Oligotrophie ergab bei *Enterococcus faecium* die in Abbildung 3.24 dargestellten Bandenmuster.

Der Einsatz von Primer RP15 führte zu einem sich unterscheidendem Bandenmuster im Vergleich zur Kontrolle bei einer Behandlungsdauer von 4 Tagen durch eine zusätzliche Bande im hochmolekularen Bereich. Bei der Verwendung des Primers 1290 war ebenfalls ein Stressmuster erkennbar. Hier trat eine zusätzliche Bande bei 1600 bp nach einer Inkubationsdauer von 4 Tagen auf. Auch die Amplifikation mit dem Primer M13 führte zu einem veränderten Bandenmuster bei der Inkubation der Bakterien in nährstoffarmem Leitungswasser, vor allem durch eine Bande bei 550 bp, die bei der Kontrolle nicht auftrat.

Osmotischer Stress hingegen führte bei *Enterococcus faecium* bei allen verwendeten Primern zu keinem erkennbaren oder reproduzierbaren Bandenmuster, das sich bei Stressexposition unterschied.

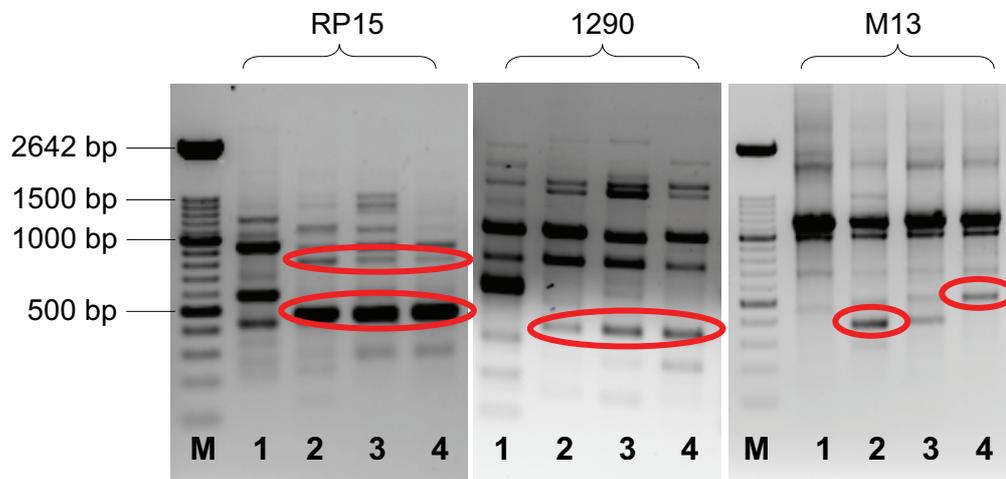


**Abb. 3.24:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von *Enterococcus faecium* während Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

***Enterococcus faecalis***

Abbildung 3.25 zeigt die Ergebnisse von *Enterococcus faecalis* bei osmotischem Stress.

Bei der Amplifikation mit dem Primer RP15 zeigte sich ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster bei der Behandlung mit einer 0,5 M Salzlösung. Es ergaben sich zusätzliche Banden bei 500 bp und bei 800 bp während aller Inkubationszeiträume. Bei der Verwendung des Primers 1290 wurden ebenfalls mehr Banden bei Stress detektiert, die sich bei 400 bp befanden. Auch bei der RAPD-PCR mit dem Primer M13 traten bei Erhöhung der Salzkonzentration Banden auf, die bei der Kontrolle nicht vorhanden waren. Eine Bande wurde nach 3 Inkubationstagen bei 400 bp detektiert, die zweite befand sich bei 550 bp und war erstmals nach 5 Tagen osmotischem Stress mit dieser Intensität sichtbar.



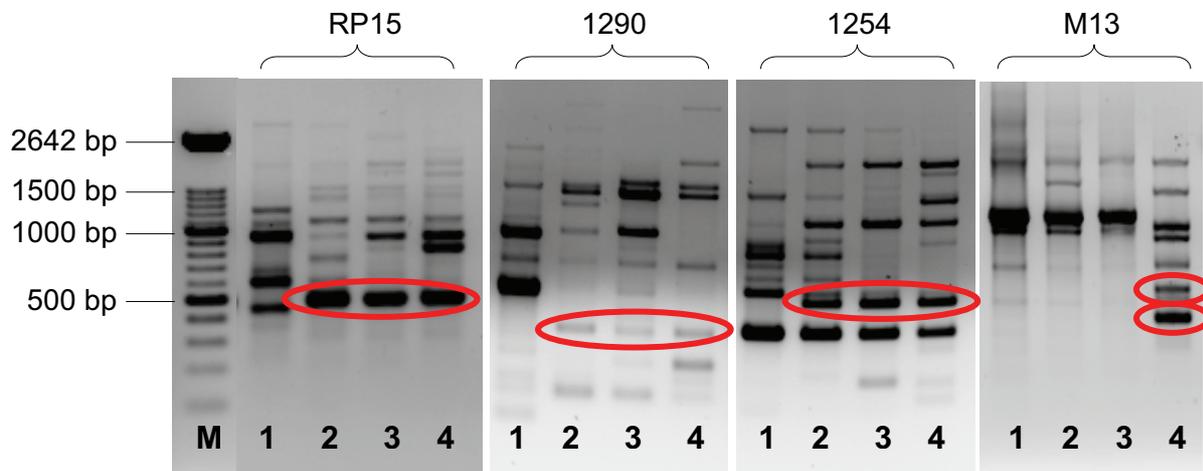
**Abb. 3.25:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von *Enterococcus faecalis* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

Neben osmotischem Stress wurden die Bakterien auch Oligotrophie ausgesetzt. Die Ergebnisse hiervon sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

Bei allen vier verwendeten Primern war ein deutliches Muster durch vermehrte Banden bei Stressexposition feststellbar. Bei dem Primer RP15 lagen diese Banden bei 500 bp, bei dem Primer 1290 bei 350 bp, bei dem Primer 1254 wurden die Banden bei 450 bp detektiert und bei dem Primer M13 bei 550 bp sowie bei 350 bp.

Die in dieser Arbeit untersuchten Enterokokken zeigten signifikante Unterschiede im Bandenmuster durch die verwendeten Stressparameter. Bei *Enterococcus faecalis* wurden sowohl bei osmotischem Stress als auch bei Oligotrophie zusätzliche Banden detektiert, während es bei *Enterococcus faecium* lediglich bei Nährstofflimitierung zu Stressmustern

kam. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *Enterococcus faecium* stärker an osmotischen Stress adaptiert ist und daher bei einer erhöhten Salzkonzentration keine Stressantwort nötig war.

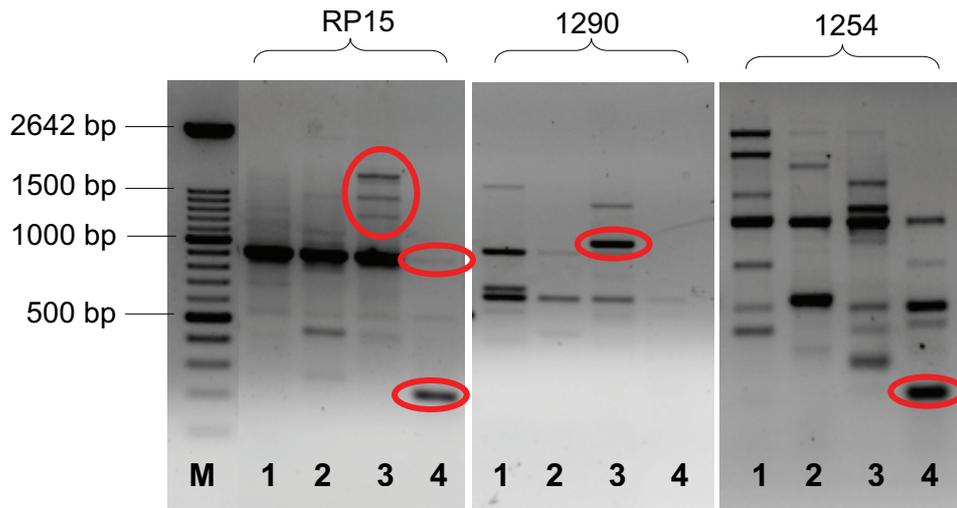


**Abb. 3.26:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von *Enterococcus faecalis* während Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Abbildung 3.27 zeigt die Ergebnisse bei osmotischem Stress von *Pseudomonas aeruginosa*. Bei der Verwendung des Primers RP15 wurde eine zusätzliche distinkte Bande bei 200 bp nach einer Behandlungsdauer von 5 Tagen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Eine weitere Bande bei 900 bp war nach diesem Inkubationszeitraum im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Inkubationszeiten nur noch sehr schwach nachweisbar. Des Weiteren waren nach einer Dauer von 4 Tagen vier Banden im Bereich von 1700 bp bis etwa 2000 bp stärker ausgeprägt. Bei der Verwendung des Primers 1290 wurde nach einer Dauer von 4 Tagen eine distinkte Bande bei 950 bp detektiert, die bei der Kontrolle nicht sichtbar war. Der Primer 1254 lieferte, wie der Primer RP15, eine distinkte Bande bei 200 bp nach einer Behandlung von 5 Tagen. Die übrigen sich in Größe oder Intensität unterscheidenden Banden konnten bei zusätzlichen Versuchen nicht reproduziert werden.

Bei den mittels Leitungswasser gestressten Bakterien wurde bei allen verwendeten Primern kein reproduzierbares Bandenmuster festgestellt.

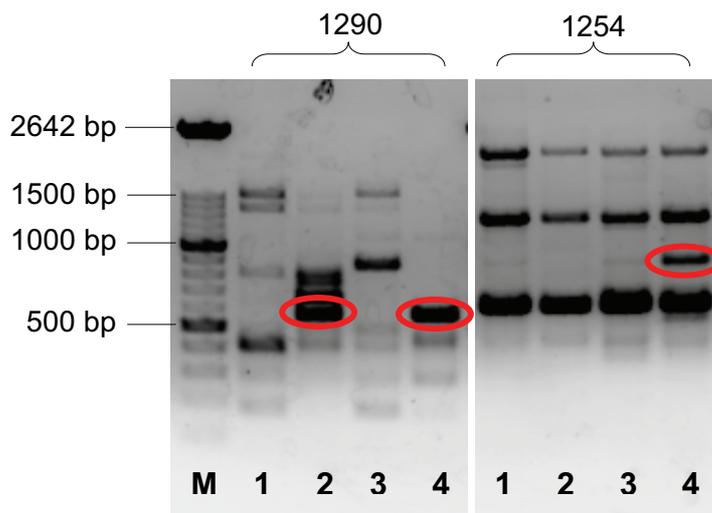


**Abb. 3.27:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von *Pseudomonas aeruginosa* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

### *Escherichia coli*

In Abbildung 3.28 sind die Ergebnisse bei osmotischem Stress des zweiten Vertreters der Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* dargestellt.

Die Verwendung des Primers 1290 führte zu einer zusätzlichen distinkten Bande bei 550 bp im Vergleich zur Kontrolle nach 3 und nach 5 Tagen Inkubation.



**Abb. 3.28:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von *Escherichia coli* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

Die Bande bei 650 bp nach 3 Tagen Behandlungsdauer, die bei der Kontrolle nicht vorhanden war, konnte bei weiteren Versuchen allerdings nicht mehr detektiert werden. Bei der Amplifikation mit Hilfe des Primers 1254 war eine weitere Bande bei 850 bp nach 5 Tagen Inkubation zu sehen, während bei der Kontrolle diese Bande nicht auftrat. Wie bei *Pseudomonas aeruginosa* lieferte Oligotrophie bei allen getesteten Primern kein von der Kontrolle abweichendes oder reproduzierbares Bandenmuster.

Insgesamt konnten je nach Primerwahl bei beiden Gram-negativen Bakterien deutliche Veränderungen im Bandenmuster bei osmotischem Stress gezeigt werden, während Hungerstress keine Stressantwort hervorrief. Dies könnte bedeuten, dass beide untersuchten Bakterien an Nährstofflimitierung gut angepasst sind.

Zusammenfassend scheint die RAPD-PCR mit der Verwendung von cDNA als Template eine sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien universell einsetzbare Methode zur Transkriptomanalyse bei Stressexposition zu sein und somit die Möglichkeit der Unterscheidung physiologischer Stadien als Antwort auf Stress zu bieten.

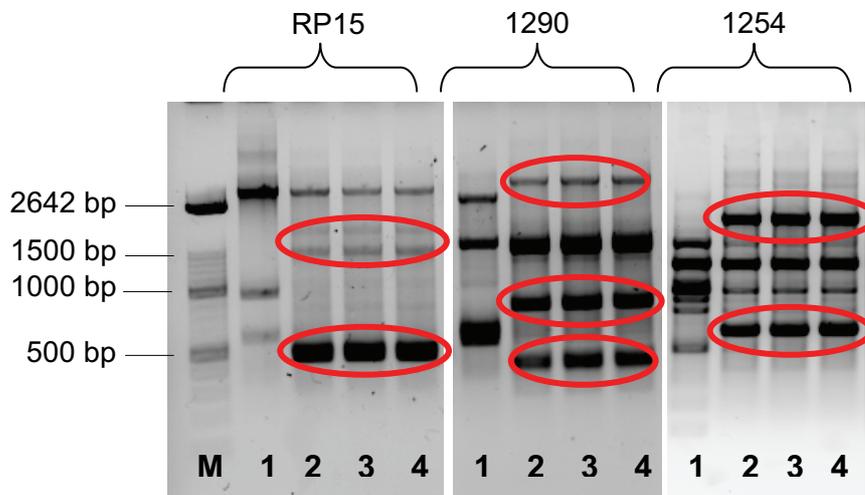
## **B) RAPD-PCR mit genomischer DNA**

Die Ergebnisse der RAPD-PCR mit cDNA bei Gram-positiven Bakterien zeigten, dass *Enterococcus faecalis* deutliche Unterschiede bei Stressexposition sowohl bei osmotischen Veränderungen als auch bei Oligotrophie aufwies, während bei *Enterococcus faecium* nur bei Hungerstress verschiedene Bandenmuster detektiert wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *Enterococcus faecalis* osmosensitiver ist. Es wurden daher zusätzlich RAPD-PCR-Versuche mit DNA durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch auf dieser Ebene Unterschiede zwischen diesen nahe verwandten Bakterien in der Form der Stressantwort nachzuweisen sind.

### ***Enterococcus faecalis***

In Abbildung 3.29 sind die Ergebnisse der Untersuchungen bei erhöhter Salzkonzentration gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es bei allen 3 verwendeten Primern zu einem veränderten Bandenmuster bei osmotischem Stress kam. Bei dem Primer RP15 traten zusätzliche Banden bei 500 bp, 1500 bp und etwa 2000 bp auf. Bei der Amplifikation mit dem Primer 1290 lagen sie bei 450 bp, 850 bp sowie im hochmolekularen Bereich und bei Primer

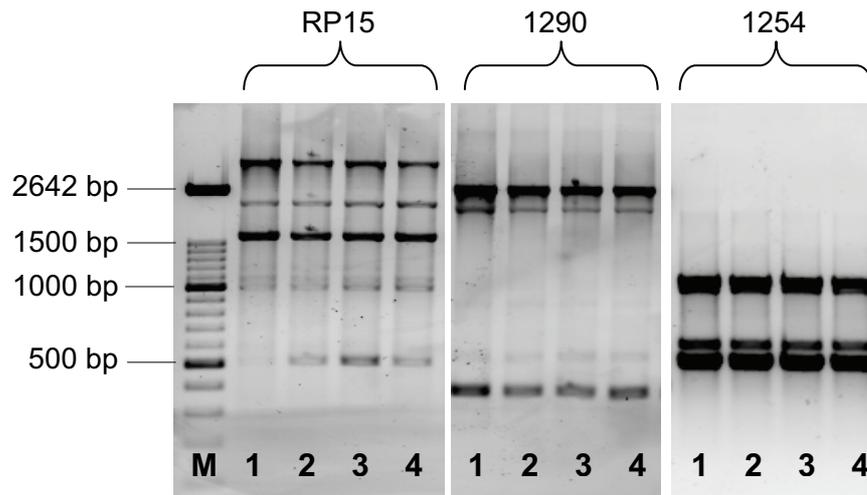
1254 bei 650 bp und 2300 bp. Oligotrophie hingegen führt zu keiner Veränderung bei den festgestellten Banden.



**Abb. 3.29:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten DNA von *Enterococcus faecalis* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

### ***Enterococcus faecium***

Abbildung 3.30 zeigt die Bandenmuster der RAPD-PCR bei osmotischem Stress. Im Gegensatz zu *Enterococcus faecalis* waren hier bei allen drei verwendeten Primern keine Unterschiede durch Stress erkennbar, was ein weiterer Hinweis auf eine verstärkte Adaptation an osmotischen Stress von *Enterococcus faecium* ist, da diese Bakterien durch den verwendeten Stressparameter keine Stressantwort zeigten. Auch bei der Inkubation in nährstoffarmem Leitungswasser kam es zu keinen veränderten Banden.



**Abb. 3.30:** Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten DNA von *Enterococcus faecium* während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation.

### 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse noch einmal zusammengefasst wiedergegeben.

#### Physiologie ausgewählter Referenzbakterien bei Stressexposition

Bei den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* wurden keine Veränderungen im Bezug auf die Gesamt-RNA-Menge und die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bei Stressexposition festgestellt. Bei den Gram-positiven Bakterien *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* konnte eine Zunahme der Gesamt-RNA-Menge bei gleichzeitiger Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten gezeigt werden, wobei bei *Enterococcus faecalis* die KBE-Untersuchungen nicht mit den Messungen des DNA-Gehalts lebender Bakterien übereinstimmten. Dies war ein Hinweis auf ein mögliches viable but nonculturable (VBNC)-Stadium und auf eine verstärkte Stressantwort von *Enterococcus faecalis*.

	Gesamt-RNA-Gehalt		KBE		DNA lebender Zellen	
		Faktor		log-Stufen		log-Stufen
<b>osmotischer Stress</b>						
<i>P. aeruginosa</i>	gleich	-	gleich	-	n.b.	-
<i>E. coli</i>	Abnahme	10	Abnahme	1	n.b.	-
<i>E. faecium</i>	Zunahme	3	Abnahme	1-2	Abnahme	1-2
<i>E. faecalis</i>	gleich	-	Abnahme	2	Abnahme	1
<b>Oligotrophie</b>						
<i>P. aeruginosa</i>	gleich	-	gleich	-	n.b.	-
<i>E. coli</i>	gleich	-	gleich	-	n.b.	-
<i>E. faecium</i>	Zunahme	4	Abnahme	3	Abnahme	3
<i>E. faecalis</i>	Zunahme	2,5	Abnahme	2	Abnahme	1

### Genexpression ausgewählter Referenzbakterien bei Stressexposition

Die Untersuchungen mittels quantitativer PCR ergaben eindeutige Induktionen bzw. Repressionen zentraler, speziesspezifischer Regulatoren bei hygienisch relevanten Bakterien unter verschiedenen Stressbedingungen und führten zu der Erkenntnis, dass das *rcaA*-Gen von *Escherichia coli* als ein neuer Stressmarker betrachtet werden kann. Diese Ergebnisse wurden durch Northern Blot-Analysen bestätigt.

	osmotischer Stress		Oligotrophie		stationäre Phase	
		um Faktor		um Faktor		um Faktor
<i>rpoS</i> <i>P. aeruginosa</i>	Induktion	36	Induktion	31	Induktion	45
<i>rcaA</i> <i>E. coli</i>	Induktion	19	Induktion	13	Induktion	12
<i>pbp5</i> <i>E. faecium</i>	Repression	30	Repression	44	Repression	18
<i>pbp5</i> <i>E. faecalis</i>	Repression	29	Repression	211	Induktion	80

Die Genexpressionsanalysen des an der generellen Stressantwort beteiligten, universellen Stressgens *uspA* und dessen homologe Genstrukturen zeigten zumeist ähnliche Expressionsmuster wie die speziesspezifischen Gene und kann als weitgehend universeller Stressmarker diskutiert werden.

	osmotischer Stress		Oligotrophie		stationäre Phase	
	<i>usp</i>		<i>usp</i>		<i>usp</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	Induktion	✓ <i>rpoS</i>	Induktion	✓ <i>rpoS</i>	Induktion	✓ <i>rpoS</i>
<i>E. coli</i>	Induktion	✓ <i>rcaA</i>	Repression	<del>✓</del> <i>rcaA</i>	Induktion	✓ <i>rcaA</i>
<i>E. faecalis</i>	Repression	✓ <i>pbp5</i>	Repression	✓ <i>pbp5</i>	Induktion	✓ <i>pbp5</i>

Die Untersuchungen adhärenter Reinkulturen unter Stress ergaben unterschiedliche Induktionen der Gene im Vergleich zu den planktonischen Bakterien. Bei *Pseudomonas aeruginosa* war die Induktion von *rpoS* bei adhärenenten Bakterien deutlich geringer, bei *Escherichia coli* war dieser Effekt nur bei Oligotrophie feststellbar. Diese Feststellung spricht für eine Schutzfunktion eines Biofilms für die Bakterien gegenüber Stress.

Bei der Biofilmbildung selbst ohne zusätzliche Stressparameter konnte eine Induktion von *rcaA* und *rpoS* gezeigt werden.

Bei adhärennten Mischkulturen wurde bei *Pseudomonas aeruginosa* eine vergleichbare Induktion bei der Biofilmbildung und Oligotrophie mit der Reinkultur festgestellt, während es bei osmotischem Stress zu einer deutlich erhöhten Induktion von *rpoS* bei Mischkulturen kam. Die Untersuchung adhärenter Mischkulturen bei *Escherichia coli* war im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr möglich.

	Biofilmbildung		osmotischer Stress		Oligotrophie	
		um Faktor		um Faktor		um Faktor
<b><i>P. aeruginosa</i></b>						
<b>Reinkultur</b>	Induktion	7	Induktion	-	Induktion	10
<b>Mischkultur</b>	Induktion	5	Induktion	82	Induktion	8
<hr/>						
<b><i>E. coli</i></b>						
<b>Reinkultur</b>	Induktion	6	Induktion	68	Induktion	-

### Stressmuster ausgewählter Bakterien

Die Versuche mit Hilfe der RAPD-PCR zeigten deutliche Unterschiede der Bandenmuster bei Stressexposition. Bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* konnten Veränderungen bei osmotischem Stress gezeigt werden. Bei *Enterococcus faecalis* führten beide Stressparameter zu Unterschieden, bei dem nahe verwandten Bakterium *Enterococcus faecium* nur Oligotrophie. Dieser weitere Hinweis auf eine verstärkte Stressadaptation und damit erhöhte Fitness von *Enterococcus faecium* konnte auch durch die Verwendung von DNA als Template bestätigt werden. Die je nach Primerwahl veränderten Bandenmuster bei Stress sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien sprechen für eine universelle Einsatzmöglichkeit dieser Methode.

A) mit cDNA als Template für Stressmuster

√: unterschiedliche Bandenmuster, -: kein unterschiedliches Bandenmuster

	osmotischer Stress				Oligotrophie			
	abweichendes Bandenmuster durch							
	RP15	1290	1254	M13	RP15	1290	1254	M13
<i>P. aeruginosa</i>	√	√	√	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	√	√	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	√	√	-	√
<i>E. faecalis</i>	√	√	-	√	√	√	√	√

B) mit DNA als Template für Stressmuster

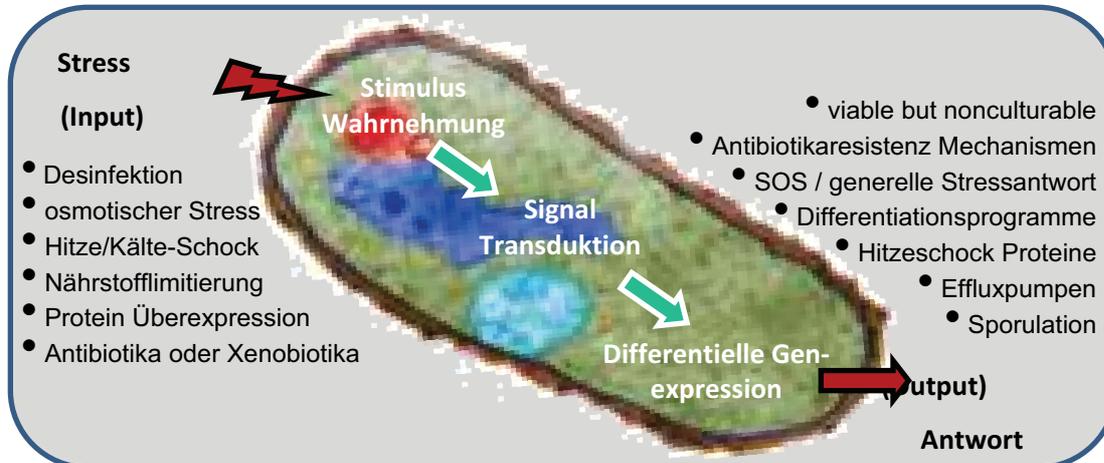
√: unterschiedliche Bandenmuster, -: kein unterschiedliches Bandenmuster

	osmotischer Stress				Oligotrophie			
	abweichendes Bandenmuster durch							
	RP15	1290	1254	M13	RP15	1290	1254	M13
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	√	√	√	-	-	-	-	-

## 4 Diskussion

### 4.1 Bakterielle Anpassungsstrategien

Mikroorganismen verfügen über eine enorme genetische Flexibilität, die es ihnen erlaubt auf sich ändernde Bedingungen in ihrem Habitat zu reagieren (Corcoran et al. 2008). Einige Beispiele für möglichen Stressantworten und Umweltstimuli sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Diese sichern das Überleben der Bakterien, führen aber in technischen Prozessen und im medizinischen Bereich zu einer Reihe von Problemen. Im Bereich der Trinkwasseraufbereitung können sich Bakterien durch ihre Fähigkeit, in ein VBNC-Stadium überzugehen, einer Desinfektionsmaßnahme entziehen und nachträglich zu einer erneuten Verkeimung des Trinkwassers führen. Die Biofilmbildung stellt eine weitere mögliche Stressantwort von Bakterien dar. Diese kann in technischen Prozessen mit großen Kosten verbunden sein, die durch Biofouling, insbesondere bei der Nanofiltration und der Umkehrosmose, entstehen.



**Abb. 4.1:** Stressantworten bei Bakterien (modifiziert nach T. Mascher, Research Group 11-1 „Microbial Stress Responses“, Karlsruhe).

Die Frage nach molekularen Zusammenhängen zwischen Umweltstimuli und spezifischer Genaktivierung ist sowohl bei planktonischen als auch bei Biofilmpopulationen von entscheidender Bedeutung und kann zu einem besseren Verständnis von Pathogenitätsmechanismen und damit zu einer verbesserten Prophylaxe und Therapie sowie zu deutlich sinkenden Kosten führen. Weiterhin ist es insbesondere bei technischen Prozessen, bei denen in der Regel verschiedenste Bakterienspezies zu Problemen führen,

wichtig eine Stressadaptation unabhängig von der Untersuchung spezifischer Gene erkennen zu können. So können gezielt Maßnahmen ergriffen werden, um diese Populationen zu manipulieren. Bis heute sind die Anpassungsstrategien von Bakterien allerdings nur unzureichend untersucht worden, zumal oft nur spezifische Modellorganismen und deren individuellen Stressantworten betrachtet wurden, während die Anpassungsstrategien bei natürlichen Populationen weitgehend unerforscht geblieben sind. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit gezielt Stressparameter bei verschiedenen in der Umwelt vorkommenden und pathogenen Bakterien verwendet. Mehrere molekulare Marker wurden ausgewählt, um bakterielle Stressantworten bei planktonischen und adhärennten Bakterien erkennen und näher charakterisieren zu können.

## 4.2 Physiologie bei Stressexposition

Für die Untersuchung des Verhaltens von hygienisch relevanten Bakterien bei Stress wurden die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) und der Gesamt-RNA-Gehalt bestimmt. Die Gesamt-RNA-Menge wurde quantifiziert, da diese einen Einblick in eine möglicherweise veränderte Genexpression gibt. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Bakterien verwendet, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden. Diese Phase, die durch ein begrenztes Nährstoffangebot und eine mögliche Anhäufung toxischer Stoffe gekennzeichnet sein kann, stellt für Bakterien bereits eine Stresssituation dar, bei der die Bedingungen für das Wachstum der Mikroorganismen nicht optimal sind. Als Stressparameter selbst wurden Nährstofflimitierung durch Inkubation in Leitungswasser (Oligotrophie) und osmotische Änderungen durch die Inkubation in einer 0,5 M Salzlösung (osmotischer Stress) verwendet, da diese bei technischen Prozessen eine besondere Relevanz besitzen. Somit wurden die Mikroorganismen einem Doppelstress ausgesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten natürlichen Habitate ebenfalls nicht optimal für eine Vermehrung sind, konnten mit der Verwendung von Zellen der stationären Phase die Voraussetzungen, die natürlicherweise vorkommen, im Labor nachgestellt werden.

Die durchgeführten Versuche ergaben, dass sich bei dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* bei osmotischem Stress keine Veränderungen über einen Zeitraum von fünf Tagen ergab, während es bei *Escherichia coli* zu einer Abnahme der Zellzahl und des RNA-Gehalts um den Faktor 10 kam. Bei Oligotrophie wurden bei beiden Mikroorganismen keine signifikanten Änderungen in der Anzahl der Bakterien und des RNA-Gehalts festgestellt. Dies spricht für eine gute Adaptation der untersuchten Mikroorganismen an die verwendeten Stressoren. Das Absterben der Zellen und die Abnahme des RNA-Gehaltes bei *Escherichia coli* kann damit erklärt werden, dass Pseudomonaden weit

verbreitete Boden- und Wasserkeime sind, während *Escherichia coli* ein Darmbewohner ist. Aus diesem Grund könnte *Pseudomonas aeruginosa* in seinem natürlichen Habitat mit stärkeren Veränderungen der Umwelt konfrontiert sein als *Escherichia coli*.

Bei den Gram-positiven Bakterien *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* wurde in dieser Arbeit bei beiden Stressformen eine deutliche Reduktion der Zellzahl bei gleichzeitiger Zunahme der Gesamt-RNA festgestellt. Parallele Untersuchungen befassten sich mit dem Anteil der ribosomalen RNA in der Gesamt-RNA. Es konnte zumeist ein gleich bleibender Anteil an rRNA bei beiden Gram-positiven Bakterien festgestellt werden, allerdings kam es bei *Enterococcus faecium* zu einer Abnahme der rRNA um den Faktor 10 während der Inkubation in Leitungswasser. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die zeigten, dass die rRNA bei Stressexposition, vor allem bei Nährstofflimitierung, abgebaut wird (Deutscher 2009). Andererseits konnte beobachtet werden, dass die Menge an rRNA bei Bakterien im VBNC-Zustand, der ebenfalls eine Stressreaktion darstellt, gleich bleibt (Lahtinen et al. 2008). Zusammenfassend zeigt der zumeist nicht veränderte Anteil an rRNA, dass sich die Zunahme der Gesamt-RNA tatsächlich durch einen Anstieg und somit durch eine verstärkte Expression verschiedener, stressregulierter Gene erklären lässt, die zum Überleben des Stresses oder zur Reparatur vorhandener Schäden benötigt werden. Andererseits ist auch eine veränderte Stabilität sowohl spezifischer als auch genereller mRNA-Transkripte in Betracht zu ziehen, die bereits bei *Staphylococcus aureus* (Clements und Foster 1998), *Bacillus subtilis* (Condon et al. 1996), *Escherichia coli* (Albertson und Nyström 1994) und Vibrionen (McDougald et al. 2002) nachgewiesen wurde. So konnten Veränderungen in der Degradation der RNA durch eine veränderte Aktivität der RNaseE (Hagege und Cohen 1997; Takayama und Kjelleberg 2000) bei Stress gezeigt werden. RNaseE ist eine Endoribonuklease, die RNA bevorzugt an AU-reichen Stellen schneidet (McDowall et al. 1994). Singh et al. (2009) zeigten, dass bei *Escherichia coli* das ribosomale Protein L4, das bei Stress verstärkt vorliegt, die RNaseE-Aktivität inhibieren kann, wodurch verschiedene stressrelevante mRNA-Transkripte, unter anderem die Lon-Protease, welche bei der Regulation von *rcaA* im Rcs-Signalweg eine Rolle spielt, stabilisiert wurden. Zusätzlich können die Interaktionen zwischen RNA und Proteinen (Chamot et al. 1999; Jones et al. 1996; Liu et al., 1998; Vytvytska et al. 1998) während Stressexposition verändert sein.

Viele Bakterien sind in der Lage, sich einem Nährstoffmangel in ihrem Habitat anzupassen. Dabei gibt es Bakterien, die Hungerstadien ausbilden, aber noch einen aktiven Erhaltungsstoffwechsel betreiben (starvation), sowie zum anderen Ruhestadien oder „schlafende“ Zellen, die einen reduzierten Stoffwechsel aufweisen (Colwell 2000), wie es zum Beispiel für das VBNC (viable but nonculturable)-Stadium (Heim et al. 2002)

beschrieben wurde. Eine große Relevanz hat dieser physiologische Zustand vor allem bei Indikatororganismen und Pathogenen, die mit bisher eingesetzten, meist auf Kultivierung beruhenden Standardmethoden, in der Umwelt nicht nachgewiesen werden konnten. Sie sind aber dennoch vorhanden, behalten ihre Infektiosität und stellen damit ein nicht zu unterschätzendes gesundheitliches Risiko dar (Huq et al. 2000; Oliver 2005). Anfängliche kritische Betrachtungen des VBNC-Zustandes bezogen sich meist auf die Terminologie, da einige Autoren für die Eigenschaft „viable“ nicht nur Lebensfähigkeit, sondern auch Teilungsfähigkeit und Kultivierbarkeit voraussetzten und die Bezeichnung „lebendig aber nicht kultivierbar“ für sie einen Widerspruch darstellte (Barer et al. 1998; Barer und Harwood 1999; Kell et al. 1998). In der Vergangenheit wurde die Existenz von VBNC-Stadien als Anpassungsstrategie bei Enterobakterien von einzelnen Autoren bestritten (Bogosian und Bourneuf 2001; Desnues et al. 2003). Vor allem wurden jene Studien kritisiert, die keinen eindeutigen Nachweis einer Reaktivierung der VBNC-Zellen lieferten. Ohtomo und andere erbrachten dann aber den Beweis, dass auch Enterobakterien in einem VBNC-Zustand vorliegen können, indem sie die Reaktivierung von VBNC-Zellen nachwiesen (Bjergbaek und Roslev 2005; Na et al. 2006; Ohtomo und Saito 2001).

In dieser Arbeit wurde zur Feststellung eines VBNC-Zustands der DNA-Gehalt lebender Zellen mit der Anzahl der kultivierbaren Einheiten (KBE) verglichen. Dazu wurden Versuche mit Propidium-Monoazid (PMA), das aus Zellen mit intakten Zellmembranen ausgeschleust wird (Nocker et al. 2006), durchgeführt. Die Unterscheidung lebender bzw. toter Zellen wird gewöhnlich über die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bestimmt, inzwischen kommen auch Fluoreszenz-basierte Assays für die enzymatische Aktivität oder den Elektronentransport sowie molekulare Methoden zur Detektion von DNA und RNA zum Einsatz. Da alle diese Untersuchungsmöglichkeiten zu falsch positiven oder falsch negativen Resultaten führen können (Birch et al. 2001; Josephson et al. 1993; Kort et al. 2008; Nyström 2001; Postgate 1976), wird heute die Chemikalie PMA verwendet, die eine Unterscheidung zwischen toten und stoffwechselaktiven Bakterien ermöglicht und so eine Aussage über ein VBNC-Stadium zulässt. Allerdings ist auch diese Methode nicht für alle Anwendungen geeignet. So kommt es zu Problemen bei Proben von anaeroben Schlammreaktoren (Wagner et al. 2008). Mit der Chemikalie PMA ist es ebenfalls nicht möglich, die Abtötungseffizienz bei UV-Bestrahlung (Nocker et al. 2007) oder anderen Inaktivierungsmechanismen, bei denen nicht direkt die Zellwand das Ziel ist, zu ermitteln. Des Weiteren muss beachtet werden, dass bei dieser Methode lediglich die Membranintegrität als Viabilitätskriterium herangezogen wird (Nocker und Camper 2009). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei *Enterococcus faecium* der DNA-Gehalt lebender Zellen in gleicher Weise abnahm wie die Anzahl der kultivierbaren

Zellen. Dies deutet auf eine Anpassung an Hunger hin, da die lebenden Zellen weiterhin kultivierbar blieben. Bei dem nahe verwandten Bakterium *Enterococcus faecalis* hingegen zeigte sich, dass die Anzahl der kultivierbaren Zellen signifikant stärker sank als der DNA-Gehalt lebender Zellen. Diese Beobachtung ist ein Hinweis auf ein beginnendes VBNC-Stadium, bei dem die Zellen nicht mehr auf herkömmlichen Medien kultiviert werden konnten, aber dennoch aktiv waren. Der Übergang in ein Stadium der Nichtkultivierbarkeit bei Stress fand in dieser Arbeit bei einer für die Bakterien optimalen Temperatur statt, was im Gegensatz zu einigen Untersuchungen steht, bei denen ein VBNC-Stadium bei Gram-positiven Bakterien nur durch gleichzeitige Nährstofflimitierung und niedrige Temperaturen (4°C) erreicht werden konnte (Heim et al. 2002; Gonzalez-Escalona et al. 2006; Lleo et al. 1999; Lleo et al. 1998). Eine andere Studie zeigt aber, dass auch bei höheren Temperaturen (22-25°C) Bakterien in einen VBNC-Zustand übergehen können (Ben Kahla-Nakbi et al. 2007).

Die Osmolarität eines Habitats ist für Bakterien ein bedeutender wachstumslimitierender Faktor, daher ist die Fähigkeit auf osmotische Unterschiede in ihrer Umwelt zu reagieren, ein wichtiger Prozess, um zu überleben (Csonka und Hanson 1991). Die Veränderung der Osmolarität stellt für Bakterien eine weitverbreitete Stressform dar, und es wurden bereits unterschiedliche Anpassungsstrategien bei verschiedenen Bakterienspezies näher untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal festgestellt, dass *Enterococcus faecalis*, bei dem schon ein beginnendes VBNC-Stadium bei Nährstofflimitierung bestimmt wurde, auch bei osmotischem Stress (0,5 M Salzlösung) diese Anpassungsstrategie zeigte. Bis heute gibt es noch keine Hinweise auf ein VBNC-Stadium bei Gram-positiven Bakterien, das durch eine erhöhte Salzkonzentration erreicht wurde. Bei den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas fluorescens* hingegen konnte ein Eintritt in das VBNC-Stadium bei osmotischem Stress nachgewiesen werden, allerdings lag hier die Salzkonzentration höher (Mascher et al. 2000). Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* zeigte sich ein Einfluss auf die Kultivierbarkeit bei erhöhter Konzentration an Salz (Roth et al. 1988; Velasco et al. 1995).

Ein VBNC-Stadium wird bei Bakterien als Antwort auf Stress ausgebildet. Der in dieser Arbeit festgestellte beginnende VBNC-Zustand von *Enterococcus faecalis* sowohl bei Nährstofflimitierung als auch bei osmotischem Stress ist ein deutlicher Hinweis auf eine verstärkte Stressantwort dieses Bakteriums im Vergleich zu *Enterococcus faecium*, bei dem ein VBNC-Stadium nicht erkennbar war. Die Fähigkeit von *Enterococcus faecium*, auch bei nicht optimalen Bedingungen weiterhin kultivierbar zu bleiben, wurde auch von anderen Studien bestätigt, die zeigen konnten, dass *Enterococcus faecium* im Vergleich zu *Listeria*

*monocytogenes* nicht in ein VBNC-Stadium übergang (Wery et al. 2006). Die festgestellten Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass *Enterococcus faecium* besser an verschiedene Stressoren adaptiert ist als *Enterococcus faecalis*. Die bessere Adaptation von *Enterococcus faecium* konnte auch bei anderen Stressparametern festgestellt werden (Ahmad et al. 2002). Dies erklärt unter anderem die Tatsache, dass es mehr antibiotikaresistente *Enterococcus faecium* gibt (Werner et al. 2008) und dass in verschiedenen Umweltproben verstärkt *Enterococcus faecium* nachgewiesen werden konnte (Kühn et al. 2003).

### 4.3 Speziesspezifische Regulatoren

Die Regulation der Genexpression wird durch die Organisation der Gene in Gruppen ermöglicht. Dabei werden Operons und Regulons unterschieden (Vanbogelen und Neidhardt 1990). Als Regulatoren auf Genexpressionsebene dienen DNA-bindende Proteine, welche die Bindung bzw. die Aktivität der RNA-Polymerase in der Promotor-Region eines Gens bzw. Operons fördern (Aktivatoren), hemmen (Repressoren) oder aber erst ermöglichen. Zu den letztgenannten zählen die Sigmafaktoren, die durch Erkennung und Bindung eines spezifischen DNA-Motivs in der Promotorregion und Bindung der RNA-Polymerase die Transkription ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde anhand des Sigmafaktors *rpoS* von *Pseudomonas aeruginosa* die Parametrierung der Stressbedingungen durchgeführt. Mit diesen wurde das *rcaA*-Gen von *Escherichia coli*, einem Faktor des Rcs-Signalwegs, untersucht, der eine Rolle bei der Biofilmbildung als Stressantwort spielt. Zusätzlich wurde das Gen des Penicillin-bindenden Protein 5 (*pbp5*) bei Enterokokken analysiert, das an der Zellwandsynthese beteiligt ist, die als erste Stelle auf Umweltstimuli reagiert. Als Stressparameter wurde die Inkubation in einer 0,5 M Natriumchloridlösung (osmotischer Stress) und in Leitungswasser (Oligotrophie/Hungerstress) bis zu einem Zeitraum von 5 Tagen, sowie die stationäre im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase, untersucht. Für die Analyse der sich verändernden Genexpression mittels quantitativer PCR wurden für alle untersuchten Gensysteme spezifische Primer und Sonden hergestellt. Zusätzlich wurden zur Absicherung der ermittelten Ergebnisse Northern Blot- Analysen durchgeführt.

#### ***Pseudomonas aeruginosa***

Die Induktion des Sigma-Faktors (*rpoS* Regulon) während der stationären Phase wird durch unterschiedliche Stressoren hervorgerufen. Dies resultiert in der Aktivierung eines sehr komplexen Netzwerkes funktioneller, unabhängiger Gene, welche die Fähigkeit der

Bakterien erhöhen, gegen eine große Anzahl von Stressfaktoren zu bestehen. In der Phase des langsamen Wachstums und der beginnenden stationären Phase bzw. des abrupten Übergangs von Wachstum zum Hunger (starvation) wurden zahlreiche Untersuchungen zur Veränderung der Physiologie und Morphologie sowie deren Regulation durchgeführt (Hengge-Aronis 2002a; Hengge-Aronis 2002b; Kolter et al. 1993; Kolter 1999; Moreau 2004; Schweder und Hecker 2004; Siegele und Kolter 1992, Wright et al. 2009). Im Rahmen dieser Analysen wurde ein komplexes Regulationsnetzwerk beschrieben, das neben alternativen Sigmafaktoren auch verschiedene kleinere Regulatormoleküle umfasst (Repoila et al. 2003; Riva et al. 2004; Schweder und Hecker 2004; Wick und Egli 2004), wobei die meisten Änderungen in der stationären Phase durch die alternative RNA-Polymerase RpoS reguliert werden (Saint-Ruf et al. 2007).

Auch in dieser Arbeit wurde eine Induktion des *rpoS*-Gens in der stationären Phase nachgewiesen. In Übereinstimmung mit der Feststellung, dass *rpoS* auch bei verschiedenen anderen Arten von Stress verstärkt exprimiert wird (Balaji et al. 2005; Hengge-Aronis 1996; Hengge-Aronis et al. 1993; Lee et al. 1995; Muffler et al. 1997; Muffler et al. 1996), konnte in der vorliegenden Arbeit eine Induktion sowohl bei Hungerstress als auch bei osmotischem Stress ermittelt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die verwendeten Stressparameter für die Untersuchung der übrigen Gene bei planktonischen Bakterien und Biofilmpopulationen herangezogen.

Bei der Biofilmbildung, als eine mögliche Stressreaktion, konnte bei dieser Arbeit eine verstärkte Expression von *rpoS* nachgewiesen werden. Die Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien, die feststellten, dass die *rpoS*-Expression in einem 3 Tage alten Biofilm im Vergleich zu planktonischen Bakterien erhöht ist (Xu et al. 2001). Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass Biofilme Charakteristika der stationären Phase aufweisen. Im Gegensatz dazu gibt es Untersuchungen, die die Bildung eines „dickeren“ Biofilms (Heydorn et al. 2002) oder die verstärkte Fähigkeit zur Biofilmbildung bei *rpoS*-Mutanten beschreiben (Yun et al. 2007). Auch zeigten Untersuchungen von Manos und Kollegen (2009) eine verminderte Expression von *rpoS* in Biofilmen.

Zusätzlich zur Untersuchung der Biofilmbildung als Stressantwort, wurden in dieser Arbeit, analog zu den Versuchen mit planktonischen Bakterien, adhärente *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen in nährstoffarmem Leitungswasser oder einer 0,5 M NaCl-Lösung inkubiert. Dabei konnten deutlich geringere Induktionsfaktoren von *rpoS* im Vergleich zu planktonischen Bakterien festgestellt werden. Eine Erklärung ist das mögliche Vorkommen mehrerer Resistenzmechanismen in einem Biofilm im Vergleich zu einer einzelnen Zelle, was sich in einer verstärkten Resistenz von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Substanzen widerspiegelt (Burmølle et al 2006; Leriche et al. 2003; Mah und O'Toole 2001). So waren

Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa* weniger anfällig gegenüber der Behandlung mit Wasserstoffperoxid, wobei eine Mutation im *rpoS*-Gen zu einem vollständigen Rückgang der erhöhten Resistenz der adhärenen Bakterien führte (Cochran et al. 2000).

Um den natürlichen Begebenheiten in einem Biofilm näher zu kommen, wurden außerdem Untersuchungen bei adhärenen Mischkulturen vorgenommen. Hierzu wurden Mischpopulationen aus dem Ablauf einer Kläranlage *Pseudomonas aeruginosa* zugesetzt und Biofilme angezogen. Es zeigte sich eine vergleichbare Induktion des *rpoS*-Gens bei der Biofilmbildung und bei Oligotrophie mit den adhärenen Reinkulturen, während es bei osmotischem Stress zu einer deutlich erhöhten Induktion von *rpoS* bei Biofilmen einer Mischkultur kam. Diese Zunahme kann nicht damit erklärt werden, dass die Bakterien im Ablauf der Kläranlage aufgrund ihres natürlichen Habitats schlecht an Änderungen in der Osmolarität angepasst sind, und es daher bei osmotischem Stress zu einer starken Stressantwort kommt. Die Untersuchung mittels quantitativer PCR wurde mit *Pseudomonas aeruginosa*-spezifischen Primern durchgeführt, so dass die *rpoS*-Expression der Bakterien aus der Kläranlage nicht gemessen werden konnte.

### ***Escherichia coli***

Das *rcaA*-Gen ist ein Faktor des Rcs-Signalweges, der an der Biofilmbildung (Danese et al. 2000) sowie an der Synthese der extrazellulären Matrix in *Escherichia coli* (Rahn und Whitfield 2003; Virlogeaux et al. 1996) als Stressreaktion beteiligt ist. Mutationen im *rcaA*-Gen führen somit meist zu nichtmukoiden Stämmen (Majdalani und Gottesman 2007). Weiterhin spielt der Rcs-Signalweg eine Rolle bei der Regulation des Schwärmens von Bakterien (Francez-Charlot et al. 2003), der Antwort auf Austrocknung durch die Kapselbiosynthese und Membranzusammensetzung (Ferrieres et al. 2003, Sledjeski und Gottesman 1996). Bei Schädigungen der Peptidoglykanschicht konnte eine Beteiligung des Rcs-Systems nachgewiesen werden (Boulanger et al. 2005). Durch die Inhibierung der PBPs (Penicillin-bindende Proteine), die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind und durch Antibiotika inaktiviert werden, wurde der Rcs-Signalweg aktiviert und so die Überlebensrate bei Antibiotikabehandlung erhöht (Laubacher und Ades 2008). Das Rcs-System ist darüber hinaus bei pH-Änderungen (Castanie-Cornet 2007) und der Antibiotikaresistenz beteiligt (Hirakawa 2003), wobei RcsA nicht benötigt wird (Laubacher und Ades 2008). Der Rcs-Signalweg scheint ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des als Masterregulator der generellen Stressantwort bezeichneten *rpoS*-Gens durch LrhA zu spielen (Peterson et al. 2006). Transkriptomanalysen lassen den Schluss zu, dass bis zu 2,5% des Genoms von *Escherichia coli* durch das Rcs-System reguliert werden könnten (Ferrieres und Clarke 2003).

Allerdings wurden noch wenige Untersuchungen durchgeführt zur Rolle des Rcs-Systems bei der Anpassung an Umweltstress, der natürlicherweise auftritt (Castanie-Cornet 2007). Insbesondere zum Verhalten des *rcaA*-Gen bei Umweltstimuli sind kaum Studien bekannt. Der Rcs-Signalweg in *Escherichia coli* ist bei Änderung der Osmolarität von Bedeutung (Boulanger et al. 2005; Ferrieres et al. 2003; Francez-Charlot et al. 2005; Sledjeski und Gottesman 1996), allerdings wurde meist über eine Beteiligung des Rcs-Signalwegs ohne RcsA berichtet. So konnte eine RcsA-unabhängige Aktivierung des *bdm*-Gens (*biofilm-dependent modulation*), das durch osmotischen Stress aktiviert wird, bei *Escherichia coli* gezeigt werden (Francez-Charlot et al. 2005). Auch das *osmB*-Gen, welches bei osmotischem Stress, aber auch in der stationären Phase eine Induktion zeigt, wird durch den Rcs-Signalweg aktiviert, allerdings ohne Beteiligung von *rcaA* (Boulanger et al. 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Induktion des *rcaA*-Gens bei osmotischem Stress beobachtet werden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben genannten Studien steht und für eine unmittelbare Beteiligung von *rcaA* bei dieser Stressantwort spricht. Bei der Untersuchung des *rcaA*-Gens von *Escherichia coli* während der Inkubation in nährstoffarmem Leitungswasser konnte erstmals demonstriert werden, dass das *rcaA*-Gen auch bei Nährstofflimitierung als häufiger Umweltstress induziert wurde und somit auch bei diesem Stressparameter eine wichtige Funktion übernimmt. Die Analyse der stationären Wachstumsphase führte ebenfalls zu einer Induktion des untersuchten Gens. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei *rcaA* um einen stressregulierten Faktor handelt, der bei einer Reihe verschiedener Stressbedingungen eine bedeutende physiologische Rolle spielt.

Wie bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde in dieser Arbeit auch bei *Escherichia coli* die Expression des Stressregulators bei Biofilmen untersucht. Bei der Biofilmbildung selbst konnte eine Induktion von *rcaA* ermittelt werden. Dies wurde erwartet, da der Rcs-Signalweg mit RcsA an der Biofilmbildung (Danese et al. 2000, Prigent-Combaret et al. 1999) sowie an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt ist (Rahn und Whitfield 2003; Virlogeaux et al. 1996). Die *rcaA*-Expression adhärenter Reinkulturen und planktonischer Bakterien unterschied sich bei den beschriebenen Stressparametern. Die Induktion von *rcaA* bei osmotischem Stress war bei adhärennten Bakterien höher (Faktor 3,6), während es bei Hungerstress zu einer verstärkten Induktion bei planktonischen Zellen kam (Faktor 4,3). Eine mögliche Erklärung liegt in der Tatsache, dass es innerhalb von Biofilmen zu einer besseren Nährstoffversorgung kommt. Somit benötigen die Bakterien keine verstärkte Stressantwort, die durch eine Induktion des *rcaA*-Gens angezeigt wird. Die EPS-Matrix hat sorbierende Eigenschaften und kann Nährstoffe akkumulieren, was für das Leben unter Hungerbedingungen entscheidend ist. Der Befund, dass die Expression von *rcaA* bei osmotischem

Stress bei adhärenenten Bakterien im Vergleich zu planktonischen Bakterien erhöht war, könnte darin begründet sein, dass es im Biofilm zusätzlich zu der Behandlung mit einer Salzlösung verstärkt zu Schwankungen in der Osmolarität kommt (Prigent-Combaret et al. 1999).

### ***Enterococcus faecium und Enterococcus faecalis***

Die Zellwand von Bakterien dient dem Schutz vor Umwelteinflüssen und ist daher die erste Stelle an der es zu einer Stressreaktion kommt. Peptidoglykane (Murein) sind Makromoleküle aus mehreren miteinander verknüpften Untereinheiten. Für das Wachstum müssen diese Stränge durch Hydrolasen gelöst und durch Penicillin-bindende Proteine (PBPs) neue Stränge wieder in die bestehende Peptidoglykanschicht eingebaut werden (Höltje 1998). Dieser Prozess muss genau kontrolliert werden, um eine Hydrolyse der Peptidoglykane zu vermeiden.

Jede Bakterienspezies besitzt eine bestimmte Anzahl verschiedener PBPs. Es sind viele Studien vorhanden über die Struktur (Powell et al. 2009; Sauvage et al. 2008; Urbach et al. 2009) und über die physiologischen Funktionen dieser Enzyme (Bandara et al. 2008; Goffin und Ghuyssen 1998; Young 2001) sowie über die Empfindlichkeit verschiedener Bakterien gegenüber Antibiotika (Oshaki et al. 2008; Yang et al. 2008). Allerdings ist bisher wenig über das Verhalten der PBPs bei Umweltstimuli bekannt. In den letzten Jahren wurde bei verschiedenen Bakterien das VBNC (viable but nonculturable)-Stadium nachgewiesen, das als eine Antwort auf Stress gilt, wobei der Übergang von Veränderungen in der Zellmembran gekennzeichnet ist. Besonders signifikant sind die vermehrten Anteile des PBP5-Proteins in der Zellwand von *Enterococcus faecalis* im VBNC-Stadium (Signoretto et al. 2000). Zusätzlich wurde das *pbp5*-Gen in den letzten Jahren vermehrt als Vitalitätsmarker im VBNC-Stadium verwendet (Fischer-Le Saux et al. 2002; Leo et al. 2001; Lleo et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des *pbp5*-Gens bei verschiedenen Stressstimuli untersucht. Es gibt Hinweise auf eine veränderte Genexpression im VBNC-Stadium. Gonzalez-Escalona und Kollegen (2006) konnten eine höhere Konzentration von *tuf*, das für die Proteinsynthese benötigt wird, sowie von *relA* und *rpoS*, die stressreguliert sind, im VBNC-Zustand nachweisen. Auch bei Mikroarray-Analysen konnte eine Induktion von 100 Genen in VBNC-Stadium gezeigt werden, die zumeist für zelluläre Prozesse verantwortlich sind. Bei *Escherichia coli* wurde das äußere Membranprotein W (OmpW) im VBNC-Stadium induziert (Asakura et al. 2008). *Bacillus subtilis* wies eine Induktion von *pbp4* im salzhaltigen Medium und in der stationären Phase auf (Palomino et al. 2008).

In dieser Arbeit konnte eine starke Repression des *pbp5*-Gens bei *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* bei Oligotrophie und osmotischem Stress gezeigt werden, wobei

es Hinweise auf ein beginnendes VBNC-Stadium bei *Enterococcus faecalis* gab. Dies korreliert nicht mit der oben genannten Untersuchung von Signoretto und Kollegen (2000), die vermehrte Anteile des PBP5-Proteins in der Zellwand von *Enterococcus faecalis* im VBNC-Stadium nachwies. Allerdings wurde in dieser Studie das PBP5-Protein nach einer Inkubationsdauer von 16 Tagen in Seewasser bei niedrigen Temperaturen untersucht, während bei dieser Arbeit der Zeitraum kürzer war und die Inkubation bei höheren Temperaturen stattfand. Dies könnte eine Erklärung für das veränderte Verhalten von *pbp5* sein. Es wurde nachgewiesen, dass es im VBNC-Stadium zu Veränderung der Zellmorphologie kommt (Tangwatcharin et al. 2006; Vattakaven et al. 2006). Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass das *pbp5*-Gen für mögliche Morphologieveränderungen im VBNC-Zustand von *Enterococcus faecalis* nicht vermehrt benötigt wird und andere Gene dieser Klasse beteiligt sein könnten. Auch bei *Enterococcus faecium* scheint das *pbp5*-Gen bei Änderungen in der Salzkonzentration des umgebenden Mediums und bei Nährstofflimitierung keine bedeutende Rolle zu spielen. Die unterschiedlichen stressauslösenden Faktoren in der stationären Phase führten bei *Enterococcus faecium* zu einer Repression, bei *Enterococcus faecalis* zu einer Induktion von *pbp5*. Dies zeigt, dass Bakterien selbst innerhalb einer Gattung bei der Untersuchung desselben Gens und Stressstimulus unterschiedlich reagieren.

Zusammenfassend konnte bei der Untersuchung der speziesspezifischen Regulatoren erstmals eine Beteiligung des *rcaA*-Gens von *Escherichia coli* bei osmotischem Stress, Oligotrophie sowie in der stationären Wachstumsphase sowohl bei planktonischen Bakterien als auch bei Biofilmen nachgewiesen werden. Bei allen verwendeten Stressparametern wurde das *rcaA*-Gen induziert. Das *pbp5*-Gen von Enterokokken ist ebenfalls stressreguliert. Bei Erhöhung der Salzkonzentration und bei Nährstofflimitierung wurde *pbp5* reprimiert, in der stationären Wachstumsphase bei *Enterococcus faecium* reprimiert und bei *Enterococcus faecalis* induziert. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheinen beide Gene eine wichtige physiologische Rolle bei verschiedenen Umweltstimuli zu spielen und sich als Stressparameter verwenden zu lassen.

#### **4.4 Expression des universellen Stressprotein (*usp*)**

Zusätzlich zur Untersuchung speziesspezifischer Gene bei den in dieser Arbeit verwendeten hygienisch relevanten Mikroorganismen wurden Expressionsanalysen verschiedener *usp*-homologer Gene nach Stressexposition durchgeführt, bei denen zum Teil noch keine Studien

zu ihrer physiologischen Bedeutung vorlagen. Die Usp-Proteine kommen sowohl bei Eukaryoten, Prokaryoten als auch Archaeen vor und werden bei einer Vielzahl von exogenen oder endogenen Stimuli exprimiert. Bis heute ist das UspA-Protein von *Escherichia coli* mit einer Größe von 15,8 kDa am besten untersucht. Das Bakterium besitzt insgesamt 6 über das gesamte Chromosom verteilte Gene. Einige dieser *usp*-Gene befinden sich in enger Nachbarschaft zu anderen Genen, deren Produkte wichtige Funktionen bei verschiedensten Stressadaptationen übernehmen (Kvint et al. 2003). So liegt *uspC* direkt stromabwärts des für die Synthese von Trehalose benötigten *otsBA*-Operons (Csonka und Epstein 1996). *uspE* ist direkt stromabwärts des Gens *fnr* lokalisiert, dessen Produkt den globalen Regulator bei der Adaptation anaerober Bedingungen darstellt (Kiley und Beinert 1998). Das Gen *uspG* liegt direkt stromaufwärts der Gene *ahpC* und *ahpF*. Beide spielen eine wichtige Rolle bei oxidativem Stress, indem sie bei der Reduktion von organischen Hydroperoxiden beteiligt sind (Wood et al. 2001).

ppGpp ist dabei essentiell für eine Induktion von *uspA*, *uspC*, *uspD*, *uspE* (Gustavsson et al. 2002; Kvint et al. 2003) und wird auch als Schlüsselregulator bei vielen in der stationären Phase induzierten Gene bezeichnet (Magnusson et al. 2005). Zudem stehen die Gene *uspA* und *uspD* unter der negativen Kontrolle des FadR-Regulators, der bei der Regulation des Fettsäure-Metabolismus in *Escherichia coli* eine wichtige Rolle spielt (Farewell et al. 1996). Die *uspA*-Expression ist zudem durch Fruktose-6-Phosphat aus der Glykolyse und Glukoneogenese reguliert (Persson et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden bei der Untersuchung des universellen Stressgens *uspA* und mehrerer *usp*-homologer Gene die gleichen Stressparameter verwendet wie bei den Analysen der speziesspezifischen Regulatoren. Ziel war es, einen möglichst universellen Marker für Stressexposition bei den untersuchten Bakterien zu finden. Dazu wurden verschiedene *usp*-homologe Proteine von *Enterococcus faecalis* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgewählt (siehe Anhang Alignements) und zu den jeweiligen aus der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) entnommenen Gensequenzen passende Primer berechnet und validiert. Zusätzlich wurde das *uspA*-Gen, als ein Vertreter der Usp-Familie von *Escherichia coli*, untersucht. Übereinstimmend mit bisherigen Versuchen (Gawande und Griffiths 2005, Nyström und Neidhardt 1994) konnte auch bei dieser Arbeit eine Induktion des *uspA*-Gens von *Escherichia coli* bei osmotischem Stress und in der stationären Phase demonstriert werden. Lediglich bei Hungerstress kam es zu einer Repression des Gens.

Die näher charakterisierten *usp*-homologen Gene von *Pseudomonas aeruginosa* (PLES\_20451) und *Enterococcus faecalis* (EF1982, EF3035, EF1058 und EF1084), über die noch keine Studien zu ihrer Expression oder Funktion durchgeführt wurden, zeigten eindeutige Expressionen bei den verwendeten Stressparametern. Diese entsprachen dem

gleichen Expressionsmuster wie bei der Untersuchung der speziesspezifischen Regulatoren, was einerseits bestätigt, dass es sich bei den *usp*-homologen Genen tatsächlich um stressregulierte Faktoren handelt und andererseits den Schluss zulässt, dass sich die in dieser Arbeit untersuchten Gene als universelle Stressmarker verwenden lassen. Die Expressionsintensität der *usp*-homologen Gene von *Enterococcus faecalis* unterschied sich kaum voneinander, auch wenn das Gen EF1084 zumeist stärker induziert bzw. reprimiert wurde. Dies zeigt, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Gene bei den verwendeten Stressoren eine ähnliche physiologische Relevanz besitzen.

Die Induktion von *rcaA* von *Escherichia coli* bei Oligotrophie konnte bei der Untersuchung des *uspA*-Gens nicht bestätigt werden. Da es sich bei dem untersuchten *uspA*-Gen allerdings nur um ein einziges Mitglied der Usp-Familie handelt, kann diese Abweichung nicht zu einer Aussage darüber herangezogen werden, ob sich die Gene der Usp-Familie als universelle Stressmarker eignen. Es müssen somit noch weitere Untersuchungen mit anderen *usp*-Genen von *Escherichia coli* und anderen Bakterienspezies durchgeführt werden, um die ersten Hinweise darauf zu bestätigen, dass sich *usp*-Gene als generelle Stressmarker verwenden lassen.

#### **4.5 Molekulare Fingerprints bei Stress und unterschiedlichen physiologischen Stadien bei Bakterien**

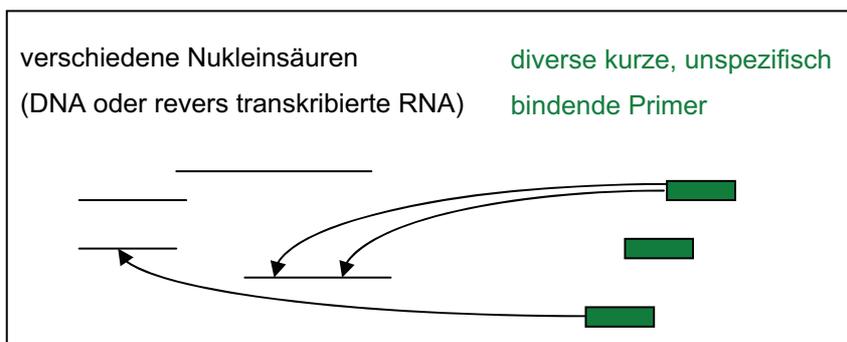
Mikroorganismen reagieren mit unterschiedlichen molekularen Mechanismen auf Stress. Die darauf folgenden Änderungen in der Zelle, beispielsweise der Eintritt in das VBNC-Stadium, können als verschiedene physiologische Stadien definiert werden. Zur Untersuchung von Stressantworten auf sich ändernde Umweltbedingungen bei Bakterien wurden verschiedene speziess- und genunabhängige Methoden untersucht. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, auch komplexe bakterielle Populationen betrachten zu können sowie auch Bakterien zu untersuchen, deren Genom bzw. Transkriptom nicht bekannt ist. Die bis heute in der Literatur beschriebenen Bakterien stellen lediglich 0,5-1% der geschätzten tatsächlich existierenden Mikroorganismen dar (Hacker et al. 2003). Die Erkennung und Bewertung von physiologischen Zuständen stellt die Grundlage dar, Bakterien in ihrem natürlichen Habitat zu manipulieren.

Die Analysen wurden in dieser Arbeit auf der Ebene der RNA- und zum Teil auch auf DNA-Ebene durchgeführt. Die RNA wurde in einem ersten Schritt revers in cDNA transkribiert und anschließend amplifiziert. Die Schwierigkeit in der Amplifikation prokaryotischer mRNA liegt generell in der Tatsache begründet, dass sie kein Poly(A)-Ende am 3'-Ende aufweist und somit die Basenabfolge nicht bekannt ist. Zusätzlich kommt bei Umweltproben die

Schwierigkeit hinzu, dass der Gehalt an RNA zumeist sehr niedrig ist und eine Amplifikation unumgänglich wird. Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion wird allerdings weniger als 1 ng Ausgangssubstanz als ausreichend beschrieben (Cheung und Nelson 1996), bei der es sich zudem um eine Mischung von verschiedenen Organismen handeln kann (Piel 2002). Daher wurden verschiedene Formen der Amplifikation zur Untersuchung der Stressantworten bei den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien gewählt.

### A) RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)-PCR

Eine Möglichkeit der Amplifikation von Nukleinsäuren und Unterscheidung unterschiedlicher physiologischer Stadien bei Bakterien ist die RAPD-PCR. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4.2 angegeben.



**Abb. 4.2:** Schematische Darstellung der RAPD-PCR.

Die Einteilung in verschiedene physiologische Stadien wird heute zumeist mit FACS-Analysen (Fluorescence-activated cell sorting) und Durchflusszytometrie durchgeführt und dient der Erkennung lebender und toter Bakterien und den Zwischenstufen, wie das VBNC-Stadium oder das ABNC (active but nonculturable)-Stadium (Sachidanandham et al. 2005; Sachidanandham und Yew-Hoong Gin 2009) oder der Erfassung von Unterschieden bei Bakterien nach Stressexposition (Nielsen et al. 2009; Sachidanandham und Yew-Hoong Gin 2008). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung der rep-PCR, bei der repetitive DNA-Sequenzen amplifiziert werden, um DNA-Profile bzw. Fingerprints zu erhalten (Ishii und Sadowsky et al. 2009). Sie bietet im Vergleich zu PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) eine Zeit- und Kostenersparnis (Olive und Bean 1999). Zusätzlich kommen Multiplex-PCR oder AFLP (amplified fragment-length polymorphism) zum Einsatz. Diese Methoden dienen meist der genotypischen Unterscheidung verschiedener Stämme von medizinisch relevanten Bakterien oder der Analyse mikrobieller Evolution und Ökologie.

Auch die RAPD-PCR dient der Amplifikation von DNA. Diese Art der Amplifikation wird zumeist zur Unterscheidung verschiedener Stämme eines Bakteriums verwendet. Als Ausgangssubstanz wird DNA verwendet. In dieser Arbeit wurde erstmals sowohl cDNA als auch genomische DNA als Template verwendet, um zusätzlich eine Unterscheidung auf der Ebene der Transkription zeigen zu können. Als Primer dienten unterschiedliche, kurze Primer, die aus der Literatur entnommen wurden (Gomes et al. 2008; Venieri et al. 2004). Ein großer Vorteil der Methode ist, dass keinerlei vorhergehende Kenntnis über das Genom eines Organismus benötigt wird, da sich die „Zufallsprimer“ an vorher nicht definierte Stellen der DNA anlagern, was insbesondere bei der Analyse von Biofilmen von enormer Bedeutung ist.

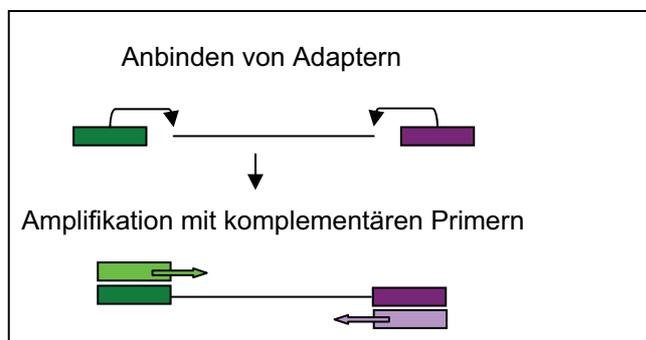
In dieser Arbeit konnten sowohl bei hygienisch relevanten Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien deutliche Unterschiede auf der Ebene der Transkription bei verschiedenen Stressstimuli gezeigt werden, was für eine universelle Einsatzmöglichkeit dieser Methode spricht. Bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* konnten jeweils nur bei osmotischem Stress Unterschiede in den Bandenmustern und somit eine Stressantwort detektiert werden. Dies betätigt zum einen die Ergebnisse bei der Untersuchung der Physiologie der Bakterien (siehe Kapitel 4.2), dass zumindest *Escherichia coli* an eine Erhöhung der Salzkonzentration nicht ausreichend adaptiert ist. Zusätzlich erhärten die fehlenden Unterschiede in den Bandenmustern bei Oligotrophie die Vermutung, dass die Mikroorganismen besser an Nährstofflimitierung angepasst sind, da bei diesem Stressparameter keine Stressantwort nachgewiesen werden konnte. Eine bessere Adaptation an Hunger-Bedingungen konnte auch schon bei den Untersuchungen zur Physiologie der Bakterien beobachtet werden, bei denen bei beiden Gram-negativen Bakterien keine Veränderung in der Anzahl der kultivierbaren Zellen und des Gesamt-RNA-Gehalts ermittelt werden konnte (siehe Kapitel 4.2).

Besonders auffällig waren die Untersuchungsergebnisse bei Enterokokken. *Enterococcus faecalis* wies sowohl bei osmotischem Stress als auch bei Oligotrophie ein verändertes Bandenmuster auf, während bei *Enterococcus faecium* dies nur bei Nährstofflimitierung der Fall war. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis auf eine verstärkte Stresstoleranz und erhöhte Fitness von *Enterococcus faecium*, insbesondere bei osmotischem Stress. Weitere Untersuchungen des Genoms stützten die Vermutung, dass *Enterococcus faecalis* osmosensitiver ist als *Enterococcus faecium*. Bei der Verwendung von DNA als Template wurde während der Inkubation in einer 0,5 M Salzlösung bei *Enterococcus faecalis* ein verändertes Bandenmuster detektiert, während sich bei *Enterococcus faecium* keine Unterschiede zeigten. Diese detektierten Unterschiede könnten durch Umgruppierungen im Genom, beispielsweise bei Plasmiden verursacht werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Mobilität kleiner nichtkodierender Insertionssequenzen wie den EFAR (*Enterococcus*

*faecalis/faecium* repeats) (deGregorio et al. 2009). Sie übernehmen möglicherweise eine funktionelle Rolle, indem sie Sekundärstrukturen wie Haarnadeln bilden und auf diese Weise den Abbau der mRNA modulieren können (deGregorio et al. 2006). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verstärkte Stresstoleranz von *Enterococcus faecium*, insbesondere bei osmotischem Stress, von den Ergebnissen der Untersuchung des DNA-Gehalts lebender und toter Zellen bei Stressexposition untermauert wurde (siehe Kapitel 4.2). Bei diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass *Enterococcus faecalis* ein Übergang in ein VBNC-Stadium als Stressadaptation zeigte, wohingegen bei *Enterococcus faecium* diese Form der Stressantwort nicht nachgewiesen werden konnte.

### B) Amplifikation mittels Adapter

Als eine weitere Option der Amplifikation von cDNA und anschließender Identifizierung molekularer Fingerprints wurden verschiedene Oligonukleotide an einzelsträngige Nukleinsäuren angebunden und anschließend mit Hilfe der komplementären Primer amplifiziert. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 4.3 dargestellt.



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung der Amplifikation mittels Adapter.

Dieses Verfahren führt zu einer Vervielfältigung aller vorhandenen Nukleinsäure-Moleküle. Aufgrund dieser Basis ließen sich die Gesamt-RNA-Isolate miteinander vergleichen. Das Verhältnis von ribosomaler RNA und mRNA, die für Transkriptomanalysen herangezogen wird, aber nur etwa 5% der Gesamt-RNA ausmacht, wurde nicht verändert. Als Adapter wurden sowohl definierte Oligonukleotide als auch einzelne Nukleotide verwendet. Das Anbinden erfolgte durch verschiedene Enzyme wie die terminale Transferase und die T4 RNA Ligase (Troutt et al. 1992), die in der Lage ist, definierte Primersequenzen anzukoppeln und so dafür sorgen, dass sich die Nukleinsäure-Moleküle nicht in ihrer Länge unterscheiden. Diese Modifikation bietet - im Gegensatz zum Anbinden einzelner Nukleotide

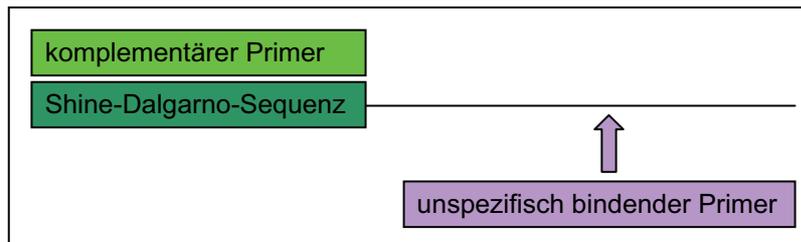
mit der terminalen Transferase - den Vorteil der definierten Enden der flankierten cDNA. Nach der PCR liegen bei den Nukleinsäuren nur Fragmente der gleichen Größe vor, da nur adapterspezifische Primer verwendet wurden. Eine Bande entspricht somit einer Nukleinsäure-Sequenz, wodurch eine Fingerprint-Technik vorliegt. Allerdings ist das Ankoppeln definierter Primersequenzen deutlich zeit- und kostenintensiver als die Modifikation mit einzelnen Nukleotiden durch die terminale Transferase.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die isolierte Gesamt-RNA von Bakterien, die in nährstoffarmem Leitungswasser inkubiert wurden, modifiziert und die cDNA amplifiziert werden. Im Laufe der Stresssituation waren sowohl zunehmende als auch abnehmende Banden zu erkennen. Somit konnten schon auf der Ebene der Gesamt-RNA Unterschiede durch exogene Stimuli sichtbar gemacht werden. Besonders interessant wird diese Methode in Verbindung mit der *in vivo*-Markierung und Separation von RNA mit Hilfe funktionalisierter Magnetpartikel, wodurch es zu einer Amplifikation ausschließlich der momentan exprimierten RNA kommt. Dadurch ist es möglich, gezielt Transkriptomanalysen zu betreiben und eine veränderte Genexpression zu erkennen.

Durch die Versuche konnte außerdem gezeigt werden, dass Primer mit bekannter Sequenz an Nukleinsäure-Moleküle gekoppelt werden können. Dies bietet die Möglichkeit, Schnittstellen für Restriktionsenzyme in Primer-Sequenzen einzubauen, um die von bekannten Sequenzen flankierte DNA klonieren zu können und eine Nukleinsäure-Bibliothek zu erstellen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht bei der substraktiven suppressiven Hybridisierung. Dieses Screeningverfahren eignet sich zur Identifikation differentiell exprimierter Gene (Diatchenko et al. 1996).

### **C) Amplifikation mittels degenerierter und unspezifisch bindender Primer**

Eine dritte Möglichkeit war die Verwendung degenerierter Primer, die an die Shine-Dalgarno-Sequenz binden, in Verbindung mit kurzen, unspezifisch bindenden Primern für die Amplifikation der cDNA. Abbildung 4.4 zeigt schematisch den Ablauf dieser Amplifikation. Prokaryotische mRNA besitzen normalerweise am 5'-Ende eine so genannte Shine-Dalgarno-Sequenz, mit deren Hilfe es möglich ist, prokaryotische Gene direkt durch einen korrespondierenden Primer zu amplifizieren (Ping et al. 2008).



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung der Amplifikation mittels degenerierter Primer.

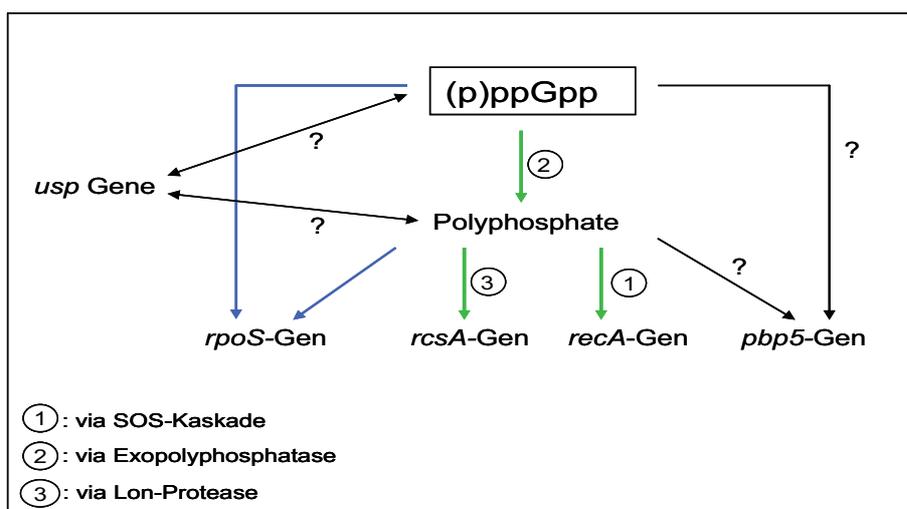
Es konnten bei der Verwendung dieser Methode Unterschiede bei dem Gram-positiven Bakterium *Enterococcus faecium* nach osmotischem Stress gezeigt werden, die allerdings nur hier auftraten und sehr schwach ausgeprägt waren. Eine Sequenzierung ergab, dass es sich bei den abweichenden Banden um ribosomale RNA (rRNA) handelte. Aus diesen Gründen scheint sich diese Methode nicht zur Verwendung bei anderen Bakterien oder zur Identifizierung weiterer stressregulierter Gene zu eignen. 80% der Gesamt-RNA bestehen aus rRNA, die sehr stabil ist und auch 48 h nach Abtötung der Zellen nachgewiesen werden kann (McKillip et al. 1998), während mRNA lediglich eine Halbwertszeit von wenigen Minuten aufweist, was eine Erklärung für das Vorhandensein der rRNA darstellen könnte.

Auch eine zuvor durchgeführte Separation der Gesamt-RNA in rRNA und mRNA mittels Capture-Hybridisierungsaufreinigung führte zu keinem anderen Ergebnis. Die Verwendung eines zur Shine-Dalgarno-Sequenz korrespondierenden Primers wurde bereits zur Analyse von Fingerprints benutzt (Cuny und Witte 1996; Netto dos Santos et al. 2001). Diese Untersuchungen beschränkten sich aber meist auf eine Bakterienart und somit konnte ein genspezifischer Primer, statt den in dieser Arbeit verwendeten, unspezifisch bindenden Primern, eingesetzt werden. Zusätzlich wurde bei diesen Analysen oft DNA als Ausgangssubstanz benutzt. Dies könnten Gründe sein, warum in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen „gestressten“ und „ungestressten“ Bakterien gefunden wurden. Es gibt Untersuchungen über die Verwendung eines Shine-Dalgarno-Primers in Verbindung mit der RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR), allerdings musste hier eine zeitaufwändige Optimierungsphase vorgeschaltet werden (Fleming et al. 1998).

Die beiden letztgenannten Methoden der Amplifikation einzelsträngiger Nucleinsäure-Moleküle eignen sich nur bedingt für eine schnelle und exakte Bewertung unterschiedlicher physiologischer Stadien, wie sie nach Stressexposition auftreten. Die festgestellten Unterschiede sind einerseits nicht sehr deutlich sichtbar, zum anderen ist besonders die zweite Methode zu teuer und langwierig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in die Adaptation von Mikroorganismen an verschiedene Stressoren eine Vielzahl von Genen involviert ist, deren Produkte sowohl verstärkt als auch vermindert einen Nutzen für die Zelle darstellen. Mit den in dieser Arbeit verwendeten molekularen und mikrobiologischen Nachweissystemen konnte bei ausgewählten, speziesspezifischen und universellen Genen gezeigt werden, dass sie stressreguliert sind, wobei Bakterien innerhalb einer Gattung eine unterschiedliche Regulation aufwiesen. Dabei scheinen die *usp*-homologen Gene sich als universelle Stressmarker zu eignen. Abhängig von ihrem natürlichen Habitat unterscheiden sich Mikroorganismen signifikant in ihrer Anpassungsfähigkeit und den daraus resultierenden Stressantworten, beispielsweise dem VBNC-Stadium. Die untersuchten Methoden zur Detektion physiologischer Stadien als Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen stellen die Grundlage zur Bewertung und zum besseren Verständnis bakterieller Stressantworten dar.

Die Regulation speziesspezifischer Gene, aber auch Masterregulatoren, wird oft durch (p)ppGpp gesteuert. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 4.5 angegeben. Dabei kann (p)ppGpp über verschiedene Proteine wirken und wird auch als Schlüsselregulator bezeichnet. Aufgrund der in dieser Arbeit festgestellten universellen Einsatzmöglichkeit der *usp*-Gene als Stressmarker und der Koregulation dieser Gene mit speziesspezifischen Genen, stellt sich die Frage, inwieweit diese an der Regulation, analog zu (p)ppGpp, bei verschiedenen Stressantworten beteiligt sind. Diese Fragestellung lässt sich durch weiterführende Arbeiten mit Defizit-Mutanten beantworten.



**Abb. 4.5:** Regulationsschema ausgewählter stressrelevanter Gene.



## 5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit der Forschung auf dem Gebiet der Stressadaptation bei Bakterien. Besonders im Hinblick auf die möglichen Gefahren für den Menschen und die hohen Kosten in technischen Bereichen, sollten Anpassungsstrategien von Mikroorganismen, wie die Biofilmbildung oder das VBNC-Stadium, genauer untersucht werden. Ziel ist es, verschiedene physiologische Stadien erkennen und analysieren zu können, um bakterielle Populationen gezielt zu manipulieren.

- Die in dieser Arbeit etablierte Methode der Amplifikation von cDNA und DNA mit Hilfe der RAPD-PCR zur Detektion physiologischer Stadien muss auf bakterielle Mischkulturen übertragen werden.
- Die Vervielfältigung prokaryotischer cDNA mittels Adaptern muss in Verbindung mit der Separation von RNA untersucht werden, um neue stressregulierte Gene zu identifizieren und weitere Fingerprint-Methoden zu generieren.
- Es ist notwendig, mehr Daten über möglicherweise universelle bakterielle Stressmarker, wie das *usp*-Gen, zu sammeln und mit speziesspezifischen, stressregulierten Faktoren zu vergleichen, um möglicherweise einen Bakterienspezies-unabhängigen Stressmarker zu finden.
- Eine Beteiligung der *usp*-Gene bei der Regulation von Stressantworten sollte näher untersucht werden.
- Die Untersuchungen der Bedingungen, die Bakterien befähigen, sich vor Umwelteinflüssen durch den Übergang in das VBNC-Stadium zu schützen, müssen weiter intensiviert werden.



## 6 Literaturverzeichnis

Abschlussbericht: Untersuchung der Wasserqualität von Bodensee und Baikalsee. Teilprojekt 02WT0488 und 02WT 0489, S.73.

Bundesministerium für Bildung und Forschung

Aertsen, A., Michiels, C. W. 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Critical Reviews in Microbiology* 30 (4): 263-273

Ahmad, M., Smith, D. G., Mahboob, S. 2002. Effect of Heat Treatment on Stationary Phase Cells of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*.

*International Journal of Agriculture and Biology* 4 (2): 234-236

Albertson, N. H., Nyström, T. 1994. Effects of starvation for exogenous carbon on functional mRNA stability and rate of peptide chain elongation in *Escherichia coli*.

*FEMS Microbiology Letters* 117 (2): 181-187

Amel, B. K.-N., Amine, B., Amina, B. 2008. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions.

*Microbiological Research* 163 (3): 323-328

Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J. E. et al. 2004. Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*.

*Journal of Bacteriology* 186 (5): 1221-1228

Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S.-I., Okada, Y., Yamamoto, S., Igimi, S. 2007. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state

*Environmental Microbiology* 9 (4): 869-879

Asakura, H., Kawamota, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S., Makino, S. 2008. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state.

*Research in Microbiology* 159 (9-10): 709-717

Atkinson, D. E. 1979. Limitation of metabolic concentration and the conservation of solvent capacity in the living cell. P. 29-43, In B. L. Horecker and E. R. Stadtman (ed), *Current topics in cellular regulation*, vol 1. Academic Press, Inc., New York

Balaji, B., O'Connor, K., Lucas, J. R., Anderson, J. M., Csonka L. N. 2005. Timing of Induction of Osmotically Controlled Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, Determined with Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR.

*Applied And Environmental Microbiology* 71 (12): 8273-8283

Bandara, A. B., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Prasad, R., Boyle, S. M. 2008. The putative penicillin-binding proteins 1 and 2 are important for viability, growth and cell morphology of *Brucella melitensis*.

*Veterinary Microbiology* 133 (4): 387-393

Banning, N., Toze, S., Mee, B. J. 2003. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system.

*Microbiology* 149 (Pt 1): 47-55

- Barer, M. R., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Kell, D. B. 1998. Microbial stress and culturability: conceptual and operational domains. *Microbiology- Uk* 144: 2009-2010
- Barer, M. R., Harwood, C. 1999. Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology* 41: 93-137
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C., Eddy, S. R. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 32, D138-D141
- Bearson, S. M. D., Benjamin Jr., W. H., Swords, W. E., Foster, J. W. 1996. Acid shock induction of RpoS is mediated by mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 178 (9): 2572-2579
- Bearson, B. L., Wilson, L., Foster, J. W. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of Bacteriology* 180 (9): 2409-2417
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. and Ghigo, J. M. 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology* 51 (3): 659-674
- Ben Kahla-Nakbi, A., Besbes, A., Chaieb, K., Rouabhia, M., Bakhrouf, A. 2007. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. *Marine Environmental Research* 64 (4): 469-478
- Bereswill, S., Geider, K. 1997. Characterization of the *rscB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide and virulence of the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology* 179 (4): 1354-1361
- Beyeler, W., Rogers, P. L., Fiechter, A. 1984. A simple technique for the direct determination of maintenance energy coefficient: An example with *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19: 277-280
- Birch, L., Dawson, C. E., Cornett, J. H., Keer, J. T. 2001. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Letters of Applied Microbiology* 33 (4): 296-301
- Bishop, R. E., Leskiw, B. K., Hodges, R. S., Kay, C. M., Weiner, J. H. 1998. The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *Journal of Molecular Biology* 280 (4): 583-596
- Bjedov, I., Tenailon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., Matic, I. 2003. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* 300 (5624): 1404-1409
- Bjergbaek, L. A., Roslev, P. 2005. Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* 99 (5): 1090-1098

- Boes, N., Schreiber, K., Härtig, E., Jaensch, L., Schobert, M. 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* universal stress protein PA4352 is essential for surviving anaerobic energy stress.  
Journal of Bacteriology 188 (18): 6529-6538
- Boes, N., Schreiber, Schobert, M. 2008. SpoT-Triggered Stringent Response Controls *usp* Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*.  
Journal of Bacteriology 190 (21): 7189-7199
- Bogosian, G., Bourneuf, E. V. 2001. A matter of bacterial life and death.  
EMBO reports 2 (9): 770-774
- Bolen, D. W. 2001. Protein stabilization by naturally occurring osmolytes.  
Methods in Molecular Biology 168: 17-36
- Booth, I. R., Louis, P. 1999. Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*.  
Current Opinion in Microbiology 2 (2): 166-169
- Born, P., Breukink, E., Vollmer, W. 2006. In vitro synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*.  
Journal of Biological Chemistry 281 (37): 26985-26993
- Botero, L. M., D'Imperio, S., Burr, M., McDermott, T. R., Young, M., Hassett, D. J. 2005. Poly(A) polymerase modification and reverse transcriptase PCR amplification of environmental RNA.  
Applied and Environmental Microbiology 71 (3): 1267-1275
- Boulangier, A., Francez-Charlot, A., Conter, A., Castanie-Cornet, M.-P., Cam, K., Gutierrez, C. 2005. Multistress regulation in *Escherichia coli*: Expression of *osmB* involves two independent promoters responding either to  $\sigma$ S or to the RcsCDB His-Asp phosphorelay.  
Journal of Bacteriology 187 (9): 3282-3286
- Bougdour, A., Gottesman, S. 2007. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 104 (31):12896-12901
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Kjelleberg, S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms.  
Applied and Environmental Microbiology 72 (6): 3916-3923
- Castanie-Cornet, M.-P., Treffandier, H., Francez-Charlot, A., Gutierrez, C., Cam, K. 2007. The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF.  
Microbiology 153 (Pt1): 238-246
- Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Grim, C., Mangel, T., Huq, A., Colwell, R. R. 2007. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*.  
Environmental Microbiology 9 (2): 393-402
- Chamot, D., Magee, W. C., Yu, E., Owttrim, G.W. 1999. A cold shock induced cyanobacterial RNA helicase.  
Journal of Bacteriology 181 (6): 1728-1732

- Chen, G., Patten, C. L., Schellhorn, H. E. 2004. Positive selection for loss of RpoS function in *Escherichia coli*.  
Mutation Research 554 (1-2): 193-203
- Chen, J. 2007. UspA of *Shigella sonnei*.  
Journal of Food Protection: 70 (10): 2392-2395
- Chen, S. Y., Jane, W. N., Chen, Y. S., Wong, H. C. 2009. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses.  
International Journal of Food Microbiology 129 (2):157-165
- Cheung, V. G., Nelson, S. F. 1996. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 93 (25): 14676-14679
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDoonald, R. J., Ruttler, W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.  
Biochemistry 18 (24): 5294-5299
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., Ames, B. N. 1985. Positive control of a regulon for defense against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*.  
Cell 41 (3): 753-762
- Clements, M. O., Foster, S. J. 1998. Starvation recovery of *Staphylococcus aureus* 8325-4.  
Microbiology 144 (Pt 7): 1755-1763
- Cochran, W L., Suh, S. J., McFeters, G. A., Stewart, P. S. 2000. Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine.  
Journal of Applied Microbiology 88 (3): 546-553
- Coleman, M., Pearce, R., Hitchin, E., Busfield, F., Mansfield, J. W., and Roberts, I. S.1990. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the rcsA gene of *Erwinia amylovora*, encoding a positive regulator of capsule expression: evidence for a family of related capsule activator proteins.  
Journal of General Microbiology 136 (9), 1799-1806.
- Collet, A., Cosette, P. Beloin, C., Ghigo, J. M., Rihouey, C., Lerouge, P, Junter, G. A., Jouenne, T. 2008. Impact of rpoS deletion on the proteome of *Escherichia coli* grown planktonically and as biofilm.  
Journal of proteome research 7(11): 4659-4669
- Colwell, R. R. 1996. Global climate and infectious disease: the colera paradigm.  
Science 274 (5295): 2025-2031
- Colwell, R. R. 2000. Bacterial death revisited.  
Colwell, R. R., Gimes, D. J. (ed.) Nonculturable microorganisms in the environment. Pp 325-342. ASM Press Washington
- Condon, C., Putzer, H., Grunberg-Manago, M. 1996. Processing of the leader mRNA plays a major role in the induction of thrS expression following threonine starvation in *Bacillus subtilis*.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 93 (14): 6992-6997

- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G., Ross, R. P. 2008. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated.  
Current pharmaceutical design 14 (14): 1382-1399
- Cosma, C. L., Danese, P. N., Carlson, J. H., Silhavy, T. J., Snyder, W. B. 1995. Mutational activation of the Cpx two-component signal transduction pathway in *Escherichia coli* suppresses envelope associated stresses.  
Molecular Microbiology 18 (3): 491-505
- Costerton, J. W., Cheng, K.-J., Geesey, G. G, Ladd, T. I., Nickel J. C, Dasgupta, M., Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease.  
Annual Review of Microbiology 41: 435-464
- Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress.  
Microbiological Reviews 53 (1): 121-147
- Csonka, L. N., Hanson, A. D. 1991. Prokaryotic Osmoregulation: genetics and physiology  
Annual Review of Microbiology 45: 569-606
- Cuny, C., Witte, W. 1996. Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR for DNA sequences flanked by transposon Tn916 target region and ribosomal binding site.  
Journal of Clinical Microbiology 34 (6): 1502-1505
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture.  
Journal of Bacteriology 182 (12): 3593-3596
- Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C., Cam, K. 2001. Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rcsB-rcsC* in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 183 (20): 5870-5876
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.  
Science 280 (5361): 295-298
- Dawson, M. P., Humphrey, B. A., Marshall, K. C. 1981. Adhesion: a tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation.  
Current Microbiology 6: 195-199
- De Gregorio, E., Bertocco, T., Silvestro, G., Carlomagno, M. S., Zarrilli, R., Di Nocera, P. P. 2009. Structural organization of a complex family of palindromic repeats in Enterococci.  
FEMS Microbiology Letters 292 (1): 7-12
- De Gregorio, E., Silvestro, G., Venditti, R., Carlomagno, M. S, Di Nocera, P. P. 2006. Structural organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences in *Yersinia*.  
Journal of Bacteriology 188 (22): 7876-7884
- del Giorgio, P. A., Cole, J. J. 1998. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems.  
Annual Review of Ecology and Systematics 29: 503-541
- Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H., Nyström, T. 2003. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and nonculturable *Escherichia coli* cells.  
EMBO reports 4 (4): 400-404

- Deutscher, M. P. 2009. Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 85: 369-391
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93 (12): 6025-6030
- Diez, A., Gustavsson, N., Nyström, T. 2000. The universal stress protein A of *Escherichia coli* is required for resistance to DNA damaging agents and is regulated by a RecA/FtsK-dependent regulatory pathway. *Molecular Microbiology* 36 (6):1494-1503
- Drews, A., Kraume, M. 2007. On maintenance models in severely and long-term limited membrane bioreactor cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (5): 892-903
- Dunaev, T., Alanya, S., Duran, M. 2008. Use of RNA-based genotypic approaches for quantification of viable but non-culturable *Salmonella sp.* in biosolids. *Water Science and Technology* 58 (9): 1823-1828
- Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R. Jin, D. J. 2008. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190 (3): 1084-1096
- Ebel, W., Trempy, J. E. 1999. *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. *Journal of Bacteriology* 181 (2): 577-584
- Edwards, J. B., Delort, J., Mallet J. 1991. Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Research* 19 (19): 5227-5232
- Egger, L. A., Park, H., Inouye, M. 1997. Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* 2 (3): 167-184
- Egli, T. 1995. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Advances in Microbial Ecology* 14: 305-386
- el Kharroubi, A., Piras, G., Jacques, P., Szabo, I., Van Beeumen, J., Coyette, J., Ghuysen, J. M. 1989. Active-site and membrane topology of the DD-peptidase/penicillin-binding protein no. 6 of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecium*) A.T.C.C. 9790. *Biochemical Journal* 262 (2): 457-462
- el Kharroubi, A., Jacques, P., Piras, G., Van Beeumen, J., Coyette, J., Ghuysen, J. M. 1991. The *Enterococcus hirae* R40 penicillin-binding protein 5 and the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 2 are similar. *Biochemical Journal* 280 (Pt 2): 463-469.

- Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S. M., Krolla-Sidenstein, P., Obst, U. 2004. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration  
Water Research 38 (5): 1197-1206
- England, T. E., Uhlenbeck, O. C. 1978. 3'- terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase.  
Nature 275 (5680): 560-561
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., Schobert, M. 2004. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation.  
Journal of Bacteriology 186 (14): 4596-4604
- Farewell, A., Diez, A. A., Dirusso, C. C., Nyström, T. 1996. Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth phase-dependent expression of the *uspA*, *fad*, and *fab* genes.  
Journal of Bacteriology 178 (22): 6443-6450
- Farewell, A., Kvint, K., Nyström, T. 1998. *uspB*, a new sigmaS-regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol.  
Journal of Bacteriology 180 (23): 6140-6147
- Farewell, A., Kvint, K., Nyström, T. 1998. Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition.  
Molecular Microbiology 29 (4): 1039-1051
- Ferenci, T. 1999a. "Growth of bacterial cultures" 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics.  
Research in Microbiology 150 (7): 431-438
- Ferenci, T. 2007. The spread of a beneficial mutation in experimental bacterial population: the influence of the environment and genotype on the fixation of *rpoS* mutations.  
Heredity 100 (5): 446-452
- Ferrieres, L., Clarke, D. J. 2003. The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface.  
Molecular Microbiology 50 (5): 1665-1682
- Fischer-Le Saux, M., Hervio-Heath, D., Loaec, S., Colwell, R. R., Pommepuy, M. 2002. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater.  
Applied and Environmental Microbiology 68 (11): 5641-5646
- Fleming J. T., Yao, W-H, Sayler, G. 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms.  
Applied and Environmental Microbiology 64 (10): 3698-3706
- Foster, P. L. 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria.  
Mutation Research 569 (1-2): 3-11
- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M. P., Gutierrez, C., Cam., K. 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*.  
Molecular Microbiology 49 (3): 823-832

- Francez-Charlot, A., Castanie-Cornet, M. P., Gutierrez, C., Cam, K. 2005. Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay.  
Journal of Bacteriology 187 (11): 3873-3877
- Franchini, A. G. 2006 Physiology and fitness of *Escherichia coli* during growth in carbon-excess and carbon-limited environments.  
Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
- Freeman, C., Lock, M. A. 1995. The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply?  
Limnology and Oceanography 40: 273-278
- Fuqua, C., Greenberg, E. P. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones.  
Current Opinion in Microbiology 1(2):183-189
- Galinski, E. A., Trüper, H. G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems.  
FEMS Microbiology Reviews 15 (2-3): 95-108
- Gao, H., Yang, Z. K., Gentry, T. J., Wu, L., Schadt, C. W., Zhou, J. 2007. Microarray-based analysis of microbial community RNAs by whole-community RNA amplification.  
Applied and Environmental Microbiology 73 (2): 563-571
- Gawande, P. V., Griffiths, M. W. 2005. Effects of environmental stresses on the activities of the *uspA*, *grpE* and *rpoS* promoters of *Escherichia coli* O157:H7.  
International Journal of Food Microbiology 99 (1): 91-98
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W. 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*-- a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology.  
Water Science and Technology 43 (6): 159-167
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., Cashel, M. 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp.  
Journal of Bacteriology 175 (24): 7982-7989
- Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms.  
Molecular Microbiology 43 (6): 1367-1378
- Goffin, C., Ghuyssen, J. M. 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs  
Microbiology and Molecular Biological Reviews 62 (4): 1079-1093
- Goldstein, J., Pollitt, N. S., Inouye, M. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 87 (1): 283-287
- Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C. V., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco, B. D. G. M., De Martinis, E. C. P. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods.  
Food Microbiology 25 (5): 668-675
- Gonzalez-Escalona, N., Fey, A., Höfle, M. G., Espejo, R. T., Guzman, C. A. 2006. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock.  
Environmental Microbiology 8 (4): 658-666

- Gonzalez-Flecha, B., Demple, B. 1995. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*.  
The Journal of Biological Chemistry 270 (23): 13681-13687
- Gort, A. S., Ferber, D. M., Imlay, J. A. 1999. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*.  
Molecular Microbiology 32 (1): 179-191
- Gottesman, S., Trisler, P., and Torres-Cabassa, A. 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes.  
Journal of Bacteriology 162 (3): 1111-1119
- Grey, B., Steck, T. R. 2001. Concentrations of copper thought to be toxic to *E. coli* can induce the viable but non-culturable condition.  
Applied and Environmental Microbiology 67 (11): 5325-5327
- Griffith, R. P., Haight, R. D. 1973. Reversible heat-injury in the marine psychrophilic bacterium *Vibrio marinus* MP1.  
Canadian Journal of Microbiology 19: 557-561
- Guest, J. R., Green, J., Irvine, A. S., Spiro, S. 1996. The FNR modulon and FNR-regulated gene expression, p. 317-342.  
In Lin, E. C. C., Lynch, A. S. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. R. G. Landes Company, Austin, Texas
- Gustavsson, N., A. Diez, Nyström, T. 2002. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage.  
Molecular Microbiology 43 (1): 107-117
- Hacker, J., Hentschel, U., Dobrindt, U. 2003. Prokaryotic chromosomes and disease.  
Science 301 (5634): 790-793
- Hagege, J. M., Cohen, S. N. 1997. A developmentally regulated Streptomyces endoribonuclease resembles Ribonuclease E of *Escherichia coli*.  
Molecular Microbiology 25 (6): 1077-1090
- Hecker, M., Schumann, W., Volker, U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*.  
Molecular Microbiology 19 (3): 417-428
- Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T., Jung, K. 2009. The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress.  
Journal of Molecular Biology 386 (1): 134-148
- Heim, S., Lleo, M. M., Bonato, B., Guzman, C. A., Canepari, P. 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteom analysis.  
Journal of Bacteriology 184 (23): 6739-6745
- Hendrick, J. P., Hartl, F.-U. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins.  
Annual Review of Biochemistry 62: 349-384

- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., Boss, W. 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 173 (24): 7918-7924
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N., Fischer, D. 1993. Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 175 (1): 259-265
- Hengge-Aronis, R. 1996. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*.  
Molecular Microbiology 21 (5): 887-893
- Hengge-Aronis, R. 2002a. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*.  
Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 4 (3): 341-346
- Hengge-Aronis, R. 2002b. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma$  (RpoS) subunit of RNA polymerase.  
Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 (3): 373-395
- Hengge, R. 2008. The two-component network and the general stress sigma factor RpoS ( $\sigma$  S) in *Escherichia coli*.  
Advances in experimental medicine and biology 631: 40-53
- Hersh, M. N., Ponder, R. G., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. 2004. Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*: two pathways of genome adaptation under stress.  
Research in Microbiology 155 (5): 352-359
- Heuveling, J., Possling, A., Hengge, R. 2008. A role for Lon protease in the control of the acid resistance genes of *Escherichia coli*.  
Molecular Microbiology: 69 (2): 534-547
- Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M. R., Tolker-Nielsen, T, Givskov, M., Molin, S. 2002. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression.  
Journal of Applied and Environmental Microbiology 68 (4): 2008-2017
- Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., Yamaguchi, A. 2003. Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*.  
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52 (4): 576-582
- Höltje, J.-V. 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*.  
Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 (1): 181-203
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A. M., Eberl, L., Heesemann, J. 2004. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS.  
Microbiology 150 (Pt 4): 843-851
- Holland, A-M., Rather, P. N. 2008. Evidence for extracellular control of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*.  
FEMS Microbiology Letters 286 (1): 50-59

- Horwitz, M. A., Silverstein, S. C. 1980. Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *The Journal of clinical Investigation* 65 (1), 82-94
- Hoyle, B. D., Costerton, W. J. 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research* 37: 91-105
- Huq, A., I. N. G. Rivera, Colwell, R. R. 2000. Epidemiological significance of viable but nonculturable microorganisms  
S. 301-323. In R. R. Colwell and D. J. Grimes (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press, Washington DC
- Imhoff, J. F. 1986. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 39: 57-66
- Ionescu, M., Belkin, S. 2009. Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K12 *rpoS* mutant in response to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (2): 483-492
- Ishii, S., Sadowsky, M. J. 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology* 11 (4): 733-740
- Iuchi, S., Lin, E. C. C. 1995. Signal transduction in the Arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes, p. 223-231.  
In Hoch, J. A., Silhavey, T. J. *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington, D. C.
- Jiang, W., Hou, Y., Inouye, M. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1): 196-202
- Jiang, X., Chai, T.-J. 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Applied and Environment Microbiology* 62 (4): 1300-1305
- Jishage, M., Iwata, A., Ueda, S., Ishihama, A. 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *Journal of Bacteriology* 178 (18): 5447-5451
- Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., Inouye, M. 1996. Cold shock induces a major ribosomal associated protein that unwinds double stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 93 (1): 76-80
- Jorgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P., Stewart, G.S. 1999. RpoS dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 (Pt 4): 835-844
- Josephson, K. L., Gerba, C. P. Pepper, I. L. 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (10): 3513-3515
- Jungfer, C., Schwartz, T., Obst, U. 2007. UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Research* 41 (1): 188-196

- Kabir, M., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H., Tsunedomi, R., Yamada, M. 2004. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150 (Pt 8): 2543-2553
- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Barer, M. R. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73 (2): 169-187
- Kelm, O., Kiecker, C., Geider, K., Bernhard, F. 1997. Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylovoran biosynthesis in *Erwinia amylovora*. *Molecular and General Genetics* 256 (1): 72-83
- Kempf, B., Bremer, E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high-osmolarity environments. *Archives of Microbiology* 170 (5): 319-330
- Kiley, P. J., Beinert, H. 1998. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the ironsulfur cluster. *FEMS Microbiology Reviews* 22 (5): 341-352
- Kim, H. J., Yang, K. Y., Cho, B. H., Kim, K. Y., Lee, M. C., Kim, Y. H., Anderson, A. J., Kim, Y. C. 2007. Transcript accumulation from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor in *Pseudomonas chlororaphis* strain 06 is regulated by the polyphosphate kinase gene. *Current Microbiology* 54: 219-223
- King, T., Seeto, S., Ferenci, T. 2006. Genotype-by-Environment Interactions Influencing the Emergence of *rpoS* Mutations in *Escherichia coli* Populations. *Genetics* 172 (4): 2071-2079
- Kinoshita, Y., Nishigaki, K., Husimi, Y. 1997. Fluorescence-, isotope- or biotin- labelling of the 5'-end of single-stranded DNA/ RNA using T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Research* 25 (18): 3747-3748
- Kjelleberg, S., Flårdh, K. B. G., Nyström, T., Moriarty, D. J. 1993. Growth limitation and starvation of bacteria, S. 289-320. *In* T. E. Ford (ed.), *Aquatic microbiology - an ecological approach*. Blackwell Scientific Publication, Boston.
- Kjelleberg, S., Molin, S. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology* 5 (3): 254-258
- Klauck, E., Typas, A., Hengge, R. 2007. The  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Science Progress* 90 (Pt 2-3): 103-127
- Kobayashi, H., Murakami, N., Unemoto, T. 1982. Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (22): 13246-13252
- Kojic, M., Degrassi, G., Venturi, V. 1999. Cloning and characterisation of the *rpoS* gene from plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358: RpoS is not involved in siderophore and homoserine lactone production. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489 (2-3): 413-420

- Kolter, R., Siegele, D. A., Tormo, A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology* 47: 855-874
- Kolter, R. 1999. Growth in studying the cessation of growth. *Journal of Bacteriology* 181 (3): 697-699
- Kort, R., Keijser, B. J., Caspers, M. P. M., Schuren, F. H., Montijn, R. 2008. Transcriptional activity around bacterial cell death reveals molecular biomarkers for cell viability. *BMC Genomics* 9 (1): 590
- Kroll, R. G., Booth, I. R. 1983. The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry* 216 (3): 706-719
- Krüger, A., Padola, N. L., Parma, A. E., Lucchesi, P. M. A. 2006. Intraserotype diversity among Argentinian verocytotoxigenic *Escherichia coli* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Medical Microbiology* 55 (Pt 5): 545-549
- Kühn, I., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M. A., Dominguez, L., Herrero, I. A., Möllby, R. 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment--a European study. *International Journal of Food Microbiology* 88 (2-3): 133-145
- Kumar, A. S., Mody, K., Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides--a perception. *Journal of Basic Microbiology* 47 (2): 103-117
- Kuroda, A., Nomura, K., Takiguchi, N., Kato, J., Ohtake, H. 2006. Inorganic polyphosphate stimulates Ion-mediated proteolysis of nucleoid proteins in *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 52 (4): 23-29
- Kuroda, M., Tanka, Y., Aoki, R., Shu, D., Tsumoto, K., Ohta, T. 2008. *Staphylococcus aureus* giant protein Ehb is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. *Biochemical and biophysical research communications*: 374 (2): 237-241
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q., Leibler, S. 2005. Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments *Genetics* 169 (4): 1807-1814
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., Nyström, T. 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology* 6 (2): 140-145
- Kwiatkowska, J., Matuszewska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Laskowska, E. 2008. Aggregation of *Escherichia coli* proteins during stationary phase depends on glucose and oxygen availability. *Research in Microbiology* 159 (910): 651-657
- Lahtinen, S. J., Ahokoski, H., Reinikainen, J. P., Gueimonde, M., Nurmi, J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J. 2008. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 46 (6): 693-698

- Lan, L., Deng, X., Xiao, Y., Zhou, J. M., Tang, X. 2007. Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Molecular plant-microbe interaction* 20 (6): 682-696
- Lange, R., Hengge-Aronis, R. 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 5 (1): 49-59
- Lange, R., Hengge-Aronis, R. 1994. The cellular concentration of the  $\sigma$ S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes and Development* 8 (13): 1600-1612
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology* 21 (6): 1137-1146
- Laubacher, M. E., Ades, S. E. 2008 The Rcs Phosphorelay Is a Cell Envelope Stress Response Activated by Peptidoglycan Stress and Contributes to Intrinsic Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology* 190 (6): 2065-2074
- Le Breton, Y., Muller, C., Auffray, Y., Rince, A. 2007. New Insights into the *Enterococcus faecalis* CroRS Two-Component System Obtained Using a Differential-Display Random Arbitrarily Primed PCR Approach. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (11): 3738-3741
- Lee, I. S., Lin, J., Hall, H. K., Bearson B., Foster, J. W. 1995. The stationary-phase sigma factor  $\sigma$ S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 17 (1): 155-167
- Leriche, V., Briandet, R., Carpentier, B. 2003. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology* 5 (1): 64-71
- Li, T. W., Weeks, K. M. 2006. Structure-independent and quantitative ligation of single-stranded DNA. *Analytical Biochemistry* 349 (2): 242-246
- Lin, Y. H., Miyamoto, C., Meighen, E. A. 2002. Cloning, sequencing, and functional studies of the *rpoS* gene from *Vibrio harveyi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (1): 456-462
- Liu, W-T., Karavolos, M. H., Bulmer, D. M., Allaoui, A., Hormaeche, R. D. C. E., Lee, J. J., Khan, C. M. A. 2007. Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microbial Pathogenesis* 42 (1): 2-10
- Liu, X. Q., Ferenci, T. 1998. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180 (15): 3917-3922

- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A., Chatterjee, A. K. 1998. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Molecular Microbiology* 29 (1): 219-234
- Lleo, M. D., Tafi, M. C., Canepari, P. 1998 Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Systematic and Applied Microbiology* 21 (3): 333-339
- Lleo, M. D., Tafi, M. C., Signorotto, C., Dal Cero, C., Canepari, P. 1999. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microbiology Ecology* 30 (4): 345-353
- Lleo, M. M., Pierobon, S., Tafi, M. C., Signorotto, C., Canepari, P. 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10): 4564-4567
- Lleo, M. M., Bonato, B., Tafi, M. C., Signoretto, C., Pruzzo, C., Canepari P. 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but nonculturable state. *Journal of Applied Microbiology* 91 (6): 1095-1102
- Lleo, M. M., Bonato, B., Benedetti, D., Canepari P. 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 54 (2): 189-196
- Loewen, P. C., Triggs, B. L. 1984. Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 9 (1): 34-39
- Low, E. W., Chase, H. A. 1999. The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment. *Water Research* 33 (3): 847-853
- Luo, S., McNeill, M., Myers, T. G., Hohman, R. J., Levine, R.L. 2008. Lon protease promotes survival of *Escherichia coli* during anaerobic glucose starvation. *Archives of Microbiology* 189 (2): 181-185
- Magnet, S., Dubost, L., Marie, A., Arthur, M., Gutmann, L. 2008. Identification of the L,D-Transpeptidases for Peptidoglycan Cross-Linking in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190 (13): 4782-4785
- Magnusson, L. U., Nyström, T., Farewell, A. 2003. Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *Journal of Biological Chemistry* 278 (2): 968-973
- Magnusson, L. U., Farewell, A., Nyström, T. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* 13 (5): 236-242
- Mah, T. F., O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9 (1): 34-39

- Majdalani, N., Gottesman, S. 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system.  
Annual Review of Microbiology 59: 379-405
- Majdalani, N., Gottesman, S. 2007. Genetic dissection of signaling through the Rcs phosphorelay.  
Methods in Enzymology 423: 349-362
- Mandel, M. J., Silhavy, T. J. 2005. Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability.  
Journal of Bacteriology 187 (2): 434-442
- Manos, J., Arthur, J., Rose, B., Bell, S., Tingpej, P., Hu, H., Webb, J., Kjelleberg, S., Gorrell, M. D., Bye, P., Harbour, C. 2009. Gene expression characteristics of a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm and planktonic growth.  
FEMS Microbiology Letters 292 (1): 107-114
- Mascher, F., Hase, C., Moenne-Loccoz, Y., Defago, G. 2000. The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil.  
Applied and Environmental Microbiology 66 (4): 1662-1667
- Mason, C. A., Hamer, G., Bryers, J. D. 1986. The death and lysis of microorganisms in environmental processes.  
FEMS Microbiology Reviews 39: 373-401
- Matic I, Taddei F, Radman M. 2004. Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress.  
Research in Microbiology 155 (5): 337-41
- Matin, A., Auger, E. A., Blum, P. H., Schultz, J. E. 1989. Genetic basis of starvation survival in non differentiating bacteria.  
Annual Reviews of Microbiology 43: 293-316
- McCann, M.P., Kidwell, J.P., Matin, A 1991. The putative sigma factor katf has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 173 (13): 4188-4194
- McDougald, D., Gong, L., Srinivasan, S., Hild, E., Thompson, L., Takayama, K., Rice, S. A., Kjelleberg, S. 2002. Defences against oxidative stress during starvation in bacteria  
Antonie van Leeuwenhoek 81 (1-4): 3-13
- McDowall, K. J., Lin-Chao, S., Cohen, S. N. 1994. A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage.  
Journal of Biological Chemistry 269 (14): 10790-10796
- McFeters, G. A., LeChevallier, M. W. 2000. Chemical disinfection and injury of bacteria in water.  
Colwell, R. R., Gimes, D. J. (ed.) Nonculturable microorganisms in the environment. Pp 325-342. ASM Press Washington
- McKillip, J., Jaykus, L-A., Drake, M. 1998. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7.  
Applied and Environmental Microbiology 64 (11): 4264-4268

- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, KH. 1999. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content  
Systematic and applied microbiology 22 (2): 186-196
- Missiakas, D., Raina, S., Georgopoulos, C. 1996. Heat shock regulation, p. 481-501.  
Lin, E. C. C., Lynch, A. S. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. R. G. Landes Company, Austin, Texas
- Molin, S., Givskov, M. 1999. Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity.  
Environmental Microbiology 1 (5): 383-391
- Moreau, P. L. 2004. Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions.  
Journal of Bacteriology 186 (21): 7364-7368
- Morita, R. Y. 1997. Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle.  
Chapman & Hall, New York
- Moxon, E., Kroll, J. 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors.  
Current topics in Microbiology and Immunology 150: 65-85
- Muffler, A., Traulsen, D. D., Lange, R., Hengge-Aronis, R. 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of  $\sigma$ S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 178 (6): 1607-1613
- Muffler, A., Barth, M., Marshall, C., Hengge-Aronis, R. 1997. Heat shock regulation of  $\sigma$ S turnover: A role for DnaK and relationship between stress responses mediated by  $\sigma$ S and s32 in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 179 (2): 445-452
- Muñoz, R., Dowson, C. G., Daniels, M., Coffey, T. J., et al. 1992. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.  
Molecular Microbiology 6 (17): 2461-2465
- Muyzer, G., Wal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.  
Applied and Environmental Microbiology 59 (3): 695-700
- Na, S., Miyanaga, K., Unno, H., Tanji, Y. 2006. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment.  
Applied Microbiology and Biotechnology 72 (2): 386-392
- Nachin, L., Nannmark, U., Nyström, T. 2005. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility.  
Journal of Bacteriology 187 (18): 6265-6272
- Nachin, L., Brive, L., Persson, K-C., Svensson, P., Nyström, T. 2008. Heterodimer Formation within Universal Stress Protein Classes Revealed By an In Silico and Experimental Approach  
Journal of Molecular Biology 380 (2): 340-350

- Netto dos Santos, K. R., de Souza Fonseca, L., Martins Teixeira, L., Pinto Gontijo Filho, P. 2001. Typing of *Staphylococcus aureus* from surgical site infections: comparison of pulsed-field gelelectrophoresis (PFGE) and PCR technique using repetitive extragenic palindromic (rep) and Tn916-Shine–Dalgarno (TnSD) target sequences. *International Journal of Medical Microbiology* 291 (3): 231-236
- Nielsen, T. H., Sjøholm, O. R., Sørensen, J. 2009. Multiple physiological states of a *Pseudomonas fluorescens* DR54 biocontrol inoculant monitored by a new flow cytometry protocol. *FEMS Microbiology Ecology* 67 (3): 479-490
- Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K. 2006. Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67 (2): 310-320
- Nocker, A., Sossa, K., Camper, A. K. 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70 (2): 252-260
- Nocker, A., Camper, A. 2009. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiology Letters* 291: 137-142
- Notley, L., Ferenci, T. 1996. Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: What level of nutrient limitation induces the stationary-phase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178 (5): 1465-1468
- Nyström, T., Neidhardt, F. C. 1992. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6 (21): 3187-3198
- Nyström, T., Neidhardt, F. C. 1993. Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. *Journal of Bacteriology* 175 (13): 3949-3956
- Nyström, T., Neidhardt, F. C. 1994. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology* 11(3): 537-544
- Nyström, T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology*, 176 (3): 159-164
- Ohsaki, Y., Tachibana, M., Awaya, T., Kuroki, M., Itoh, Y. 2008. Recovery of susceptibility to penicillin G in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* despite increased accumulation of *pbp* gene alterations. *International Journal of Antimicrobial Agents*: 32 (5): 427-431
- Ohtomo, R., Saito, M. 2001. Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: Possible implication for resuscitation from the VBNC state. *Microbial Ecology* 42 (2): 208- 214

- Olive, D. M., Bean, P. 1999. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms.  
*Journal of Clinical Microbiology* 37 (6): 1661-1669
- Oliver, J. D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria.  
Colwell, R. R., Gimes, D. J. (ed.) *Nonculturable microorganisms in the environment*. Pp 325-342. ASM Press Washington
- Oliver, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria.  
*Journal of Microbiology* 43 Spec No: 93-100
- O'Toole, R., Williams, H. D. 2003. Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*.  
*Research in Microbiology* 154 (6): 387-392
- Palomino, M. M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S. M. 2008. High salt stress in *Bacillus subtilis*: involvement of PBP4\* as a peptidoglycan hydrolase.  
*Research in Microbiology* 160 (2): 117-124
- Pang, X., Zhou, D., Song, Y., Pei, D., Wang, J., Guo, Z., Yang, R. 2004. Bacterial mRNA Purification by Magnetic Capture-Hybridization Method.  
*Microbiology and Immunology* 48 (2): 91-96
- Peng, H. Z., Isaacson, P. G., Diss, T. C., Pan, L. X. 1994. Multiple PCR analysis on trace amounts of DNA extracted from fresh and paraffin wax embedded tissues after random hexamer primer PCR amplification.  
*Journal of Clinical Pathology* 47 (7): 605-608
- Persson, Ö., Valadi, Ä., Nyström, T., Farewell, A. 2007. Metabolic control of the *Escherichia coli* universal stress protein response through fructose-6-phosphate.  
*Molecular Microbiology* 65 (4): 968-978
- Peterson, C. N., Mandel, M. J., Silhavy, T. J. 2005. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly.  
*Journal of Bacteriology* 187 (22): 7549-7553
- Peterson, C. N., Carabetta, V. J., Chowdhury, T., Silhavy, T. J. 2006. LrhA Regulates *rpoS* Translation in Response to the Rcs Phosphorelay System in *Escherichia coli*.  
*Journal of Bacteriology* 188 (9): 3175-3181
- Pflüger, K., Müller, V. 2004. Transport of compatible solutes in extremophiles.  
*Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36 (1): 17-24
- Piel, J. 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 99 (22): 14002-14007
- Ping, L., Vogel, H., Boland, W. 2008. Cloning of prokaryotic genes by a universal degenerate primer PCR.  
*FEMS Microbiology Letters* 287 (2): 192-198
- Poetter, K., Coplin, D. L. 1991. Structural and functional analysis of the *rcaA* gene from *Erwinia stewartii*.  
*Molecular and General Genetics* 229 (1): 155-160
- Postgate, J. R. 1976. Viable counts and viability.  
*Methods in Microbiology* 1: 611-628

- Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbial Reviews* 58 (4): 755-805
- Potvin, E., Sanschagrin, F., Levesque, R. C. 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiological Reviews* 32 (1): 38-55
- Powell, A. J., Tomberg, J., Deacon, A. M., Nicholas, R. A., Davies, C. 2009. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *Journal of Biological Chemistry* 284 (2): 1202-1212
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181 (19): 5993-6002
- Pruzzo, C., Tarsi, C., del Mar Lleo, M., Signorotto, C., Zampini, M., Colwell, R. R., Canepari, P. 2002. *In vitro* adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology* 45 (2): 105-110
- Ragoonanan, V., Malsam, J., Bond, D. R., Aksan, A. 2008. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (10): 2283-2290
- Rahman, M., Hasan, M. R., Shimizu, K. 2008. Growth phase-dependent changes in the expression of global regulatory genes and associated metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 30 (5): 853-860
- Rahn, A., C. Whitfield. 2003. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Molecular Microbiology* 47 (4):1045-1060
- Raina, S., Missiakas, D., Georgopoulos, C. 1995. The *rpoE* gene encoding the sigma factor E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* 14 (5): 1043-1055
- Ramírez Santos, J., Contreras Ferrat G., Gomez Eichelmann, M. C. 2005. Stationary phase in *Escherichia coli*. *Revista latinoamericana de microbiologia* 47 (3-4): 92-101
- Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. C. R., Moore, D. J., Stewart, W. D. P. 1986. Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiology. Reviews.* 39: 51-56
- Rees, C. E., Dodd, C. E., Gibson, P. T., Booth, I. R., Stewart, G. S. 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 28 (2): 263-275
- Reichmann, P., König, A., Marton, A., Hakenbeck, R. 1997. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 2 (2): 177-181

- Repoila, F., Majdalani, N., Gottesman, S. 2003. Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Molecular Microbiology* 48 (4): 855-861
- Rice, L. B., Carias, L. L., Hutton-Thomas, R., Sifaoui, F., Gutmann, L. Rudin, S. D. 2001. Penicillin-binding protein 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (5): 1480-1486
- Riva, A., Delorme, M. O., Chevalier, T., Guilhot, N., Henaut, C., Henaut, A. 2004. Characterization of the GATC regulatory network in *E. coli*. *BMC Genomics* 5 (1): 48
- Robbe-Saule, V., Algorta, G., Rouihac, I., Norel, F. 2003. Characterization of the RpoS status of clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4352-4358
- Rollins, D. M., Colwell, R. R. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (3): 531-538
- Romaní, A. M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., Obst, U. 2008. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology* 56 (3): 427-436
- Roszak, D. B., Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51 (3): 365-379
- Roth, W. G., Leckie, M. P., Dietzler, D. N. 1988. Restoration of colonyforming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12): 3142-3146
- Ryan, F. J. 1959. Bacterial mutation in a stationary phase and the question of cell turnover. *Journal of General Microbiology* 21: 530-549
- Rybkin, T., Mainardi, J. L., Sougakoff, W., Collatz, E., Gutmann, L. 1998. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *Journal of Infectious Diseases* 178 (1): 159-163
- Sachidanandham, R., Yew-Hoong Gin, K., Poh, C. L. 2005. Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (1): 24-31
- Sachidanandham, R., Yew-Hoong Gin, K. 2008. Flow cytometric analysis of prolonged stress-dependent heterogeneity in bacterial cells. *FEMS Microbiology Letters* 290 (2): 143-148
- Sachidanandham, R., Yew-Hoong Gin, K. 2009. A dormancy state in nonspore-forming bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (5): 927-941
- Saint-Ruf, C., Pesut, J., Sopta, M., Matic, I. 2007. Causes and consequences of DNA repair activity modulation during stationary phase in *Escherichia coli*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 42 (4): 257-270

- Sak, B. D., Eisenstarck, A., Touati, D. 1989. Exonuklease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* product. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 86 (9): 3271-3275
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74 (12): 5463-5467
- Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome biology 4 (6): 219
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., Charlier, P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews 32 (2): 234-258
- Schembri, M. A., Kjaergaard, K., Klemm, P. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Molecular Microbiology 48 (1): 253-267
- Schreiber, K., Boes, N., Eschbach, M., Jaensch, L., Wehland, J., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Hentzer, M., Schobert, M. 2006. Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. Journal of Bacteriology 188 (2): 659-668
- Schweder, T., Hecker, M. 2004. Monitoring of stress responses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 89: 47-71
- Seshasayee, A. S., Fraser, G. M., Babu, M. M., Luscombe, N. M. 2009. Principles of transcriptional regulation and evolution of the metabolic system in *E. coli*. Genome Research 19 (1): 79-91
- Seufferheld, M. J., Alvarez, H. M., Farias, M. E. 2008. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. Applied and Environmental Microbiology 74 (19): 5867-5874
- Shine, J., Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proceedings of National Academy of Science of the USA 71 (4):1342-1346
- Siegele, D. A., Kolter, R. 1992. Life after log. Journal of Bacteriology 174 (2): 345-348
- Signoretto, C., Lleo, M. M., Tafi, M. C., Canepari P. 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. Applied and Environmental Microbiology 66 (5): 1953-1959
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Pruzzo, C., Canepari, P. 2005. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. Applied and Environmental Microbiology 71 (5): 1977-1980
- Singh, D., Chang, S-J., Lin, P-H., Averina, O. V., Kaberdin, V. R., Lin-Chao, S. 2009. Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of *Escherichia coli*. PNAS 3 (106): 864- 869

- Sledjeski, D. D., Gottesman, S. 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12.  
Journal of Bacteriology 178 (4): 1204-1206
- Sousa, M C., McKay, D. B. 2001. Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*.  
Structure 9 (12): 1135-1141
- Spira, B., Hu, X., Ferenci, T. 2008. Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12.  
Microbiology 154 (9): 2887-2895
- Storz, G., Imlay, J. A. 1999. Oxidative stress.  
Current Opinion in Microbiology 2 (2): 188-194
- Stout, V., Torres-Cabassa, A., Maurizi, M.R., Gutnick, D., Gottesman, S. 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis.  
Journal of Bacteriology 173 (5): 1738-1747
- Stüdemann, A., Noirclerc-Savoye, M., Klauck, E., Becker, G., Schneider, D., Hengge R. 2003. Sequential recognition of two distinct sites in  $\sigma$ S by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX.  
EMBO Journal 22 (16): 4111-4120
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E., Ohman, D. E. 1999. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*.  
Journal of Bacteriology 181 (13): 3890-3897
- Takayama, K., Kjelleberg, S. 2000. The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation.  
Environmental Microbiology 2 (4): 355-365
- Takayanagi, Y., Tanaka, K., Takahashi, H. 1994. Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*.  
Molecular and General Genetics 243 (5): 525-531
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., Mizuno, T. 2001. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour.  
Molecular Microbiology 40 (2): 440-450
- Tamanai-Shacoori, Z., Jolivet-Gougeon, A., Ménard, C., Bonnaure-Mallet, M., Cormier, M. 2006. Peracetic acid stress-induced genetic rearrangements in *Escherichia coli* H10407 detected by RAPD and RFLP analyses.  
Microbiological Research: 161 (2): 164-168
- Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P., Griffiths, M. W. 2006. Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress.  
Journal of Food Protection 69 (11): 2747-2753
- Teich, A., Meyer, S., Lin, H. Y., Andersson, L., Enfors, S. O., Neubauer, P. 1999. Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators  $\sigma$ S and ppGpp in glucose-limited fedbatch and continuous cultures of *Escherichia coli*.  
Biotechnology Progress 15 (1): 123-129

- Timasheff, S. N. 1998. In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions.  
Proceedings of National Academy of Science of the USA 95 (13): 7363-7367
- Torres-Cabassa, A.S., Gottesman, S. 1987. Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis.  
Journal of Bacteriology 169 (3): 981-989
- Traxler, M. F., Summers, S. N., Nguyen, H-T., Zacharia, V. M., Hightower, G. A., Smith, J. T., Conway, T. 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*.  
Molecular Microbiology 68 (5): 1128-1148
- Trisler, P., Gottesman, S. 1984. Ion transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12.  
Journal of Bacteriology 160 (1): 184-191
- Troutt, A. B., McHeyzer-Williams, M. G., Pulendran, B., Nossal, G. J. V. 1992. Ligation-anchored PCR: A simple amplification technique with single-sided specificity.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 89 (20): 9823-9825
- Tsaneva, I. R., Weiss, B. 1990. SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 172 (8): 4197-4205
- Typas, A., Barembuch, C., Possling, A., Hengge, R. 2007. Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of  $\sigma$ S activity and levels.  
EMBO 26 (6): 1569-1578
- Urbach, C., Evrard, C., Pudzaitis, V., Fastrez, J., Soumillion, P., Declercq, J. P. 2009. Structure of PBP-A from *Thermosynechococcus elongatus*, a penicillin-binding protein closely related to class A beta-lactamases.  
Journal of Molecular Biology 386 (1): 109-120
- VanBogelen, R. A., Neidhardt, F.C. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 87 (15): 5589-5593
- Vattakaven, T, Bond, P., Bradley, G., Munn, C. B. 2006. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*.  
Applied and Environmental Microbiology 72 (10): 6508-6513
- Velasco, R., Burgoa, R., Flores, E., Hernandez, E., Villa, A., Vaca, S. 1995. Osmoregulation in *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic shock.  
Revista Latinoamericana de Microbiologia 37 (3): 209-216
- Venieri, D., Vantarakis, A., Komninou, G., Papapetropoulou, M. 2004. Differentiation of faecal *Escherichia coli* from human and animal sources by random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR).  
Water Science and Technology 50 (1): 193-198
- Venturi, V. 2003. Control of rpoS transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different?  
Molecular Microbiology 49 (1): 1-9

- Venturi, V. 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*.  
FEMS Microbiological Reviews 30 (2): 274-291
- Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, J. O. Lee, M. Y. Popoff. 1996. Characterization of the *rcsA* and *rcsB* genes from *Salmonella typhi*: *rcsB* through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis.  
Journal of Bacteriology 178 (6):1691-1698
- Volkman, H., Schwartz, T., Kirchen, S., Stofer, C., Obst, U. 2007. 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 Cell Probes 21 (2): 125-133
- Vytvytska, O., Jakobsen, J. S., Balcunaite, G., Andersen, J. S., Baccharini, M., von Gabain, A. 1998. Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli* ompA mRNA in a growth rate dependent fashion and regulates its stability.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 95 (24): 14118-14123
- Wagner, A. O., Malin, C., Knapp, B. A., Illmer, P. 2008. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide.  
Applied and Environmental Microbiology 74 (8): 2537-2539
- Wang, Q., Kaguni, J. M. 1989. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*.  
Journal of Bacteriology 171 (8): 4248-4253
- Weber, T., Schmidt, E., Scheer, U. 1989. Mapping of transcription units on *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes by in situ hybridization with biotin-labeled cDNA probes.  
European Journal of Cellular Biology 50 (1): 144-153
- Wehland, M., Bernhard, F. 2000. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria.  
The Journal of Biological Chemistry 275 (10): 7013-7020
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., Nierhaus, K. H. 2002. Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA.  
Molecular Cell 10 (4): 779-788
- Werner, G., Willems, R. J. L., Hildebrandt, B., Klare, I., Witte, W. 2003. Influence of Transferable Genetic Determinants on the Outcome of Typing Methods Commonly Used for *Enterococcus faecium*.  
Journal of Clinical Microbiology 41 (4): 1499-1506
- Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K. G., Leclercq, R., Lester, C. H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L. V., Sadowy, E., Simonsen, G. S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R. J., Witte, W., Woodford, N. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe.  
Euro Surveillance 13 (47): pii: 19046
- Wery, N., Pourcher, A-M., Stan, V., Delgenes, J-P., Picard-Bonnaud, F., Godon, J-J. 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* in sludge evaluated by real-time PCR and culture methods.  
Letters in Applied Microbiology 43 (2): 131-136

- Wick, L. M., Quadroni, M., Egli, T. 2001. Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environmental Microbiology* 3 (9): 588-599
- Wick, L. M., Egli, T. 2004. Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 89: 1-45
- Wood, J. M. 1999. Osmosensing by bacteria: Signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1): 230-262
- Wood, J. M. 2007. Bacterial Osmosensing Transporters. *Methods in Enzymology* 428: 77-107
- Wright, J. A., Grant, A. J., Hurd, D., Harrison, M., Guccione, E. J., Kelly, D. J., Maskell, D. J. 2009. Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* in vitro growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology* 155 (1): 80-94
- Xu, H. S., Roberts, S., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., Colwell, R. R., 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* 8: 313-323
- Xu, K. D., Franklin, M. J., Park, C. H., McFeters, G. A., Stewart, P. S. 2001. Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 199 (1): 67-71
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. 1982. Living with water stress: the evolution of osmolyte systems. *Science* 217 (4566): 1214-1222
- Yang, F., Xu, X. G., Yang, M. J., Zhang, Y. Y., Klugman, K. P., McGee, L. 2008. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Shanghai, China. *International Journal of Antimicrobial Agents*: 32 (5): 386-391
- Yohannes, E., Barnhart, D. M., Slonczewski, J. L. 2004. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 186 (1): 192-199
- Young, K. D. 2001. Approaching the physiological functions of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie* 83 (1): 99-102
- Yun, J. I., Cho, K. M., Kim, J. K., Lee, S. O., Cho, K., Lee, K. 2007. Mutation of rpoS enhances *Pseudomonas* sp. KL28 growth at higher concentrations of m-cresol and changes its surface-related phenotypes. *FEMS Microbiology Letters* 269 (1): 97-103
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T. 2008. Penicillin-binding proteins and b-lactam resistance. *FEMS Microbiological Reviews* 32 (2): 361-385

Zarembinski, T. I., Hung, L. W., Mueller-Dieckmann, H. J., Kim, K. K., Yokota, H., Kim, R., Kim, S. H. 1998. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 95 (26): 15189-15193



## 7 Anhang

### Daten zum RNA-Gehalt und Anzahl der KBE

**Tab. 7.1:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei *Pseudomonas aeruginosa* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	MW KBE/mL	SD	MW RNA [ng/ $\mu$ L]	SD
<b>Natriumchlorid</b>				
Kontrolle	7,26E+08	0,24E+08	447,30	13,63
3 Tage	3,49E+08	0,51E+08	205,40	29,37
4 Tage	1,84E+08	0,24E+08	280,30	3,84
5 Tage	3,01E+08	0,84E+08	316,90	5,01
<b>Leitungswasser</b>				
Kontrolle	2,04E+08	0,42E+08	432,97	13,30
3 Tage	4,09E+08	0,37E+08	306,90	12,32
4 Tage	3,19E+08	1,17E+08	361,30	0,46
5 Tage	2,41E+08	0,18E+08	392,30	1,56

**Tab. 7.2:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei *Escherichia coli* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	MW KBE/mL	SD	MW RNA [ng/ $\mu$ L]	SD
<b>Natriumchlorid</b>				
Kontrolle	1,38E+09	0,79E+09	1089,65	57,04
3 Tage	9,74E+07	1,27E+07	352,90	2,36
4 Tage	8,19E+07	0,26E+07	221,00	9,08
5 Tage	7,89E+07	0,41E+07	141,20	5,63
<b>Leitungswasser</b>				
Kontrolle	1,09E+09	0,13E+09	1244,70	8,70
3 Tage	2,69E+09	0,50E+09	1089,60	15,99
4 Tage	2,21E+09	0,98E+09	847,70	3,27
5 Tage	4,89E+08	1,35E+08	1093,40	13,29

**Tab. 7.3:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei *Enterococcus faecium* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	MW KBE/mL	SD	MW RNA [ng/μL]	SD
<b>Natriumchlorid</b>				
Kontrolle	3,36E+08	0,97E+08	253,37	8,77
3 Tage	3,20E+08	1,54E+08	715,63	0,68
4 Tage	1,70E+08	1,01E+08	752,90	39,04
5 Tage	5,78E+07	0,85E+07	775,63	23,88
<b>Leitungswasser</b>				
Kontrolle	5,28E+08	0,83E+08	195,40	3,25
3 Tage	6,03E+07	1,06E+07	730,65	24,96
4 Tage	5,95E+05	1,15E+05	688,40	12,59
5 Tage	3,48E+05	3,22E+05	778,47	7,54

**Tab. 7.4:** Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei *Enterococcus faecalis* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	MW KBE/mL	SD	MW RNA [ng/μL]	SD
<b>Natriumchlorid</b>				
Kontrolle	4,28E+08	1,47E+08	337,36	12,35
3 Tage	1,33E+08	7,30E+07	219,7	5,47
4 Tage	3,95E+07	1,65E+07	216,85	0,97
5 Tage	2,83E+06	1,16E+06	224,95	13,71
<b>Leitungswasser</b>				
Kontrolle	3,98E+08	2,08E+08	331,56	11,21
3 Tage	8,60E+06	2,80E+05	405,50	9,45
4 Tage	3,65E+06	7,40E+05	436,60	8,91
5 Tage	3,36E+06	1,59E+06	639,25	2,57

## Daten zu Ct-Werten

**Tab. 7.5:** Ct-Werte der quantitativen PCR für 16S crDNA und 16S rDNA bei PMA-behandelten Proben von *Enterococcus faecium* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung.

	16S crDNA	SD	16S rDNA	SD
<b>Natriumchlorid</b>				
Kontrolle	17,24	1,010	13,27	0,124
3 Tage	16,89	0,123	15,06	0,005
4 Tage	17,83	0,097	16,66	0,002
5 Tage	18,37	0,048	18,34	0,053
<b>Leitungswasser</b>				
Kontrolle	16,83	0,466	13,42	0,006
3 Tage	18,66	0,061	23,15	0,070
4 Tage	19,53	0,004	24,39	0,127
5 Tage	20,42	0,062	24,98	0,244

**Tab. 7.6:** Ct-Werte der quantitativen PCR für 16S crDNA und 16S rDNA bei PMA-behandelten Proben von *Enterococcus faecalis* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung.

	16S crDNA	SD	16S rDNA	SD
<b>Natriumchlorid</b>				
Kontrolle	22,77	0,537	14,63	0,078
3 Tage	19,14	0,297	17,01	0,304
4 Tage	19,73	0,318	17,55	0,226
5 Tage	20,19	0,226	17,2	0,283
<b>Leitungswasser</b>				
Kontrolle	22,72	0,401	14,75	0,056
3 Tage	22,30	0,218	16,48	0,280
4 Tage	22,73	0,216	17,00	0,266
5 Tage	23,94	0,326	17,71	0,388

## Daten zu RNA-Isolierungen

**Tab. 7.7:** RNA-Konzentrationen aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	<b>MW RNA [ng/μL]</b>	<b>SD</b>	<b>260/280 nm</b>
<b>0,5 M NaCl-Lösung</b>			
Kontrolle	447,30	13,63	2,07
1 Tag	300,80	16,48	2,10
2 Tage	289,75	28,62	2,10
3 Tage	205,40	29,37	2,08
4 Tage	280,30	3,84	2,07
5 Tage	316,90	5,01	1,98
<b>Leitungswasser</b>			
Kontrolle	432,97	13,30	2,08
1 Tag	314,97	7,08	2,10
2 Tage	357,72	54,30	2,10
3 Tage	306,90	12,32	2,08
4 Tage	361,30	0,46	2,07
5 Tage	392,30	1,56	2,05
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>			
0,2	158,20	10,11	2,11
0,4	321,60	1,11	2,09
0,6	410,73	16,20	2,09
1,1	536,23	4,71	2,12
1,3	280,73	16,12	2,12
1,6	529,00	9,40	2,12

**Tab. 7.8:** RNA-Konzentrationen aus Kulturen von *Escherichia coli* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	<b>MW RNA [ng/μL]</b>	<b>SD</b>	<b>260/280 nm</b>
<b>0,5 M NaCl-Lösung</b>			
Kontrolle	1089,50	57,04	2,12
1 Tag	1044,30	12,39	2,09
2 Tage	584,70	21,26	2,09
3 Tage	352,90	2,36	2,12
4 Tage	221,00	9,08	2,12
5 Tage	141,20	5,63	2,13
<b>Leitungswasser</b>			
Kontrolle	1244,70	8,70	2,13
1 Tag	1140,77	62,17	2,09
2 Tage	934,43	30,05	2,09
3 Tage	1089,60	15,99	2,14
4 Tage	847,70	3,27	2,11
5 Tage	1093,40	13,29	2,11
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>			
0,1	100,97	12,81	2,04
0,2	280,40	15,77	2,09
0,4	422,80	30,58	2,07
0,8	892,50	12,37	2,11
1,4	1257,90	26,30	2,06
2,1	332,00	7,19	2,05

**Tab. 7.9:** RNA-Konzentrationen aus Kulturen von *Enterococcus faecium* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	<b>MW RNA [ng/μL]</b>	<b>SD</b>	<b>260/280 nm</b>
<b>0,5 M NaCl-Lösung</b>			
Kontrolle	244,80	1,18	2,12
1 Tag	428,02	42,17	2,12
2 Tage	642,80	15,47	2,12
3 Tage	619,57	15,28	2,14
4 Tage	749,50	20,45	2,12
5 Tage	750,40	36,84	2,12
<b>Leitungswasser</b>			
Kontrolle	249,67	7,78	2,12
1 Tag	703,78	47,18	2,12
2 Tage	906,31	9,93	2,13
3 Tage	992,27	9,53	2,15
4 Tage	1067,78	19,25	2,12
5 Tage	931,14	6,80	2,14
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>			
0,2	83,03	1,27	2,11
0,4	255,34	9,70	2,14
0,6	285,95	6,65	2,15
0,7	226,41	6,47	2,15
0,8	198,68	15,15	2,13
2,5	166,05	4,67	2,15

**Tab. 7.10:** RNA-Konzentrationen aus Kulturen von *Enterococcus faecalis* während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.

	<b>MW RNA [ng/μL]</b>	<b>SD</b>	<b>260/280 nm</b>
<b>0,5 M NaCl-Lösung</b>			
Kontrolle	337,36	12,35	2,12
3 Tage	219,70	5,47	2,14
4 Tage	216,85	0,97	2,13
5 Tage	224,95	13,71	2,13
<b>Leitungswasser</b>			
Kontrolle	372,26	6,08	2,12
3 Tage	401,70	9,90	2,15
4 Tage	449,50	7,92	2,15
5 Tage	558,00	6,79	2,20
<b>Optische Dichte (OD<sub>600</sub>)</b>			
0,2	44,60	0,86	2,11
2,5	116,40	1,71	1,94

## Alignements

CD (conserved domain) 00293, USP-ähnlich:

RILVAVDGESESERALRWAARLARRLGAELVLLHVDPPPPSSAAELAELEEEARALLEALREALAEAGVKVE  
TVVLEGDPAEAILEAAEELGADLIVMGSRGRSGLRRLLLGVAERVLRHAPCPVLVV

PLES\_20451 von *Pseudomonas aeruginosa*:

MPYGHILVAVDLDT**E**CDPVMKRA**AA**LATS**NQ**ARLSVV**HV**VE**P**MAMAFGGDV**P**MDLS**M**LQQQQFDQ**ARE**  
RLD**A**FAVRY**P**DL**G**SEQRHLVY**G**Q**P**RQEIHRL**AE**QAC**DL**IV**G**SH**GR**HGL**ALL**L**G**ST**AN**D**VL**H**G**AP**CD**VL  
AVHLKKA

USPA von *Escherichia coli*:

MAYKHILIAVDL**S**PE**S**KVLVEK**AV**SM**AR**PN**AK**VS**LI**HVDVNYSDLYT**G**LIDVNLGDMQKR**ISE**ETH**H**AL**TEL**  
ST**NA**GYPIT**ET**LSGS**G**DLGQVLVD**AI**KKYD**MD**L**V**CGHHQDFWSK**LM**SS**AR**QLINTVHVD**ML**IVPLRDEEE

EF1982 von *Enterococcus faecalis*:

MLQQYQKIMIAIDGS**DE**ADL**AF**KK**AV**NV**AK**RND**AE**LL**LA**H**V**VDTRSFQSVSSFDGAL**AE**AMSM**AK**ETLDT  
YQQQAVDM**G**QT**KV**SS**V**LAY**G**SPK**NI**AKELPK**EY**NI**DL**IML**G**AT**GL**NAVER**LF**IG**S**V**SE**S**VI**R**NA**SCD**VL**VVR  
TDLDNKLPKNEEK

EF1058 von *Enterococcus faecalis*:

MKFSKIM**V**GV**EE**SPDALK**AF**HY**AI**Q**KA**KEEQ**AE**L**V**IVSILEEKEINVYQSLDKNYWQEQLAKLEKQ**TE**KYQQ  
EALAN**G**ID**K**VSV**IV**NE**GN**PGELI**IN**KLIPLNK**P**DL**LI**IG**S**KST**SK**LKSFF**GS**QAAY**M**ARY**AP**IS**VM**IIR

EF3035 von *Enterococcus faecalis*:

MEEQMYKN**IL**V**G**VDGS**DQ**AN**LA**YER**AI**EV**ARR**NGSRVIVANILENQVYTM**MG**YSTLNDQ**L**IDQETAA**EE**L  
MADCKKYAESVDFH**NV**ET**VT**MF**G**SP**KE**VMSHEL**PE**KYN**VD**LIM**V**G**QS**GLNAVER**V**VM**G**SVSS**Y**IIR**Q**AP**CD**  
VLIVHSEEK

EF1084 von *Enterococcus faecalis*:

MSVYQHIL**VA**LDGS**DQ**SE**K**AFHE**AV**RI**A**KEEQ**AT**LY**L**ATIINDAEFTT**SP**F**S**FE**EL**YD**LE**KHKSEEM**L**TG**K**AK  
QASE**IG**V**K**TVKK**IV**E**IG**SPKRYLANTISE**NY**AID**L**IV**L**GAT**GR**GAI**Q**RT**L**IG**S**TTD**Y**V**V**N**H**AL**C**N**V**L**V**VR

**Abb. 7.1:** Aminosäuresequenzvergleiche der Usp-homologen Proteine.

■ :homologe Aminosäure

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Primersequenzen für Sondenherstellung .....	24
Tab. 2.2: Primersequenzen für RAPD-PCR .....	24
Tab. 2.3: Primer- und Sondensequenzen für Real-Time-PCR .....	25
Tab. 2.4: Primersequenzen für Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) der cDNA .....	25
Tab. 2.5: Oligonukleotidsequenzen für Capture-Hybridisierungsaufreinigung .....	26
Tab. 2.6: Primersequenzen für 3' Modifikation von Nukleinsäuren, Reverse Transkription und PCR .....	26
Tab. 2.7: Bedingungen des Sequenzierlaufs .....	44
Tab. 3.1: Primersequenzen für die quantitative PCR .....	57
Tab. 3.2: Primersequenzen für die Sondenherstellung der Northern Blot-Analysen .....	57
Tab. 3.3: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>rpoS</i> -Gen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar .....	60
Tab. 3.4: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>rcaA</i> -Gen von <i>Escherichia coli</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar .....	61
Tab. 3.5: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>pbp5</i> -Gen von <i>Enterococcus faecium</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung. -: keine Repression messbar .....	67
Tab. 3.6: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>pbp5</i> -Gen von <i>Enterococcus faecalis</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. RF: Repressionsfaktor. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung .....	68
Tab. 3.7: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>rpoS</i> -Gen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Die Expression wurde bei planktonischen Bakterien, unbehandelten Biofilmen nach verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. IF1: IF im Vergleich zu planktonischen Bakterien. IF2: IF im Vergleich zu adhärenen Zellen. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar .....	73
Tab. 3.8: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>rpoS</i> -Gen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Die Expression wurde bei planktonischen Bakterien, unbehandelten Biofilmen nach verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. IF1: IF im Vergleich zu planktonischen Bakterien. IF2: IF im Vergleich zu adhärenen Zellen. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar .....	75

Tab. 3.9: Quantitative PCR mit dem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>rcaA</i> -Gen von <i>Escherichia coli</i> . Die Expression wurde bei planktonischen Bakterien, unbehandelten Biofilmen nach verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. IF1: IF im Vergleich zu planktonischen Bakterien. IF2: IF im Vergleich zu adhärennten Zellen. SD: Standardabweichung. -: keine Induktion messbar.....	76
Tab. 3.10: Primersequenzen für die quantitative PCR.....	80
Tab. 3.11: Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für ein <i>usp</i> -homologes Gen (PLES_20451) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung.....	81
Tab. 3.12: Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für das <i>uspA</i> -Gen von <i>Escherichia coli</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. RF: Repressionsfaktor. IF: Induktionsfaktor. SD: Standardabweichung.....	82
Tab. 3.13: Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für ein <i>usp</i> -homologes Gen (EF1982) von <i>Enterococcus faecalis</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.....	84
Tab. 3.14: Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für ein <i>usp</i> -homologes Gen (EF1058) von <i>Enterococcus faecalis</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.....	85
Tab. 3.15: Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für ein <i>usp</i> -homologes Gen (EF3035) von <i>Enterococcus faecalis</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.....	86
Tab. 3.16: Quantitative PCR mit einem Primer/Probe-System spezifisch für ein <i>usp</i> -homologes Gen (EF1084) von <i>Enterococcus faecalis</i> . Die Expression wurde bei verschiedenen Behandlungen und Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen OD-Werten untersucht. MW: Mittelwert. IF: Induktionsfaktor. RF: Repressionsfaktor. SD: Standardabweichung.....	87
Tab. 3.17: Primersequenzen.....	89
Tab. 7.1: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	157
Tab. 7.2: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei und <i>Escherichia coli</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	157
Tab. 7.3: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei <i>Enterococcus faecium</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	158

---

Tab. 7.4: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei <i>Enterococcus faecalis</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	158
Tab. 7.5: Ct-Werte der quantitativen PCR für 16S crDNA und 16S rDNA bei PMA-behandelten Proben von <i>Enterococcus faecium</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung.....	159
Tab. 7.6: Ct-Werte der quantitativen PCR für 16S crDNA und 16S rDNA bei PMA-behandelten Proben von <i>Enterococcus faecalis</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung.....	159
Tab. 7.7: RNA-Konzentrationen aus Kulturen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	160
Tab. 7.8: RNA-Konzentrationen aus Kulturen von <i>Escherichia coli</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	161
Tab. 7.9: RNA-Konzentrationen aus Kulturen von <i>Enterococcus faecium</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	162
Tab. 7.10: RNA-Konzentrationen aus Kulturen von <i>Enterococcus faecalis</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. MW: Mittelwert.....	163

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Stadien der Biofilmentwicklung. 1: initiales Anheften; 2: irreversibles Anheften; 3: Maturation I; 4: Maturation II; 5: Streuung ( <a href="http://www.myutahwater.com/umws_biofilm.htm">http://www.myutahwater.com/umws_biofilm.htm</a> ).....	9
Abb. 1.2: Regulationsebenen von <i>rpoS</i> . Die zelluläre Menge an $\sigma$ S wird durch verschiedene Stressparameter auf den Ebenen der <i>rpoS</i> Transkription, Translation oder $\sigma$ S Proteolyse reguliert (aus Hengge-Aronis 2002b).....	12
Abb. 1.3: Der Rcs-Signalweg. OM: outer membrane (äußere Membran), IM: inner membrane (innere Membran), nach Majdalani und Gottesman 2005.....	14
Abb. 1.4: Schema der Proteinbiosynthese.....	18
Abb. 1.5: Aufgabenstellung.....	20
Abb. 1.6: Methodisches Fließschema der Arbeit.....	21
Abb. 2.1: Wirkmechanismus von PMA.....	27
Abb. 2.2: Nachweisprinzip der Real-Time-PCR.....	38
Abb. 2.3: Amplifikationsverlauf der Real-Time-PCR.....	39
Abb. 3.1: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Escherichia coli</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. LW: Behandlung mit Leitungswasser. N: Behandlung mit Salzlösung. SD: Standardabweichung. <span style="color: blue;">◆</span> : KBE LW (SD: 1,4E+08), <span style="color: orange;">◆</span> : KBE N (SD: 7,9E+08), <span style="color: cyan;">◆</span> : RNA LW (SD: 15,99), <span style="color: yellow;">◆</span> : RNA N (SD: 57,04).....	49
Abb. 3.2: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt bei <i>Enterococcus faecium</i> und <i>Enterococcus faecalis</i> während verschiedener Behandlungen und Inkubationszeiten. LW: Behandlung mit Leitungswasser. N: Behandlung mit Salzlösung. SD: Standardabweichung. <span style="color: blue;">◆</span> : KBE LW (SD: 2,1E+08), <span style="color: orange;">◆</span> : KBE N (SD: 1,5E+08), <span style="color: cyan;">◆</span> : RNA LW (SD: 24,96), <span style="color: yellow;">◆</span> : RNA N (SD: 39,04).....	50
Abb. 3.3: Wirkungsmechanismus von PMA zur Unterscheidung geschädigter und intakter Bakterien.....	52
Abb. 3.4: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt, dem rRNA-Gehalt und PMA-Versuchen bei <i>Enterococcus faecium</i> während osmotischem Stress und Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. <span style="color: blue;">◆</span> : KBE (SD: 1,5E+08), <span style="color: purple;">◆</span> : RNA (SD: 39,04), <span style="color: orange;">◆</span> : rRNA (SD: 1,01), <span style="color: cyan;">◆</span> : DNA (SD: 0,12).....	54
Abb. 3.5: Zellzahl im Vergleich zum Gesamt-RNA-Gehalt, dem rRNA-Gehalt und PMA-Versuchen bei <i>Enterococcus faecalis</i> während osmotischem Stress und Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. SD: Standardabweichung. <span style="color: blue;">◆</span> : KBE (SD: 2,1E+08), <span style="color: purple;">◆</span> : RNA (SD: 13,71), <span style="color: orange;">◆</span> : rRNA (SD: 0,54), <span style="color: cyan;">◆</span> : DNA (SD: 0,39).....	55
Abb. 3.6: Northern Blot-Analyse von <i>rpoS</i> in der Gesamt-RNA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (rechts). <i>rpoS</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert. K: Kontrolle, d: Tage.....	63

Abb. 3.7: Northern Blot-Analyse von <i>rcaA</i> in der Gesamt-RNA aus <i>Escherichia coli</i> . Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (rechts). <i>rcaA</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert: K: Kontrolle, d: Tage .....	63
Abb. 3.8: Northern Blot-Analyse von <i>rpoS</i> in der Gesamt-RNA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Entnahme bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD <sub>600</sub> ). <i>rpoS</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert: K: Kontrolle, d: Tage .....	64
Abb. 3.9: Northern Blot-Analyse von <i>rcaA</i> in der Gesamt-RNA aus <i>Escherichia coli</i> . Entnahme bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD <sub>600</sub> ). <i>rcaA</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert: K: Kontrolle, d: Tage .....	64
Abb. 3.10: Northern Blot-Analyse von <i>pbp5</i> in der Gesamt-RNA aus <i>Enterococcus faecium</i> . Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (rechts). <i>pbp5</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert: K: Kontrolle, d: Tage .....	69
Abb. 3.11: Northern Blot-Analyse von <i>pbp5</i> in der Gesamt-RNA von <i>Enterococcus faecalis</i> . Entnahme nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten während der Behandlung mit einer Salzlösung (links) oder Leitungswasser (Mitte) und bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD <sub>600</sub> ) (rechts). <i>pbp5</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert: K: Kontrolle, d: Tage .....	70
Abb. 3.12: Northern Blot-Analyse von <i>pbp5</i> in der Gesamt-RNA von <i>Enterococcus faecium</i> . Entnahme bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD <sub>600</sub> ). <i>Pbp5</i> wurde mit einer spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde detektiert: K: Kontrolle, d: Tage .....	70
Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Biofilmanzucht .....	71
Abb. 3.14: Genexpressionsanalysen bei planktonischen Bakterien während verschiedener Behandlungen und in der stationären Phase. ■ : stationäre Phase; ■ : osmotischer Stress; ■ : Oligotrophie .....	78
Abb. 3.15: Genexpressionsanalysen bei planktonischen und adhärenenten Bakterien während verschiedener Behandlungen und in der stationären Phase. BB: Biofilmbildung. NaCl: osmotischer Stress. LW: Oligotrophie. ■ : planktonische Bakterien; ■ : adhärenente Bakterien (Reinkultur); ■ : adhärenente Bakterien (Mischkultur) .....	78
Abb. 3.16: Amplifikation von cDNA. Verwendung externer Primer/ Adapter .....	88
Abb. 3.17: Amplifikation von cDNA. Verwendung von internen Primern .....	89
Abb. 3.18: Schematische Darstellung der unspezifischen Amplifikation .....	90
Abb. 3.19: Elektrophoretische Auftrennung der modifizierten und amplifizierten Nucleinsäuren von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . M: 100 bp-Marker, 1: PCR-Produkt nach 3' Modifikation durch Terminale Transferase/ T4 RNA Ligase, 2: PCR-Produkt nach zweimaliger T4 RNA Ligation .....	91
Abb. 3.20: Elektrophoretische Auftrennung der modifizierten und amplifizierten Nucleinsäuren von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation .....	92

Abb. 3.21: Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecium</i> während osmotischem Stress oder Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1/5: Kontrolle, 2/6: nach 3 Tagen, 3/7: nach 4 Tagen, 4/8: nach 5 Tagen Inkubation	93
Abb. 3.22: Elektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten und amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecium</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	94
Abb. 3.23: Schema der RAPD-PCR	95
Abb. 3.24: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	96
Abb. 3.25: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Escherichia coli</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	97
Abb. 3.26: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecium</i> während Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	98
Abb. 3.27: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecalis</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	99
Abb. 3.28: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecalis</i> während Oligotrophie bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	99
Abb. 3.29: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecalis</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	101
Abb. 3.30: Elektrophoretische Auftrennung der mit RAPD-PCR amplifizierten cDNA von <i>Enterococcus faecium</i> während osmotischem Stress bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. M: 100 bp-Marker, 1: Kontrolle, 2: nach 3 Tagen, 3: nach 4 Tagen, 4: nach 5 Tagen Inkubation	102
Abb. 4.1: Stressantworten bei Bakterien (modifiziert nach T. Mascher, Research Group 11-1 „Microbial Stress Responses“, Karlsruhe)	107
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der RAPD-PCR	120
Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Amplifikation mittels Adapter	122
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Amplifikation mittels degenerierter Primer	124
Abb. 4.5: Regulationsschema ausgewählter stressrelevanter Gene	125

Abb.7.1: Aminosäuresequenzvergleiche der Usp-homologen Proteine.

■ : homologe Aminosäure .....164