Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. Autenrieth

rRNA Regulationsmechanismen bei *Staphylococcus aureus in vitro* et *in vivo*

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kai Henry Knümann
aus
Köln**

2005

Dekan: Professor Dr. Claus D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Wolz

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Herrmann

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN 7

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 9

1.1 *Staphylococcus* 9

1.2 *Staphylococcus aureus* 9

1.3 Zystische Fibrose 11

1.4 Fremdkörperinfektionen 12

1.5 Genexpression und Metabolismus 14

1.6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung 15

1.7 Ziele dieser Arbeit 19

2 MATERIAL UND METHODEN 21

2.1 Materialien 21

2.1.1 Chemikalien, Sonden, Antikörper, Enzyme 21

2.1.2 Medien und Stammlösungen 22

2.1.3 Bakterienstämme 23

2.1.4 Geräte, Materialien, PC-Programme 23

2.2 Methoden 24

2.2.1 Bakterienanzucht in Flüssigkulturen 24

2.2.2 KBE Bestimmung 24

2.2.3 RNA Isolierung 25

2.2.3.1 Trizol Methode 25

2.2.3.2 Qiagen Methoden 26

2.2.4 DNA Isolierung mit Trizol 27

2.2.5 RNA Gel-Elektrophorese 28

2.2.6 Slotblot der 16S rRNA 28

2.2.7 FISH der 16S rRNA 30

2.2.7.1 Auftragen von Bakterien auf Objektträger 30

2.2.7.2 Hybridisierung 31
2.2.7.3 PNA Hybridisierung 32
2.2.7.4 Proben für die *in vivo* Hybridisierung 34

3 ERGEBNISSE 35

3.1 Korrelation KBE / OD 35

3.2 RNA / DNA Isolierung 37

3.3 FISH 48
3.3.1 Universalsonde EUB / *S. aureus* spezifische Sonde SAP-2 48
3.3.2 PNA Sonde 52

3.4 Nachweis *in vivo* 54
3.4.1 Sputa 54
3.4.2 Exsudate 58

4 DISKUSSION 62

5 ZUSAMMENFASSUNG 70

6 LITERATURVERZEICHNIS 71

7 DANKSAGUNG 76

8 LEBENSLAUF 77

Abkürzungen

µ	Mikro
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CF	zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CY3	Indocarbocyanin-3
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4,6 Diamedin-2-phenylindol-dihydrochlorid
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
ISH	*in situ* Hybridisierung
KBE	koloniebildende Einheiten
M	Molar
m	milli
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PNA	Peptid Nucleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
S	Svedberg-Einheit
Tab.	Tabelle
TE	tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 *Staphylococcus*

Staphylokokken sind Kugelbakterien, die oftmals in Haufen zusammengelagert auftreten, daher stammt auch ihr Name: *staphylos* (griechisch = Traube) und *kokkoc* (griechisch = Kern, Beere).

Sie sind fakultativ anaerob, unbeweglich, nicht sporenbildend, grampositiv, Katalase-positiv und haben eine Größe von 0,5 – 1 µm. Sie gehören zu der Familie der Micrococcaceae. Staphylokokken werden nach ihrer Fähigkeit Blutserum zu koagulieren in zwei große Gruppen eingeteilt:

1. Koagulase-positive Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*)

2. Koagulase-negative Staphylokokken (Umfassen 26 Spezies)

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (= *S. aureus*) bildet auf künstlichen Nährböden goldgelblich glänzende Kolonien, daher stammt die Bezeichnung *aureus* (lateinisch = golden).

S. aureus gehört bei einem Teil der Bevölkerung und Tieren zur physiologischen Körperflora (Staphylokokkenträger) ohne dass es dabei zu Erkrankungen oder Immunantworten kommen muss. Bei etwa 10 - 40 % der Bevölkerung kommt *S. aureus* auf der Nasenschleimhaut vor. Weniger häufig ist *S. aureus* auf der Rachenschleimhaut, in den Ausführungsgängen der Brustdrüse sowie auf der Hautoberfläche zu finden. Unter dem Krankenhauspersonal findet man häufiger Träger von *S. aureus* (24). Staphylokokkenträger haben ein höheres Risiko, sich mit dem Pathogen zu infizieren (49). Man unterscheidet grundsätzlich nie Träger von intermittierenden Trägern und persistierenden Trägern (3), die Ursache hierfür ist ungeklärt (48).

Erkrankungen durch *S. aureus* treten in der Regel erst dann auf, wenn eine lokale oder allgemeine Abwehrschwäche vorliegt oder der Keim verschleppt wird. Dabei ist die Quelle häufig endogener Natur (oftmals Nase). Eine *S.*

aureus Infektion findet man besonders bei immunsupprimierte Patienten nach Organtransplantationen, HIV Infektionen, Drogenmissbrauch aber auch bei Grundleiden wie Diabetes mellitus oder zystische Fibrose (28). Die durch *S. aureus* verursachten Erkrankungen lassen sich in invasive Prozesse und Toxin-vermittelte Erkrankungen einteilen. Bei invasiven Prozessen kommt es nach der Infektion und *in situ* Vermehrung zur fortschreitenden Schädigung bedingt durch die Gesamtaktivität der Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Die Schwere der Erkrankung hängt vom Infektionsort, der Abwehrlage und der Virulenz des Infektionsstammes ab. Beispiel für invasive *S. aureus* Erkrankungen sind Abszess, eitrige Parotitis, Osteomyelitis, Endokarditis und Sepsis. *S. aureus* typische Fremdkörperinfektionen können nach Einbringen von Gefäßprothesen, Dialyseshunts, Herzklappen, Kathedern usw. auftreten. Bei Toxin-vermittelten Erkrankungen steht ein bestimmtes Toxin im Vordergrund, der eigentliche Infektionsherd kann dabei klinisch inapparent bleiben. Als Beispiele für Toxin-vermittelte *S. aureus* Infektionen seien das *Staphylococcal Scaled Skin Syndrome*, das *Toxic Shock Syndrom* und die Gastroenteritis genannt (33).

Wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus* sind Oberflächenprotein A, Clumpingfaktor, Plasmakoagulase, verschiedene Toxine (Hämolysine, Leukozidin, Epidermolysin, Enterotoxine) und ggf. eine Polysaccharidkapsel. Die Virulenz-Unterschiede zwischen den *S. aureus* Stämmen sind beträchtlich.

Die Therapie von *S. aureus* Erkrankungen erfolgt über die Gabe von Antibiotika, was sich zunehmend als schwierig gestaltet, da bereits einige Stämme über Resistenzen besonders gegenüber Methicillin verfügen (Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme = MRSA) (31). MRSA-Stämme sind außer gegenüber allen β-Lactamantibiotika häufig auch gegen andere Antibiotika wie Quinolonen resistent. Oft sind nur noch Glykopeptid-Antibiotika wirksam. Adjuvant zu der Gabe von Antibiotika sind nicht selten chirurgische Maßnahmen erforderlich. Eine verlässliche Prophylaxe zur Verhütung von Staphylokokken-Infektionen gibt es nicht.

1.3 Zystische Fibrose

Die zystische Fibrose (= CF, Synonym: Mukoviszidose) gehört zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Die Häufigkeit ist regional unterschiedlich, in Europa erkranken ca. 1 von 3000 Neugeborenen (8). Die zystische Fibrose ist eine Erkrankung mit einer verkürzten Lebenserwartung und nicht heilbar.

Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und beruht auf einem Defekt eines einzigen Genes (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator = CFTR) des langen Armes von Chromosom 7 (27). Das mutierte Gen kodiert für einen in der Membran vorwiegend epithelialer Zellen lokalisierten Chlorid-Kanal, der aktiv Chlorid-Ionen aus der Zelle transportiert. Das CFTR Gen fungiert darüber hinaus auch für die Regulation anderer Kanäle, wie den epithelialen Natriumkanal (11). Durch den gestörten Chloridtransport kommt es in exokrinen Organen zu dehydrierten und hochviskösen Sekreten (35) und dadurch zu schweren Erkrankungen im Bereich der Bronchien und des Verdauungstraktes. Ein erhöhter Elektrolytgehalt des Drüsensekrets führt zu Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten. Die auftretenden Symptome sind altersabhängig. Im Kindesalter stehen Hustenattacken im Vordergrund, oft in Verbindung mit schwer abhustbarem, zähschleimigem Sputum. Im Erwachsenenalter können weitere Folgeerscheinungen wie restriktive Ventilationsstörungen der Lunge, Pankreas- und Rechtsherzinsuffizienz hinzukommen.

Eine bakterielle Besiedelung des Sekrets ist häufig Ursache für eine rezidivierende oder chronische Bronchitis. Häufigste Erreger pulmonaler Infektionen sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *S. aureus. S. aureus* wird dabei allgemein als erstes im Sputum nachgewiesen und ist bei Kindern mit CF der am häufigsten isolierte pathogene Keim. Durch die chronische Entzündung der Lunge sowie der Obstruktion und Destruktion der Bronchien kommt es zunächst zu Bronchiektasen und im weiteren Verlauf schließlich zur narbigen Fibrose des Lungengewebes. Die respiratorische Insuffizienz ist mit etwa 85% die häufigste Todesursache der CF-Patienten.

Bei der Therapie steht aus diesem Grund die Behandlung der pulmonalen Komplikationen durch Physiotherapie (Klopfdrainage der betroffenen Lungenabschnitte), Inhalationstherapie mit Beta-2-Sympathomimetika, Mukolytika wie N-Acetyl-cystein und vor allem eine rechtzeitige und gezielte Antibiotikatherapie im Vordergrund. Die Pankreasinsuffizienz kann durch orale Substitution von Pankreasenzymen und Diät ausgeglichen werden. Eventuell ist eine Substitution von Elektrolyten erforderlich. Prognostisch erreichen ca. 80% der Patienten mindestens das 19. Lebensjahr.

1.4 Fremdkörperinfektionen

Die Verwendung von Metallen, Keramik, Titan, synthetischen Polymeren und anderen Materialien nimmt in der Medizin ständig zu. Solche Fremdkörpermaterialien finden in Form von Implantaten, Gefäßkathetern, Liquorshunts, Herzklappen, Gelenken, Schrittmachern, Linsen, Prothesen usw. einen breiten Anwendungsbereich.

Ein Problem stellt dabei die fremdkörperassoziierte Infektion dar. Die wichtigste Erregergruppe solcher Infektionen sind die Spezies der koagulase-negativen Staphylokokken, an erster Stelle *S. epidermidis* (50), aber auch *S. aureus* ist in der Lage solche Infektionen hervorzurufen (19). *S. epidermidis* lagert sich dabei gerne direkt an die Fremdkörper an, während *S. aureus* eher Proteine wie Fibrinogen oder Fibronektin, die sich primär der Fremdkörperoberfläche anlagern, zur Adhäsion nutzt (13).

Häufig wird der Fremdkörper schon während der chirurgischen Insertion bakteriell kontaminiert (20). Schon geringe Keimzahlen reichen aus, um eine spätere Infektion auszulösen. Die Bakterien lagern sich über Adhäsionskräfte innerhalb von wenigen Minuten an den Fremdkörper an und wachsen dann während der so genannten Akkumulationsphase in zusammenhängenden Zellverbänden in den freien Raum hinein (siehe Abb. 1).

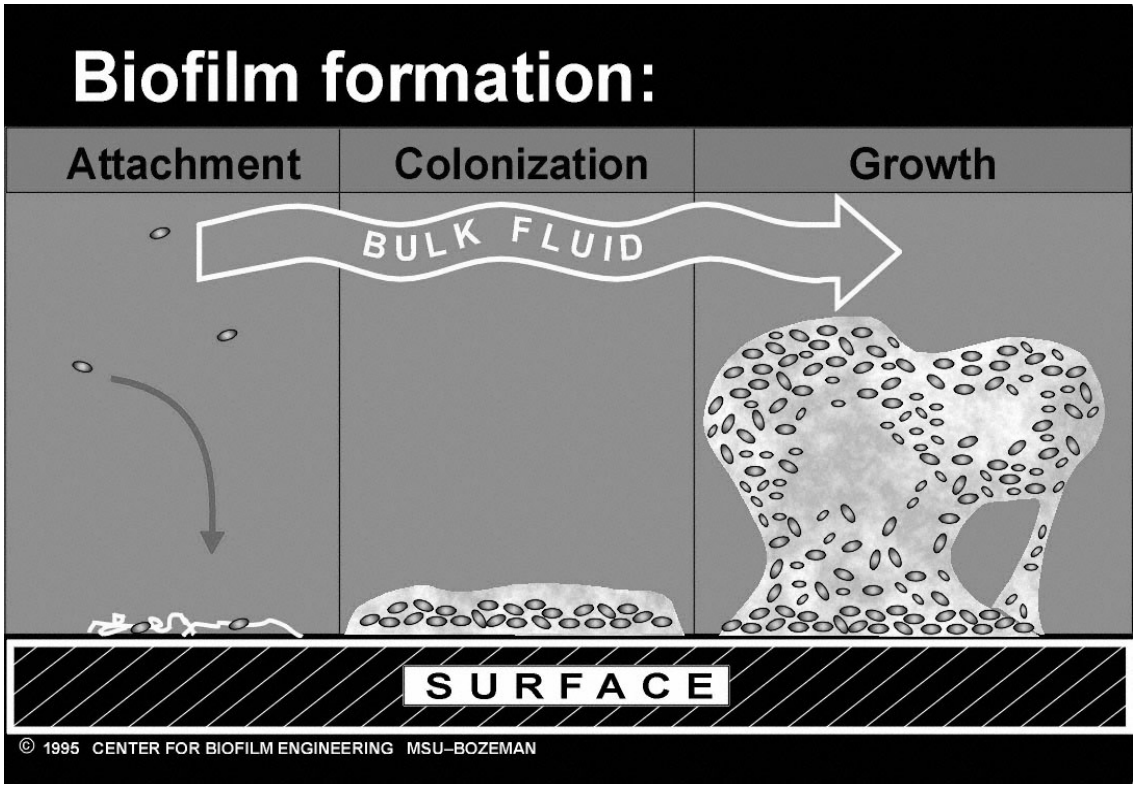


Abb. 1: Entstehung eines bakteriellen Biofilms

Die so entstandene Matrix wird als Biofilm bezeichnet und kann bis zu 160 µm dick werden (6). Ein solcher Biofilm setzt sich aus multiplen Bakterienzelllagen, extrazellulärem Schleim und Proteinen zusammen (42).

Die Einbettung der Bakterien in dieser extrazellulären Schleimsubstanz ist die Erklärung für die Persistenz solcher Infektionen. Meistens sind weder der Wirtsorganismus selbst noch eine chemotherapeutische Behandlung in der Lage die Erreger vollständig zu eliminieren. Häufig kann nur eine Suppression des Infektionsgeschehens erfolgen (51). Während der Implantation solcher Fremdkörper sind daher strenge aseptische Bedingungen zu fordern. In Bezug auf den Fremdkörper selbst werden präventiv momentan zwei Ansätze verfolgt: zum einen die Herstellung von antimikrobiell wirkenden Oberflächen, zum andern die Entwicklung von antiadhäsiven Oberflächen.

1.5 Genexpression und Metabolismus

Unter Genexpression versteht man die einer Regulation unterliegenden Biosynthese eines spezifischen Genproduktes. Die in den Genen (aus Desoxyribonukleinsäure (= DNA) bestehend) gespeicherte Information muss in die Sequenz der in den Proteinen vorliegenden Aminosäuren übersetzt werden. Die Messenger-Ribonukleinsäure (= mRNA) fungiert dabei als Übermittler zwischen DNA und Proteinsynthese am Ribosom. Die Umkopierung von DNA in mRNA wird als Transkription bezeichnet. Unter Translation versteht man die Umsetzung der Information der mRNA in die Sequenz der Aminosäuren. Dieser Vorgang läuft an den Ribosomen ab und wird als Proteinsynthese bezeichnet. Mit Hilfe der Transfer-RNA (= tRNA) werden die entsprechenden Aminosäuren zum Ribosom transportiert und dort zu Peptidketten verknüpft. Die Proteinsynthese ist ein energieverbrauchender Prozess.

Regulationsmechanismen von Bakterien zeichnen sich durch starke Anbindung an den Wachstumszyklus aus. Bakterien können über Autoinduktionssysteme ihre eigene Zelldichte messen und entsprechende Gene dichteabhängig exprimieren (9). Ein solcher Vorgang wird als Quorum-Sensing bezeichnet. Bei einer *S. aureus* Infektion steht zum Beispiel zu Beginn die Expression von Fibronektinbindeproteinen und Protein A im Vordergrund. Wird eine höhere Zelldichte erreicht, werden weniger Oberflächenproteine aber mehr Sekretproteine exprimiert. Die Basis für dieses Verhalten ruht bei *S. aureus* in den Genen *agr* (accessory gene regulator) und *sar* (staphylococcal accessory regulator). Es kommt aber auch zur differentiellen Regulation in Abhängigkeit von der Teilungsrate (2,5,38,47). So beschreibt C. Condon *et al.*, dass bei *Escherichia Coli* (= *E. coli*) die Anzahl an Ribosomen pro Zelle und die Teilungsrate korreliert, die Regulation findet dabei auf Transkriptionsebene statt. Es gibt jedoch unterschiedliche Vorstellungen, wie die Regulation im Detail abläuft. Eine wesentliche Steuerung beruht wohl auf der internen Konzentration von pyrophosphorylierten GDP bzw. GTP-Derivaten (ppGpp). Eine hohe intrazelluläre ppGpp Konzentration tritt bei geringer Teilungsaktivität auf und führt zur Inhibition der ribosomalen RNA (= rRNA) Transkription.

Bakterien mit geringer Teilungsaktivität können sich dadurch auszeichnen, dass sie gegenüber Antibiotika vermehrt Resistenzen entwickeln, ihre Zellhydrophobizität ändern, Sauerstoffmangel sowie Hitze besser tolerieren, höhere Mutationsraten entwickeln usw. (47,52). Besonders im Hinblick auf die Anwendung von Antibiotika bei CF-Patienten mit einer chronischen *S. aureus* Lungeninfektion spielt dies eine große Rolle. Auch ist erwiesen, dass viele Antibiotika nur gegen Bakterien wirken, die im Begriff sind sich zu teilen. Sollten die *S. aureus* Bakterien *in vivo* eine verminderte Teilungsaktivität zeigen, ist der Einsatz von Antibiotika neu zu bewerten.

Schon seit 1966 ist bekannt, dass bei *E. coli* die Anzahl der Ribosomen pro Zelle mit der Teilungsrate korreliert (34). Mehrere Mechanismen führen dazu, dass Bakterien unter Nährstoffmangel bei verminderter Teilungsrate einen geringeren RNA Gehalt aufweisen als Bakterien mit hoher Stoffwechselaktivität. Bei *S. aureus* ist ein solches Verhalten noch nicht gezeigt worden und ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die RNA ist ein Polynukleotid, welches zur Übertragung genetischer Informationen in der Zelle dient. Sie besteht aus ribosehaltigen Nukleotiden mit den Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil. Die wichtigsten Formen der RNA im Zellstoffwechsel sind mRNA, tRNA und rRNA. Prozentual gesehen macht die rRNA mit 80% vor der tRNA mit 15% und der mRNA mit 5% den Großteil der Gesamt-RNA aus (29). Daher wird der Gehalt an rRNA mit dem Gesamt-RNA Gehalt an einigen Stellen dieser Arbeit gleichgesetzt.

Ribosomen sind RNA reiche Partikel, an denen die Proteinbiosynthese stattfindet. Die Ribosomen von Bakterien bestehen aus einem 70S großen Partikel, der sich aus einer 50S und einer 30S Untereinheit zusammensetzt. Die große Untereinheit enthält 23S und 5S rRNA sowie 34 Proteine, die kleine Untereinheit enthält 16S rRNA und 21 Proteine.

Die Verschiedenheit aller Organismen beruht auf Sequenzunterschieden der DNA bzw. RNA. Alle Informationen über Aufbau, Struktur, Aktivität und Funktion eines Organismus sind darin enthalten. Die Kenntnis dieser

Nukleotidsequenzen stellt die Basis der molekularbiologischen Nachweisverfahren dar. Für den Nachweis von Bakterien eignen sich prinzipiell alle Nukleotidsequenzen. Häufig wird jedoch rRNA als Zielsequenz verwendet, da diese meist in hoher Kopiezahl vorliegt und somit eine gute Nachweisintensität erlaubt (10).

Die *in situ* Hybridisierung (= ISH) ist eine Methode, die es ermöglicht Nukleinsäuresequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen nachzuweisen. Dies geschieht direkt im biologischen Präparat (daher „*in situ*" = vor Ort). Die Technik dazu wurde von Pardue und Gall (1969) sowie von John *et al.* (1969) erstmals beschrieben (23,41).

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (= FISH) wurde Ende der 80er Jahre entwickelt (1,2,7,43) und greift auf die Technik der ISH zurück, verwendet als Markermoleküle jedoch Fluoreszenzfarbstoffe statt radioaktivem Material, Biotin oder Digoxigenin. Das Prinzip der FISH beruht auf der Paarung von fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresonden (= Sonde) mit komplementären Nukleinsäurezielsequenzen. Es bildet sich also aus zwei einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen ein doppelsträngiges Molekül (siehe Abb. 2).

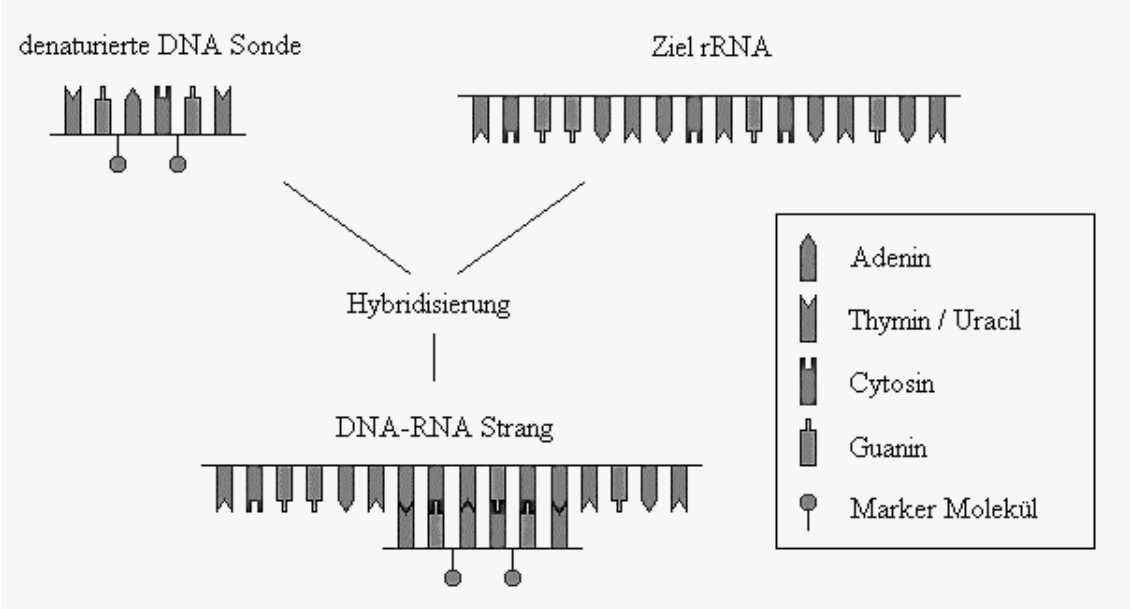


Abb. 2: Funktionsweise der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von rRNA mit einer DNA Sonde

Die Bildung des doppelsträngigen Moleküls (= Hybridisierung) beruht auf intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen der Einzelstränge.

Es kann prinzipiell sowohl DNA als auch RNA als Sondenmaterial verwendet werden. Wichtig ist nur, dass die Sonde die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA bzw. RNA aufweist und mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Cy3, Cy5 oder FLUOS markiert wurde. Oftmals besteht die Sonde aus einem synthetisch hergestellten Oligonukleotid mit 20 bis 100 Basenpaaren. Solche Sonden können aufgrund ihrer geringen Größe allerdings nur wenig Fluoreszenzfarbstoff tragen. Wenn die Zielsequenz aber in ausreichender Kopiezahl vorliegt ist diese Sondenart hoch effektiv (18). Doppelsträngige Sonden und Zielsequenzen müssen vor der Hybridisierung einsträngig vorliegen, dies geschieht zum einen durch Zusätze des Hybridisierungspuffers (Formamid), zum anderen durch die Hybridisierungstemperatur. Da die Sonde im Überschuss verwendet wird muss eine so genannte Stringenzwaschung erfolgen. Dabei wird nicht oder falsch oder inkomplett gebundenes Sondenmaterial abgewaschen um falsch positive sowie Hintergrundsignale zu vermeiden. Die Fluoreszenz-markierten Proben können anschließend direkt im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden. Das Mikroskop muss mit einem speziellen Anregungsfilter ausgestattet sein, der der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes entspricht. Damit die Fluoreszenzfarbe nicht ausbleicht und unempfindlicher gegen Lichteinfall wird kann ein so genanntes Antifading beim Eindecken verwendet werden (32).

Oft wird nach der FISH noch ein Counterstaining vorgenommen. Darunter versteht man das Anfärben der zellulären DNA, normalerweise mittels 4,6 Diamedin-2-phenylindol-dihydrochlorid (= DAPI).

Grampositive Bakterien wie *S. aureus* sind aufgrund der Zellwandbeschaffenheit schwerer zu hybridisieren als gramnegative Bakterien. Für die Sonde stellt daher die Überwindung der Zellwand ein großes Problem bei der Hybridisierung dar. Seit kurzem sind so genannte peptidische Nucleinsäuresonden (= PNA Sonden) auf dem Markt. Die PNA kommt in der

Natur nicht vor und ist ein ungeladenes, DNA-analoges Molekül, in dem eine N-(2-aminoethyl)glycin-Struktur die normale Zucker-Phosphat-Struktur des Rückgrats der DNA ersetzt (siehe Abb. 3 und 4).

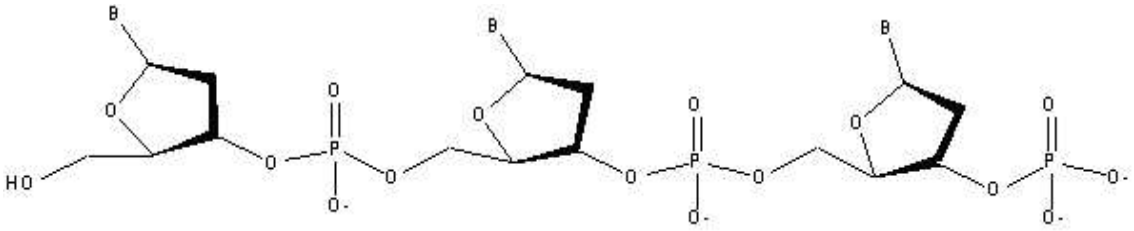


Abb. 3: Struktur der DNA

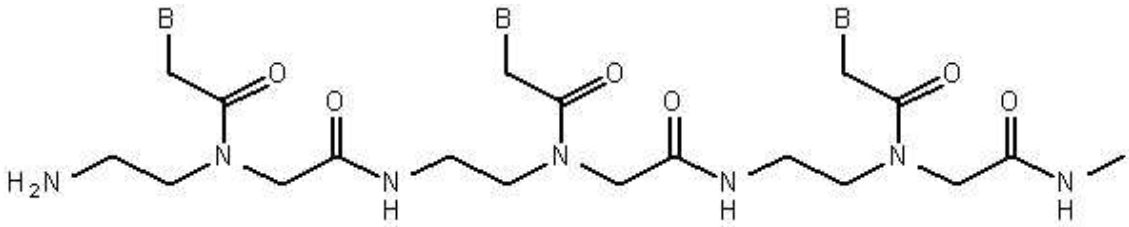


Abb. 4: Struktur der PNA

Die PNA erhält dadurch einzigartige chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften. Dazu zählen eine hohe chemische und biologische Stabilität bei gleichzeitigem Erhalt der spezifischen Affinität zu komplementären Nukleinsäuren. PNA wurde zu Beginn der 90er Jahre erstmals von Prof. Peter Nielsen synthetisiert und in Folge kommerziell von Boston Probes, USA vertrieben (12,37).

Die Möglichkeit PNA Sonden auch bei der FISH zu verwenden ist neu. Die Verwendung von *S. aureus* spezifischen PNA Sonden wurde erstmals von K. Oliveira *et al.* im Jahr 2002 beschrieben (40). Die Sonde wird in der Diagnostik bereits zum Nachweis von *S. aureus* eingesetzt.

Vorteile der PNA Sonde gegenüber DNA bzw. RNA Sonden sind:

- Die Stabilität von PNA:DNA und PNA:RNA Hybriden ist größer als die der korrespondierenden DNA:DNA bzw. DNA:RNA Hybriden (12).
- Eine hohe Spezifität sorgt für eine geringere Anzahl an falschen Bindungen zwischen PNA Sonde und Zielsequenz

- PNA Sonden tolerieren aufgrund des neutralen Strangrückgrates auch niedrige Salzkonzentrationen während der Hybridisierung
- PNA Sonden besitzen eine hohe Stabilität gegenüber Nucleasen und Proteasen
- PNA Protokolle sind einfacher und schneller in der technischen Durchführung als herkömmliche FISH Techniken
- Die im Vergleich zu DNA Sonden hydrophobere Natur der PNA Sonden ermöglicht eine leichtere Penetration durch die Zellwand

Die Weiterentwicklung der FISH hält an, ständig werden neue Fluoreszenzfarbstoffe und sensitivere Fluoreszenzmikroskope entwickelt. Mit speziellen Mikroskopen ist sogar eine dreidimensionale Darstellung möglich.

Die FISH gibt einem außerdem die Möglichkeit, direkt die metabolische Aktivität von Bakterien zu messen. Dies ist möglich, da Bakterien während der Wachstumsphase über mehr rRNA verfügen als in stationären Phasen und somit die Signalintensität der FISH mit der Wachstumsphase korreliert. Poulsen *et al.* beschrieb im Jahre 1993 erstmals dieses Verfahren (44) und stellt somit die Basis für die in dieser Arbeit durchgeführten FISHs dar.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation sollte darin liegen, Methoden zur Bestimmung der rRNA von *S. aureus in vitro* und *in vivo* zu entwickeln. Die Methoden sollten zunächst *in vitro* entwickelt und optimiert werden um dann auch *in vivo* durchgeführt werden zu können.

Arbeiten in diese Richtung wurden bisher bei *S. aureus* nicht durchgeführt. Mit Hilfe von RNA Isolierung während verschiedener Wachstumsphasen sollte der rRNA-Gehalt pro Zelle *in vitro* bestimmt werden. Die Bestimmung der rRNA sollte durch photometrische Messungen, Gel-Elektrophorese, Slotblot und FISH erfolgen. Parallel dazu sollte auch eine photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgen.

Anschließend sollte die etablierte FISH Methode *in vivo* angewendet werden. Dies sollte zum einem mit Sputumproben von CF-Patienten mit einer

chronischen *S. aureus* Lungeninfektion und zum anderen bei *S. aureus* Fremdkörperinfektionen im Tiermodell (Meerschweinchen) erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Sonden, Antikörper, Enzyme

Chemikalien:

Agarose	BMA, Rockland, USA
Antifading	Dako floureszent mounting medium, Carpanteria, USA
CSPD	Roche, Mannheim
DAPI	Sigma, München
nucleasefreies Wasser	Ambion, Wiesbaden
Poly-L-Lysin	Sigma, München
Staphaurex	Murex, Burgwedel
Trizol	Gibco BRL, Berlin

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien sind Standardprodukte und können überall bezogen werden.

Sonden:

EUB	MWG, Ebersberg
Flu-Staph (PNA)	Boston Probes, Bedford, USA
SAP-2	Thermo Hybaid GmbH, Ulm
STAU	MWG, Ebersberg
rRNA DIG	Thermo Electron, Dreieich

Antikörper:

Anti-Digoxigenin AP	Roche, Mannheim

Enzyme:

Lysostaphin	Ambi, UK

2.1.2 Medien und Stammlösungen

Bluejuice	5 ml Glycerin (50%), 200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, 25 mg Bromphenolblau mit Wasser auf 10 ml auffüllen.
CYPG	10 g Casaminosäure, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 935 ml dest. H_2O suspendieren und autoklavieren. 25 ml 20% Glucoselösung und 40 ml 1,5 M Glycerophosphat zugeben.
DIG wash and block buffer set	Roche, Mannheim
High-SDS	7% SDS, 5x SSC, 2% Blocking, 50 mM Na-Phosphat, ph 7,0, 0,1% N-Lauroylsarcosin
10 x MOPS	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 6,7
1 x PBS	7 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH_2PO_4, 130 mM NaCl, pH 7,4
Schafblutagarplatten	Heipha, Heidelberg
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7
10 x TE	10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8

2.1.3 Bakterienstämme

Staphylococcus epidermidis 1457

Staphylococcus aureus Stämme:

Newman

ALC355 (Newman, Δ*agr::tet*)

AS 3 (Newman *sae*::Tn*917*)

CW 25 (Newman, Δ*ica::tet*)

RN 6390

SA 113

2.1.4 Geräte, Materialien, PC-Programme

Homogenisator	BioSavant, Dianova, Hamburg
Mikroskop	Zeiss Axioplan, Jena
Mikroskopkamera	Zeiss Axio Cam, Jena
Mikroskopfilter	Zeiss Filter Set Nr. 2, Jena
	Zeiss Filter Set Nr.9, Jena
	HQ Filter F 41-007, AF Analysetechnik, Tübingen
Objektträger	Medco, München
Photometer	Milton Roy, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNA-Tubes	Dianova, Hamburg

RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Slotblotter	Biorad, München
WINCAM 3.0	Cybertech, Berlin

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht in Flüssigkulturen

10 ml CYPG in sterilen Reagenzgläsern wurden aus einer Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (210 rpm) angezogen. Bei Stämmen mit Antibiotika-Resistenzgenen wurde der Vorkultur das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die Ernte erfolgte in Abhängigkeit von der gewünschten Wachstumsphase, kontrolliert wurde dies photometrisch über die optische Dichte (= OD).

Zur Identifizierung von *S. aureus* wurde Staphaurex verwendet. Die Aufbewahrung von Reinkulturen erfolgte bei -70°C in einem Gemisch aus CYPG und Glycerin im Verhältnis 3:1.

2.2.2 KBE Bestimmung

Eine Flüssigkultur wurde zu verschiedenen Zeiten geerntet. Dabei wurde die OD photometrisch bestimmt und 100 µl der Kultur in ein Eppendorfcup überführt. Aus diesen 100 µl wurde eine Verdünnungsreihe mit 0,9% NaCl hergestellt (1:10 Verdünnungen). Es waren 9 Verdünnungsstufen notwendig. Jeweils 10 µl der letzten 4 Verdünnungsstufen wurden auf Blutagarplatten aufgetropft und bei 37°C für 12 h inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung der Bakterienkolonien. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen konnte die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (= KBE) im Ausgangsmedium berechnet werden.

2.2.3 RNA Isolierung

Anmerkung: Bei allen Methoden der RNA Isolierung ist ein sauberes Arbeiten (Tragen von Handschuhen, Benutzung spezieller Pipetten, Cups etc.) dringend erforderlich.

2.2.3.1 Trizol Methode

Diese Methode erlaubt die gleichzeitige Isolierung von RNA und DNA. Eine Flüssigkultur wurde zentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml Trizol suspendiert und in ein Schraubgefäß mit Glasperlen (100 µl) überführt. Die Gefäße wurden 2 x 20 s bei 6500 rpm im Homogenisator geschüttelt und dann bei -70°C eingefroren. Dies erfolgte, da alle Proben auf einmal weiterverarbeitet werden sollten und nur so eine Gleichbehandlung bei Ernte zu verschiedenen Zeitpunkten garantiert werden konnte. Nach dem Auftauen der gesamten Proben bei Zimmertemperatur wurden den Schraubgefäßen 200 µl Chloroform zugegeben, für 30 s leicht geschüttelt und anschließend für 3 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die darauf folgende Zentrifugation erfolgte für 15 Minuten bei 12.000 g und 4°C. Der Inhalt der Schraubgefäße ist nun in 3 Phasen unterteilt und es wurde vorsichtig die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, mit einer Pipette abgesaugt. Es wurde stets die gleiche Menge an wässriger Phase (580µl) abnommen damit alle Proben die gleiche Behandlung erfahren. Für die spätere DNA-Isolierung wurde an dieser Stelle nach sorgfältiger Entfernung der geringen Überreste an wässriger Phase auch die 2. Phase (Interphase) und die 3. Phase (Phenolphase), abgesaugt und bei 6°C aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde mit 500 µl Isopropanol in Eppendorfcups gegeben und nach kurzem Umschütteln 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die darauf folgende Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 12.000 g und 4°C. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol zum Waschen gevortext und bei 7.500 g für 5 Minuten bei 4°C nochmals abzentrifugiert. Der Überstand an Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet für ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 50 µl H_2O (nucleasefrei) gelöst, dann für 10 min bei

55℃ inkubiert und anschließend bei -70℃ eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei A_{260}.

2.2.3.2 Qiagen Methoden

Methode 1: Enzymatische Isolierung von RNA mit dem Qiagen Kit RNeasy

400 µl einer Flüssigkultur wurden in ein 2 ml Eppendorf Cup überführt. Anschließend wurden 800 µl des RNAprotect Reagenzes hinzugefügt, 5 s gevortext und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes erfolgte eine Zentrifugation mit 5000 g für 10 min, der Überstand wurde danach mit einer Wasserstahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden 200 µl TE Puffer und 2µl Lysostaphin zugegeben, für 10 s gevortext und der Ansatz für 10 min bei 37℃ inkubiert. Dann wurden 700 µl RLT Puffer hinzugefügt und wiederum gevortext. Nach Zugabe von 500 µl 96%igem Ethanol wurde mit der Pipette dieser Ansatz vorsichtig gemischt und in die RNeasy Mini Säule gegeben. Die Säule wurde für 15 s bei 8000 g zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Dann musste die Säule mit 700 µl RW1 Puffer bei 8000 g für 15 s gewaschen werden. Der Waschpuffer wurde danach verworfen, ebenso die Auffangröhre, welche durch eine neue ersetzt wurde. Es folgte ein erneuter Waschschritt mit 500 µl RPE Puffer bei 8000 g für 15 s. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Schritt wiederholt, nun allerdings mit 2-minütiger Zentrifugation. Nachdem auch dieser Überstand verworfen wurde folgte nun die Auswaschung der RNA. Dazu wurde eine neue Auffangröhre über die Säule gesteckt und die Säule mit 50 µl H_2O (nucleasefrei) für 1 min bei 8000 g gespült. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei A_{260}. Die Proben wurden bei -70℃ aufbewahrt.

Methode 2: Mechanische Zerstörung und enzymatische Isolierung von RNA mit dem Qiagen Kit RNeasy

Einem 2 ml Eppendorf Cup wurden 400 µl einer Flüssigkultur zugegeben. Anschließend wurden 800 µl des RNAprotect Reagenzes hinzugefügt, 5 s gevortext und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes erfolgte eine Zentrifugation mit 5000 g für 10 min, der Überstand wurde danach

mit einer Wasserstahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Dann wurden 700 µl RLT Puffer hinzugefügt und für 10 s gevortext. Dieser Ansatz wurde in ein neues 2 ml Cup gegeben, welches mit 50 mg Glasperlen (in Säure gewaschen, Größe der Perlen zwischen 150-600 µm) gefüllt war. Das Cup wurde 2 x 20 s im Homogenisator bei 6500 rpm geschüttelt und danach für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Cup mit 700 µl 70% Ethanol vorsichtig mit der Pipette vermischt und anschließend auf die RNeasy Mini Säule gegeben. Die Säule wurde für 15 s bei 8000 g zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Dann musste die Säule mit 700 µl RW1 Puffer bei 8000 g für 15 s gewaschen werden. Der Waschpuffer wurde danach verworfen, ebenso die Auffangröhre, welche durch eine neue ersetzt wurde. Es folgte ein erneuter Waschschritt mit 500 µl RPE Puffer bei 8000 g für 15 s. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Schritt wiederholt, nun allerdings mit 2-minütiger Zentrifugation. Nachdem auch dieser Überstand verworfen wurde folgte nun die Auswaschung der RNA. Dazu wurde eine neue Auffangröhre über die Säule gesteckt und die Säule mit 50 µl H_2O (nucleasefrei) für 1 min bei 8000 g gespült. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei A_{260}. Die Proben wurden bei -70°C aufbewahrt

2.2.4 DNA Isolierung mit Trizol

An die RNA Isolierung mit Trizol schließt sich die DNA Isolierung an (siehe 2.2.3.1). Nachdem die wässrige Phase mit der RNA vollständig entfernt wurde musste die organische Phase (Interphase plus Phenolphase) vorsichtig abgesaugt werden. Es wurden stets 350 µl an organischer Phase abgesaugt, dabei ist besonders darauf zu achten keine Glaskügelchen mitzuführen (zu schnelles Absaugen führt zu Verwirbelungen im Schraubgefäß). Die organische Phase wurde in ein Eppendorfcup mit 300 µl 100%igem Ethanol überführt und leicht geschwenkt. Die Probe wurde 3 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend bei 4°C 5 min bei 2000 g abzentrifugiert. Dann wurde der komplette Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml 0,1 M Natriumcitrat in 10% Ethanol 2-mal gewaschen. Das DNA Pellet blieb jeweils 30 min bei Raumtemperatur in der Waschlösung (ab und zu vortexen) bevor es für

5 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert wurde. Nach Absaugen der Waschlösung wurde das Pellet in 2 ml 75% Ethanol 30 min lang bei Raumtemperatur gelegentlich gevortext und dann bei 4°C und 2000 g für 5 min zentrifugiert. Nach diesem letzten Waschschritt wurde nach Absaugen des Überstandes das Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 50 µl 8 mM NaOH gelöst. Da die Lösung noch unlösliche Membranfragmente enthielt musste sie ein letztes Mal zentrifugiert werden (12.000 g für 5 min bei Raumtemperatur). Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Cup gegeben und die DNA Konzentration photometrisch bei A_{260} bestimmt.

2.2.5 RNA Gel-Elektrophorese

Für die Herstellung des Gels wurden 0,8 g Agarose mit 64 ml nucleasefreiem H_2O 4 min lang bei 440 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzer Abkühlung wurden 4 ml 37% Formaldehyd und 8 ml 10 x MOPS zugegeben und auf den Gelträger ausgeschüttet.

Zur Herstellung des Probenpuffers für die RNA wurden 750 µl Formamid, 262 µl Formaldehyd, 150 µl 10 x MOPS, 5 µl Ethidiumbromid [10mg/ml] in einem Eppendorfcup gemischt.

2 µl RNA wurden mit 2 µl nucleasefreiem H_2O vermischt und 4 Verdünnungsstufen (ebenfalls mit nucleasefreiem H_2O) im jeweils 1:2 Verhältnis hergestellt. Zu jeder Probe wurden 6 µl Probenpuffer zugegeben und bei 65°C für 10 min erhitzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 2 µl Bluejuice bevor die Proben bei 65 Volt in 1 x MOPS aufgetrennt wurden. Nach etwa 2 h wurde das Gel unter UV Licht sichtbar gemacht und digital abfotografiert.

2.2.6 Slotblot der 16S rRNA

Zur Vorbereitung wurden 3 Lagen dickes Filterpapier und eine positiv geladene Nylonmembran angefeuchtet (nucleasefreies H_2O) und im Slotblotter positioniert. Die Schrauben mussten nach Anlegen des Vakuums (über Wasserstrahlpumpe) noch einmal nachgezogen werden um eine absolute

Dichtheit der Slots zu gewährleisten. 1 ml 10 mM NaOH / 1 mM EDTA wurden mit 5 µl RNA gemischt und 4 weitere Verdünnungen im jeweils 1:5 Verhältnis mit 10 mM NaOH / 1 mM EDTA hergestellt. Die Slots wurden mit 200 µl 10 mM NaOH / 1 mM EDTA gespült und anschließend mit jeweils 200 µl der Proben beladen. Ein Nachspülen erfolgte ebenfalls mit 200 µl 10 mM NaOH / 1 mM EDTA. Nach Entnahme des Filters wurden die Proben durch beidseitiges Crosslinken (125 mJoule) an die Membran gebunden. Die Membran wurde in einem Glaszylinder mit 10 ml vorgewärmter High-SDS-Lösung bei 64°C für 30 min vorhybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht mit 10 ml High-SDS-Lösung und 1 µl Sonde (rRNA DIG, GCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTC). Es folgten mehrere Waschschritte: 2-maliges Waschen mit 10 ml 2 x SSC für jeweils 5 min bei Raumtemperatur, anschließend 2-maliges Waschen mit 0,2 x SSC für jeweils 5 min bei 64°C.

Zur Detektion wurden folgende Lösungen verwendet (DIG wash and block buffer set der Firma Roche)

- Maleinsäure
- Waschpuffer
- Blockierungslösung
- Detektierungspuffer

Nach 1 min Waschen mit dem Waschpuffer wurde die Membran mit 10 ml Blockierungslösung für mindestens 30 min vorgeblockt. Das eigentliche Blocken erfolgte für exakt 30 min mit 10 ml Blockierungslösung und 1 µl Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP). Anschließend wurde die Membran 2-mal mit Waschpuffer für jeweils 15 min gewaschen und dann mit 1 ml Detektierungspuffer für 2 min vordetektiert. Die Detektierung erfolgte mit 1 ml Detektierungspuffer und 10 µl CSPD für 5 min. Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Nach 1-3 h bei 37°C im Brutschrank wurde der Film entwickelt und zur besseren Auswertung digital abfotografiert. Eine objektive Messung der Helligkeit der einzelnen Slots wurde mit dem Computerprogramm WINCAM 3.0 durchgeführt.

2.2.7 FISH der 16S rRNA

2.2.7.1 Auftragen von Bakterien auf Objektträger

Um eine geeignete Bakteriendichte auf dem Objektträger zu erhalten wurden diese etwa in der Größenordnung 1 x 10^7 KBE aufgetragen. Die Verdünnung erfolgte in PBS, zuvor wurden die Bakterien 2-mal in PBS gewaschen (vortexen in 1 ml PBS und anschließend abzentrifugieren der Bakterien). Die Verdünnung erfolgte nach folgendem Schema:

t1: 1 ml Kultur in 1 ml PBS

t2: 100 µl Kultur in 500 µl PBS

t3: 100 µl Kultur in 1ml PBS, anschließend nochmals 1:5 mit PBS verdünnen

t4: 100 µl Kultur in 1ml PBS, anschließend nochmals 1:10 mit PBS verdünnen

t5: 100 µl Kultur in 1ml PBS, anschließend nochmals 1:10 mit PBS verdünnen

Ein Objektträger war in 10 einzelne Felder unterteilt. Auf ein Feld wurden immer 10 µl getropft und etwa 5 h luftgetrocknet bis jegliche Flüssigkeit verdunstet war. Danach wurden die Objektträger hitzefixiert (3-maliges kurzes durchziehen durch eine Gasflamme) und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 80%, 96%) dehydriert (jeweils 3 min pro Ethanolbad). Die Objektträger wurden nun wiederum getrocknet und konnten so mehrere Monate aufbewahrt werden. Eine Negativkontrolle erfolgte durch Verwendung des Bakterienstammes *S. epidermidis* 1457.

Für die *in vivo* Versuche wurden Sputa bzw. Exsudate folgendermaßen behandelt: die Sputa wurden vorher mechanisch durch Zentrifugation (2 min bei 18.000 g) zerkleinert (QIAshredder), sonst war es aufgrund der Zähigkeit des Sputums nicht möglich Proben auf die Objektträger aufzutragen. Versuche, den Schleim vorher im Verhältnis 1:1 mit 1M Acetylcystein zu behandeln brachten keinerlei Verbesserungen ein und standen im Verdacht auf den Bakterienmetabolismus einzuwirken, da die Einwirkung unter Hitze stattfinden musste. Auch eine Verwendung von 1% Chaps bei 37°C für 10 min wurde getestet, brachte aber keinerlei Verbesserungen ein, so dass es bei der rein

mechanischen Vorbehandlung der Sputa blieb. Bei den Exsudaten wurden Objektträger mit einer Poly-L-Lysin Beschichtung verwendet.

2.2.7.2 Hybridisierung

Lysieren der Bakterien

Die Lysierungslösung bestand aus 0,05% Saponin in TE Puffer mit Lysostaphin in der Konzentration von 10 µg / ml. 10 µl dieser Lösung wurden auf jedes Feld des Objektträgers aufgebracht um bei 37°C 3 min lang einzuwirken. Es waren zahlreiche Versuchsreihen nötig um die Lysierung zu optimieren. Vor allem die Einwirkzeit der Lysierungslösung, aber auch die Konzentration an Lysostaphin spielten hier eine Rolle. Zu hohe Lysostaphinkonzentrationen bewirkten eine zu schnelle Lysierung, so dass der Lysierungsprozess nicht kontrolliert werden konnte und daher nicht reproduzierbar war. Eine zu niedrige Lysostaphinkonzentration führte zu einer langen Lysierungsdauer, was möglicherweise negative Einflüsse auf die Bakterien hatte und außerdem den Gesamtablauf zeitaufwendiger gestaltete. Auch wurde die Lysierungslösung verändert indem Lysozym und Saponin mit dem Lysostaphin kombiniert wurden. Das Optimum hinsichtlich Lysierungslösung und Lysierungsdauer wurde schließlich in der oben genannten Kombination gefunden. Um die Lysierung zu stoppen wurde nach dem Absaugen der Lysierungslösung 2-malig 1 M Tris ph 8 aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Lufttrocknung des Objektträgers.

Hybridisierung

Zuerst wurde pro Objektträger 1 ml an Hybridisierungspuffer (Stringenz: 43%) hergestellt: 430 µl Formamid, 370 µl H_2O (nucleasefrei), 180 µl 5 M NaCl, 20 µl 1 M Tris ph 8, 1 µl 10% SDS. 90 µl des Hybridisierungspuffers wurden mit 10 µl Sonde [50 ηg / µl] vermischt und jeweils 10 µl auf jedes Feld getropft. Es wurden je nach Fragestellung verschiedene Sonden verwendet: a) SAP-2 5`-AGA GAA GCA AGC TTC TCG TCC g-3` 5`Cy3 markiert; b) EUB 5`-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3` 5`Cy3 markiert; c) STAU 5`-AGA GAA GCA AGC TTC TCG TCC G-3` 5`Alexa Fluor markiert. Der Rest an Hybridisierungspuffer wurde für die Herstellung einer feuchten Kammer verwendet. Dazu wurde ein

50 ml Falcon mit einem Streifen Filterpapier in Objektträgergröße bestückt und mit dem Hybridisierungspuffer getränkt. In diese Kammer wurde der Objektträger eingebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass der Objektträger möglichst waagerecht in der Kammer platziert ist, ebenso sollte kein Licht in die Kammer eindringen (entweder Benutzung eines dunklen Hybridisierungsofens oder die feuchte Kammer mit Alufolie abdunkeln). Die Hybridisierung erfolgte bei 43°C für 3 Stunden. Während der Hybridisierung erfolgte die Herstellung des Waschpuffers (Stringenz: 1%): 9 ml 5 M NaCl, 1 ml 1 M Tris ph 8, 50 µl 10% SDS, 40 ml H_2O (nucleasefrei). Der Waschpuffer wurde auf 43°C vorgewärmt. Nach Absaugen der Hybridisierungslösung wurden zügig (um die Temperaturverluste so gering als möglich zu halten) 10 µl an Waschpuffer auf jedes Feld getropft und in der feuchten Kammer für 20 min bei 43°C zurück in den Ofen gestellt. Danach wurde der Waschpuffer mit H_2O (nucleasefrei) vorsichtig abgespült und der Objektträger im Dunkeln getrocknet.

DAPI Färbung

Nach der Hybridisierung wurden 10 µl DAPI [1µg / ml] auf jedes Feld getropft und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das DAPI abgesaugt und der Objektträger nochmals mit H_2O (nucleasefrei) abgespült bevor er wieder getrocknet wurde. Die Eindeckung erfolgte mit einem Tropfen Antifading und einem Deckglas.

Detektion

Die Bakterien wurden mit einem Zeiss Axioplan-Fluoreszenzmikroskop mit einer 50 Watt Quecksilberdampflampe bei 1000-facher Vergrößerung durch das Ölimmersionsobjektiv betrachtet und digital abfotografiert (Zeiss Axio Cam). Folgende Filtersätze wurden verwendet: Zeiss Filtersatz Nr. 2 für DAPI (Anregung 365 nm; Strahlenteiler 395; Langpassfilter 420 nm) und HQ Filter F41-007 (AF Analysetechnik, Tübingen) für Cy3 markierte Sonden (Anregung 530 - 545 nm; Strahlenteiler 365 nm; Bandpassfilter 610 – 675 nm).

2.2.7.3 PNA Hybridisierung

Bei der PNA Hybridisierung sind keine Schritte zur Lysierung der Bakterien nötig. Die Sonde dringt aufgrund verschiedener Eigenschaften (vor allem ihrer

Hydrophobie) ohne Vorbehandlung in die Zellen ein. Der Hybridisierungspuffer wurde wie folgt hergestellt: 10% Dextransulfat, 10 mM NaCl, 30% Formamid, 0,1% Sodiumpyrophosphat, 0,2% Polyvinylpyrrolidone, 0,2% Ficoll, 5 mM disodium EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (ph 7,5). 158,8 µg an PNA Sonde (Flu-Staph Flu-OO-GCT-TCT-CGT-CCG-TTC, Fluorescein markiert) mussten mit 342 µl H_20 (nucleasefrei) vermischt werden um eine 100 µM stock solution zu erhalten. Diese wurde in Aliquots zu 50 µl aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt. Ein Aliquot der PNA Sonde wurde im Kühlschrank gelagert und konnte über einen Zeitraum von 2 Monaten verwendet werden. Die PNA Sonde musste vor der Benutzung 10 min im Heizblock erwärmt werden und wurde danach gevortext. Anschließend wurde pro Objektträger 100 µl Hybridisierungslösung wie folgt hergestellt: 1 µl PNA Sonde [100 µM Stock solution], 9 µl H_2O (nucleasefrei) und 90 µl Hybridisierungspuffer. Es wurden 10 µl an Hybridisierungslösung pro Objektträgerfeld aufgetragen. Die Hybridisierung fand im Dunkeln für 90 min bei 55°C in einer feuchten Kammer mit 1 ml Hybridisierungspuffer statt (Herstellung einer feuchten Kammer siehe 2.2.7.2.). Anschließend wurde die Hybridisierungslösung abgesaugt und es folgte ein Waschschritt. Der auf 55 °C vorgewärmte Waschpuffer bestand aus 5 mM Tris (ph 10), 15 mM NaCl, und 0,1% Triton X-100. Es wurden 10 µl Waschpuffer pro Objektträgerfeld aufgetragen und für 30 min bei 55°C in der feuchten Kammer zurück in den Ofen gestellt. Nach Abspülen des Waschpuffers mit H_2O (nucleasefrei) erfolgte eine DNA Anfärbung mit DAPI und Eindeckung des Objektträgers wie unter 2.2.7.2. beschrieben.

Die Bakterien wurden wie unter 2.2.7.3 beschrieben detektiert, als Filter kam zusätzlich der Zeiss Filtersatz Nr. 9 für Fluorescein (Anregung 450 -490 nm; Strahlenteiler 510 nm; Langpassfilter 520 nm) zum Einsatz.

2.2.7.4 Proben für die *in vivo* Hybridisierung

Sputum

Die Sputumproben wurden von CF-Patienten mit einer chronischen *S. aureus* Lungeninfektion am Universitätsklinikum Tübingen, Kinderklinische Abteilung 1 unter Leitung von Frau Dr. Ziebach gewonnen. Das Sputum wurde in 50 ml Falcons aufgefangen, sofort in flüssigem Stickstoff gelagert und nach dem Transport bei -70°C eingefroren.

Exsudate

Die Exsudate stammen von Meerschweinchen, welchen subkutan ein *S. aureus* infizierter Fremdkörper implantiert wurde und nach 1, 2, 4, 6 und 8 Tagen Exsudat abgezogen wurde. Die Exsudate wurden in zwei Alliquots geteilt. Die eine Hälfte wurde mit 4% Formaldehyd fixiert, die andere wurde bei -70 °C tief gefroren.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Bestimmung von rRNA pro Bakterienzelle während des Wachstumszyklus *in vivo* und *in vitro*. Dies wurde mit Hilfe von verschiedenen Methoden untersucht: quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA, Slotblot der 16S rRNA, Gel-Elektrophorese der rRNA und FISH der 16S rRNA. Es mussten zunächst exakte und reproduzierbare Methoden zur Bestimmung von Zellzahl und zur rRNA-Isolierung evaluiert werden.

3.1 Korrelation KBE / OD

Es wurde zunächst getestet, ob die OD unabhängig von der Wachstumsphase ein Maß für die KBE darstellt.

Eine Flüssigkultur (verwendetes Anzuchtmedium in allen dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen war CYPG) von *S. aureus,* Stamm Newman wurde zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und sowohl die OD als auch die entsprechende Anzahl an KBE ermittelt. Es wurden Dreifachwerte ermittelt und der Durchschnitt gebildet. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die optische Dichte in einem linearen Verhältnis zur Anzahl der KBE steht (Abb. 5) Eine OD_{600} =1 entspricht etwa 6 x 10^8 KBE / ml.

Daher kann die OD unabhängig von der Wachstumsphase zur Messung der Bakterienzahl verwendet werden. In folgenden Versuchen wurden die angegebenen KBE durch OD-Messung über die der Abb. 5 zu Grunde liegende Formel: KBE [ml x 10^9] = 0,5867 x OD berechnet.

Abb. 6 zeigt die entsprechende Wachstumskurve. Das Stadium t1 wird als Log-Phase bezeichnet (exponentielles Wachstum), das Stadium t2 als frühe postexponentielle Phase. Stadium t3 steht für die späte postexponentielle Phase, an welche sich die stationäre Phase t4 anschließt.

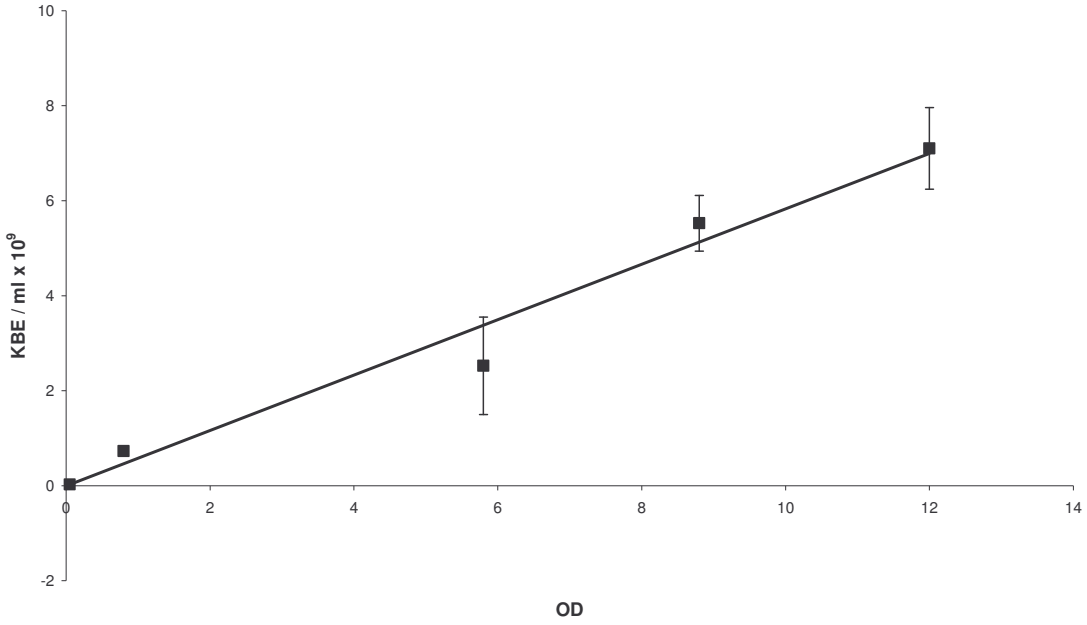


Abb. 5: Korrelation zwischen optischer Dichte (= OD) und koloniebildenden Einheiten (= KBE) bei *S. aureus*, Stamm Newman

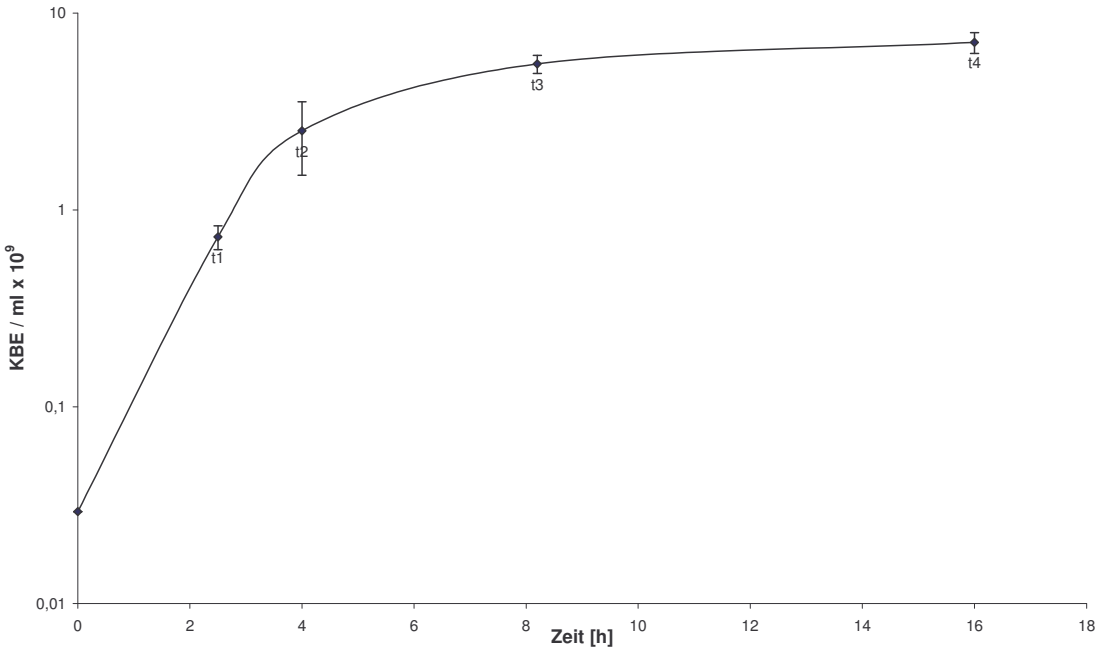


Abb. 6: Wachstumskurve von *S. aureus*, Stamm Newman

3.2 RNA / DNA Isolierung

Einführung

Zuerst wurden mehrere Vorversuche durchgeführt, um eine geeignete Methode zur Isolierung von RNA und DNA zu erhalten. Die Methode sollte eine hohe Ausbeute liefern, möglichst einfach in der Durchführung, gut reproduzierbar und nicht zeitintensiv sein. Daneben sollte RNA und DNA möglichst parallel isoliert werden können.

Vorversuche

Als erstes wurde überprüft, ob die Anzahl des Schüttelns der RNA Tubes im Homogenisator einen Einfluss auf die Menge an RNA bzw. DNA hat, die isoliert werden konnte. Dazu wurden 6 mal 10 ml einer Flüssigkultur von *S. aureus*, Stamm Newman in der Phase t1 geerntet (es wurden demnach etwa 3,52 x 10^9 KBE geerntet) und jeweils Doppelwerte des RNA und DNA Gehaltes nach 1-, 2- oder 3-maligem Schütteln (je 20 s bei 6500 rpm) photometrisch bestimmt. Zur Isolierung von RNA und DNA kam dabei die Trizol Methode zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Schüttelanzahl mit einer Erhöhung des RNA-Gehaltes einhergeht (Abb. 7). Bei der DNA sank der Wert nach 3-maligem Schütteln jedoch ab. Durch Scherkräfte war die DNA fragmentiert (gezeigt durch Gel, Ergebnisse nicht dargestellt), offenbar zerstört ein zu häufiges Schütteln die DNA Struktur. Deshalb wurde das 2-malige Schütteln als Methode der Wahl zur Isolierung von RNA und DNA angesehen. Die Suche nach einer Methode mit der RNA und intakte DNA gleichzeitig und quantitativ isoliert werden könnten ohne dabei die DNA zu scheren blieb ohne Erfolg (siehe folgende Kapitel).

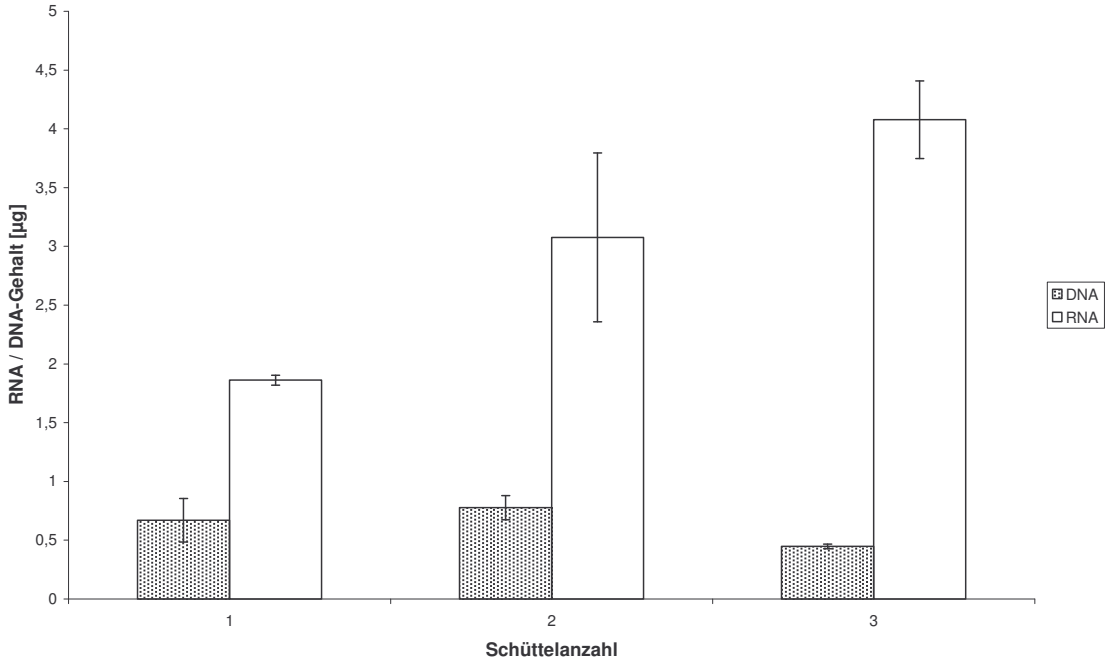


Abb. 7: Einfluss der Schüttelanzahl im Homogenisator auf die Menge an isolierbarer RNA bzw. DNA bei *S. aureus,* Stamm Newman mit einer Anzahl von 3,52 x 10^9 KBE im Stadium t1.

Als nächstes wurde der Einfluss der Erntemenge auf die Ausbeute an gereinigter RNA untersucht. Da zu kleine Mengen an Bakterien erstens sehr schwer zu handhaben sind und zweitens das Photometer bei zu geringen Mengen an RNA an die Grenzen der Nachweisbarkeit gelangt, war es wichtig eine geeignete Erntemenge festzulegen. Dazu wurde eine Übernachtkultur (OD 13,4) von *S. aureus,* Stamm Newman so geerntet, dass die Anzahl der Bakterien 10 (≙ 3,63 x 10^9 KBE), 20 (≙ 7,26 x 10^9 KBE) bzw. 30 (≙ 10,89 x 10^9 KBE) ml einer Kultur im Stadium t1 entsprechen (Abb. 8). Es wurden Doppelwerte bestimmt, als Isoliermethode kam wieder Trizol zum Einsatz. Letztendlich erwies es sich am Besten mit einer Menge von 30 ml Flüssigkultur im Stadium t1 zu beginnen, da in späteren Wachstumsstadien das Erntevolumen bis auf wenige ml reduziert ist, wenn man die gleiche Anzahl an KBE ernten will. Ebenso konnte gezeigt werden, dass zu jedem Zeitpunkt ein linearer Bezug zwischen RNA und KBE herrschte und kein Sättigungsbereich auftrat. Deshalb wurde im Hauptversuch mit 1 x 10^{10} KBE bei der Ernte gearbeitet.

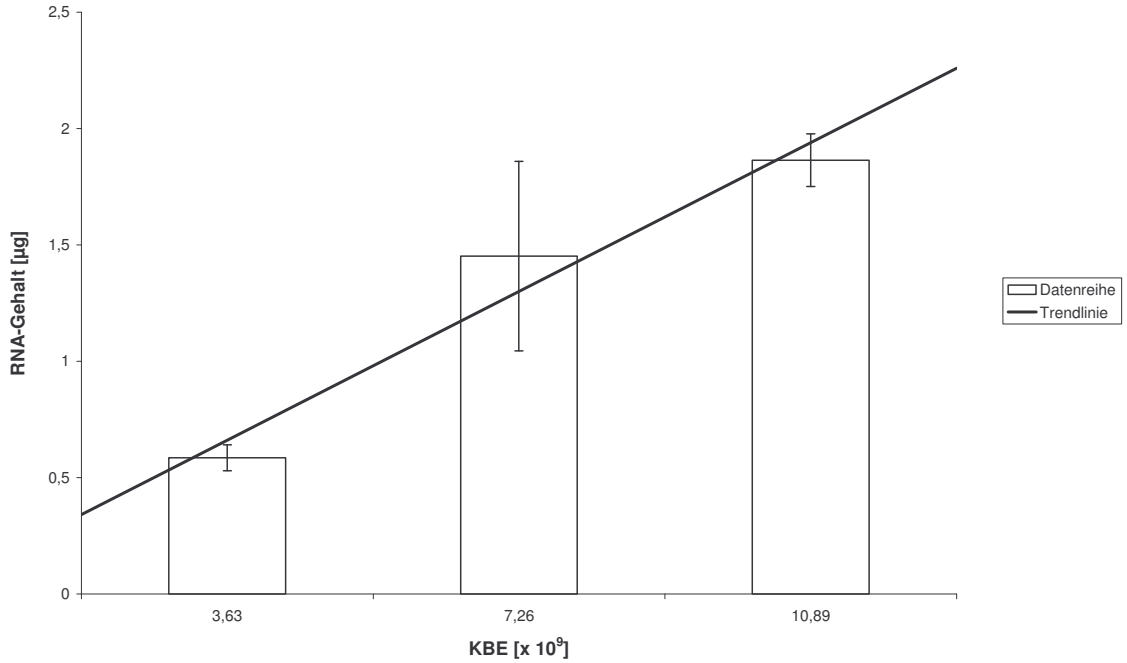


Abb. 8: Einfluss der Erntemenge auf die Menge an isolierbarer RNA bei einer Übernachtkultur von *S. aureus,* Stamm Newman

In einem weiteren Versuch wurden zwei andere Methoden zur Isolierung von RNA untersucht. Dazu wurde der Qiagen Kit RNeasy benutzt und die Verfahren der enzymatischen Isolierung sowie der mechanischen Zerstörung und anschließender enzymatischer Isolierung angewendet. Es diente hier eine Übernachtkultur von *S. aureus*, Stamm Newman mit einer OD von 15,7 als Ausgangskultur. Es wurden jeweils 400 µl Kultur geerntet, dies entspricht demnach einer absoluten KBE Anzahl von 3,68 x 10^9. Beide Verfahren erwiesen sich als schwer in der Durchführung, sowohl zeitlich als auch technisch gesehen. Abb. 9 zeigt das Ergebnis der Isolierung beider Verfahren im Vergleich, die enzymatische Methode ist in der Ausbeute deutlich geringer (72,41% geringere Ausbeute). Der Vorteil bei der Methode gegenüber der Trizol Isolierung liegt in der schonenderen Homogenisierung.

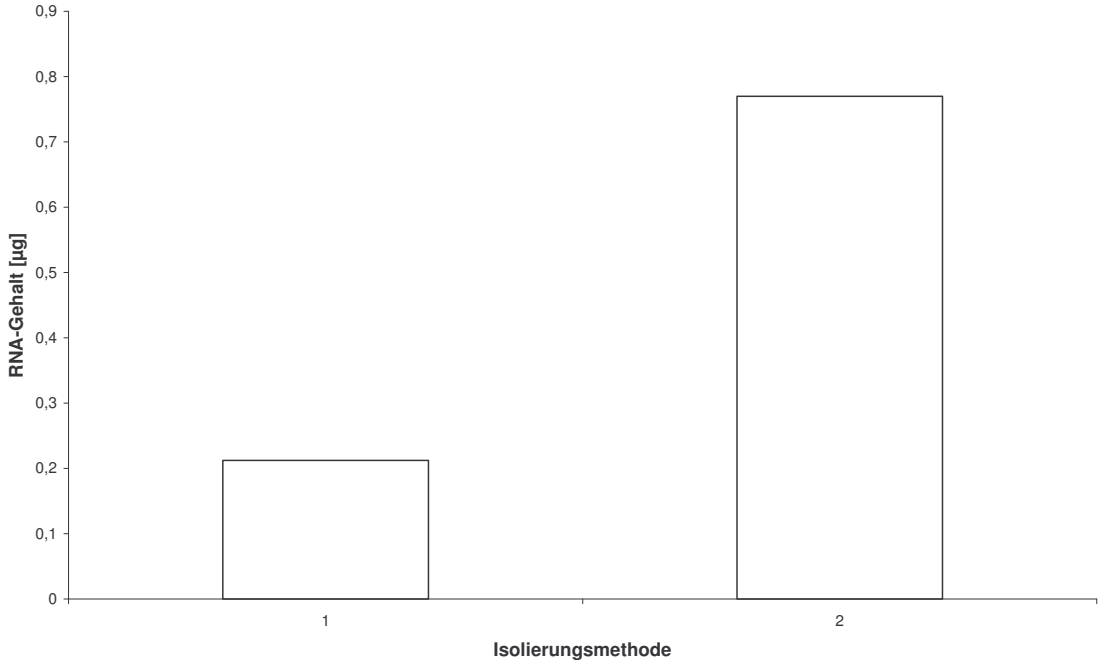


Abb. 9: RNA Isolierung einer Übernachtkultur von *S. aureus,* Stamm Newman (KBE 3,68 x 10^9) mit dem Qiagen Kit RNeasy: Isoliermethode 1 = Enzymatische Isolierung; Isoliermethode 2 = Mechanische Zerstörung und enzymatische Isolierung

Nun musste die Isoliermethode der mechanischen Zerstörung und anschließender enzymatischen Isolierung (bessere der beiden Qiagen Methoden hinsichtlich der Ausbeute an RNA) des Qiagen Kits RNeasy mit der Trizol Methode verglichen werden um festzustellen, welche Methode die bessere Ausbeute liefert. Hierzu wurde ein Vergleich sowohl im Stadium t1 als auch bei einer Übernachtkultur von *S. aureus*, Stamm Newman durchgeführt. Es wurden dabei stets eine Anzahl von 1,05 x 10^{10} KBE geerntet. Hierbei wurden jeweils Doppelwerte gewonnen. Es zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Trizol Methode (Abb. 10) sowohl im Stadium t1 als auch bei der Übernachtkultur. Die RNA Ausbeute des Qiagen Kits war um 43,53% bei t1(bzw. 41,37% bei der Übernachtkultur) geringer.

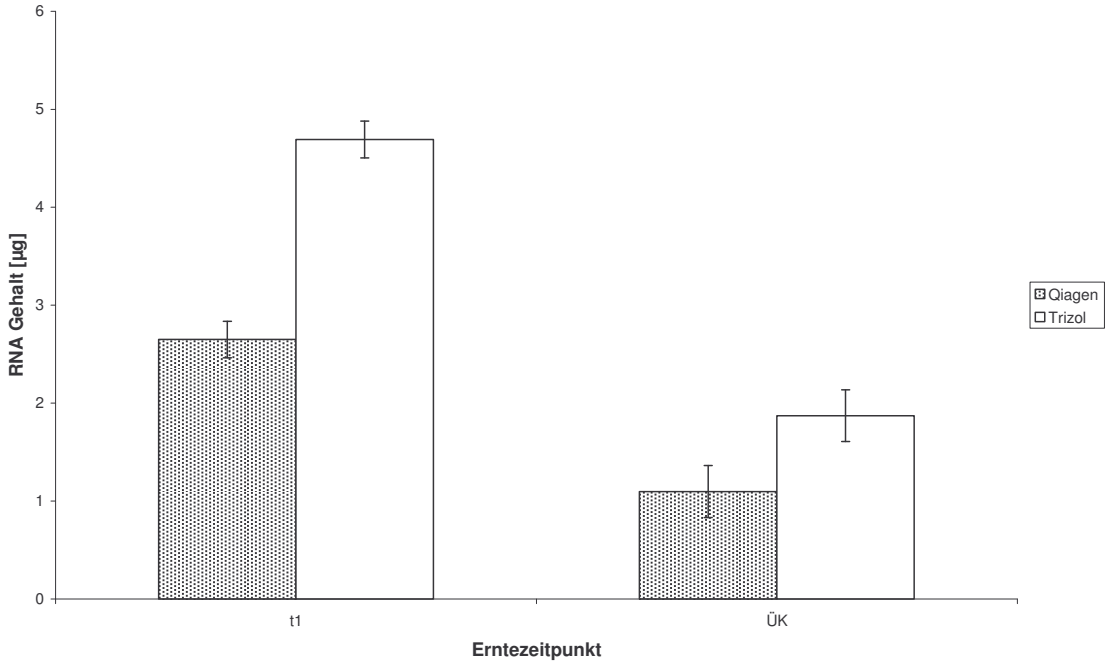


Abb. 10: Vergleich der RNA Ausbeute des Qiagen Kits RNeasy (Methode der mechanischen Zerstörung und enzymatischer Isolierung) mit der Trizol Methode bei *S. aureus*, Stamm Newman (KBE 1,05 x 10^{10}) in den Stadien t1 und Übernacht.

Bestimmung von RNA und DNA während des Wachstumszyklus

Aus den Vorversuchen ergab sich, dass mit der Trizol Methode zuverlässig RNA und DNA Mengen bestimmt werden können.

Bakterien von *S. aureus,* Stamm Newman wurden während verschiedener Wachstumsphasen geerntet und ihr Gesamt-RNA Gehalt photometrisch bestimt. Der rRNA Gehalt wurde mittels Slotblot und Gel-Elektrophorese bestimmt. Der DNA Gehalt wurde nur photometrisch bestimmt. Darüber hinaus wurden Bakterien für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auch auf Objektträger aufgetragen. Aus den Vorversuchen wurde geschlossen, dass es am Besten sei mit 30 ml Flüssigkultur zu starten. Hierzu wurden 6 Reagenzgläser mit 30 ml Flüssigkultur benötigt, da eine Dreifachbestimmung erfolgen sollte. Es wurde auf die Zellzahl bezogen geerntet, d.h. es sollte immer die gleiche Anzahl an KBE bei jeder Ernte vorliegen. Die RNA Isolierung wurde mit der Trizol Methode durchgeführt (mit 2-maligem Schütteln der Cups), da

diese die höchste Ausbeute liefert und parallel gleich DNA isoliert werden kann. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 1 und Abb. 11 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der Gesamt- RNA Gehalt nach dem Stadium t2 einen Abfall um 50% erfährt und dann nur noch leicht abnimmt während der DNA Gehalt nach einem kleinen Anstieg im Stadium t2 insgesamt nur um 25% abfällt.

Tab. 1: RNA und DNA Gehalt während des Wachstums von *S. aureus*. Stamm Newamn

Zeitpunkt	Zeit [h]	OD	KBE [x10^{10}]	Erntemenge [ml]	RNA [µg]	Ø RNA [µg]	RNA/KBE [x10^{-10}]	DNA [µg]	Ø DNA [µg]
t1	2,75	0,8	1,05	30	6,376	7,101	6,763	2,0195	2,0215
t1	2,75	0,8	1,05	30	8,528			2,23	
t1	2,75	0,8	1,05	30	6,4			1,815	
t2	4,25	3,49	1,05	5,13	5,384	6,253	5,955	2,71	2,6683
t2	4,25	3,64	1,05	4,92	6,56			2,9575	
t2	4,25	3,48	1,05	5,17	6,816			2,3375	
t3	7,25	10,6	1,05	1,69	3,408	3,154	3,004	2,035	2,0258
t3	7,25	10,3	1,05	1,74	3,01			2,03	
t3	7,25	10,1	1,05	1,78	3,045			2,0125	
t4	15,25	12,7	1,05	1,41	2,89	2,38	2,267	1,445	1,735
t4	15,25	12,4	1,05	1,45	1,922			2,225	
t4	15,25	12,7	1,05	1,41	2,328			1,535	
t5	23,25	15,3	1,05	1,176	2,431	2,106	2,006	0,9275	1,4225
t5	23,25	15	1,05	1,176	2,015			1,92	
t5	23,25	15,3	1,05	1,2	2,035				

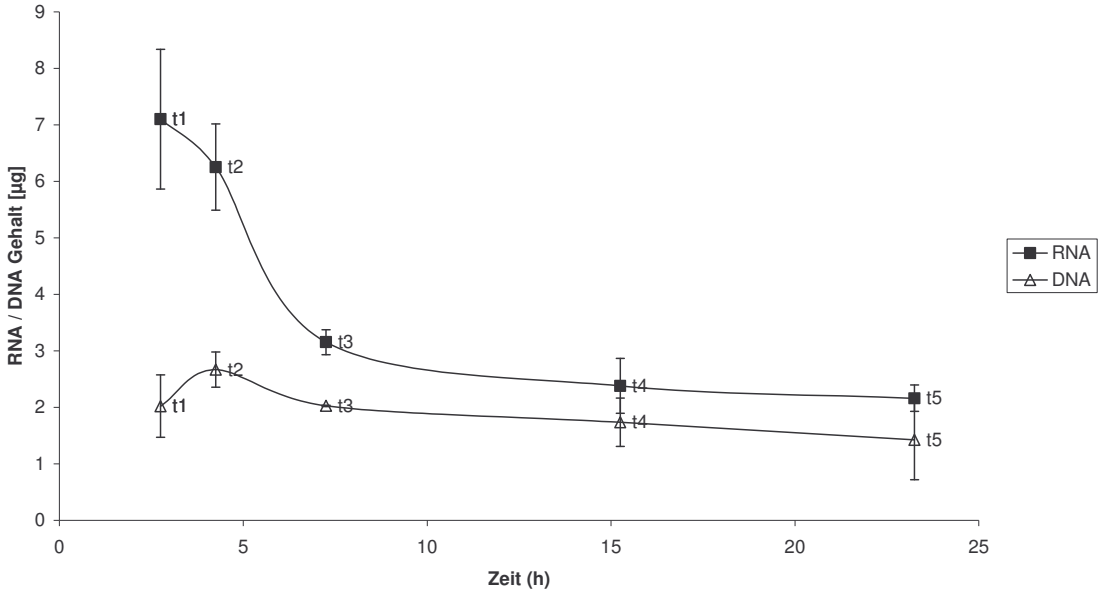


Abb. 11: Gesamt-RNA und DNA Gehalt während des Wachstums von *S. aureus*, Stamm Newman. Die Anzahl der KBE aus denen RNA / DNA isoliert wurde betrug jeweils 1,05 x 10^{10}.

Die jeweils ersten Proben der Dreifachisolierung an RNA wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Abb. 12 zeigt dieses Gel.

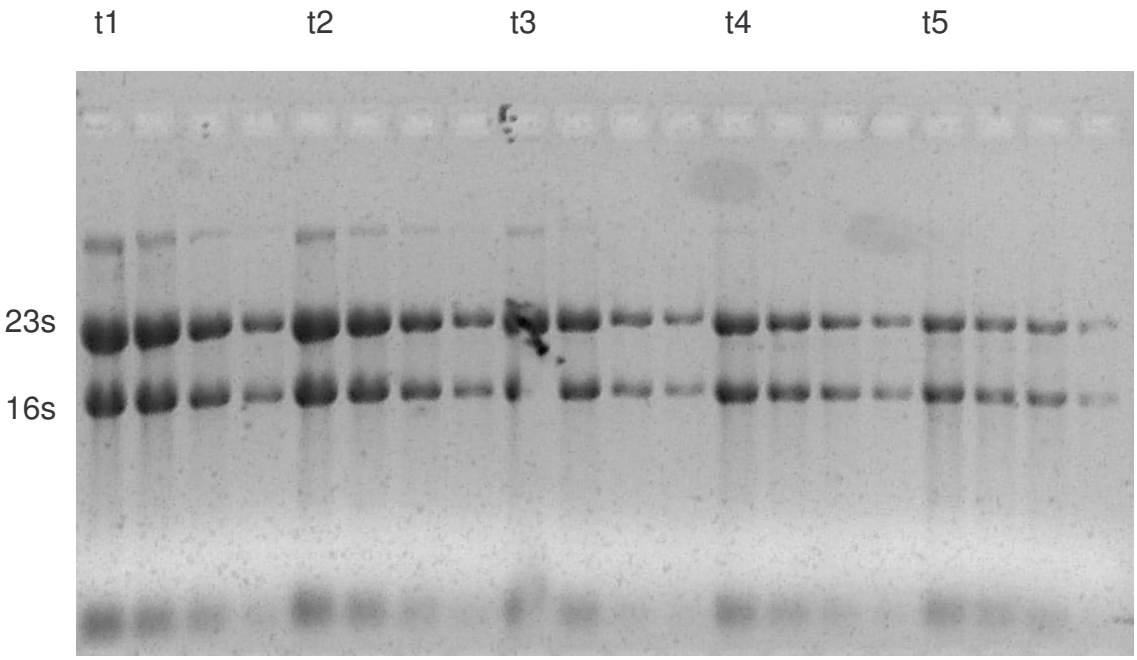


Abb. 12: RNA Gel-Elektrophorese von *S. aureus,* Stamm Newman während den Wachstumsphasen t1 – t5, jeweils 1:2 Verdünnungen

Mittels der Gel-Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass sowohl die 16S als auch die 23S Untereinheit intakt war und beide Untereinheiten im Verlauf des Wachstums abnahmen.

Um die 16S Untereinheit genauer zu untersuchen wurden aus der Dreifachisolierung die jeweils ersten Proben der 5 Stadien für eine RNA Bestimmung mittels Slotblot herangezogen. Im Slotblot wird aus der Gesamt-RNA nur die selektiv die 16S rRNA detektiert. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt.

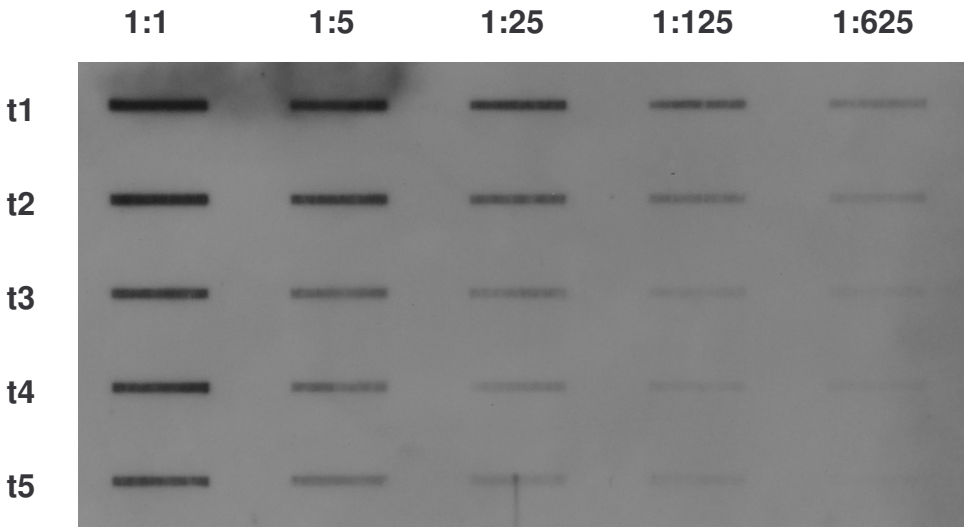


Abb. 13: Slotblot der 16S rRNA von *S. aureus,* Stamm Newman während den Wachstumsphasen t1 – t5, jeweils 1:5 Verdünnungen

Die einzelnen Slots wurden mit dem Computerprogramm WINCAM 3.0 auf ihre Helligkeit hin vermessen und logarithmisch dargestellt. (Abb. 14).

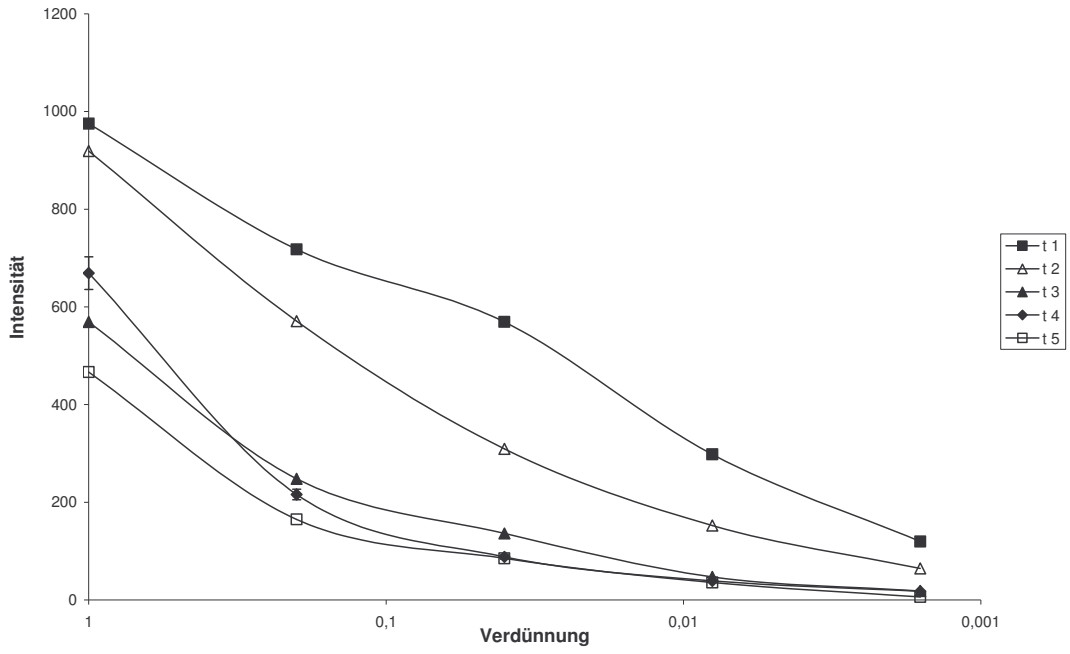


Abb. 14: Helligkeitsintensität der 16S rRNA-Slotblotfelder von *S. aureus,* Stamm Newman während den Wachstumsphasen t1 – t5.

Es zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem 16S rRNA Gehalt im Slotblot und der photometrischen Bestimmung der Gesamt-RNA.

Es wurde ein weiterer Slotblot angefertigt, diesmal selektiv für Gyrase. Es zeigte sich keine Abhängigkeit von der Wachstumsphase (siehe Abb. 15). Dies wurde im Institut auch schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. Bei dem abgeschwächten Signal in den Stadien t3 und t5 handelt es sich vermutlich um Artefakte durch ungleichmäßige Beladung. Da die Gyrase-Expression nicht Thema dieser Arbeit ist wurde dies nicht weiter verfolgt

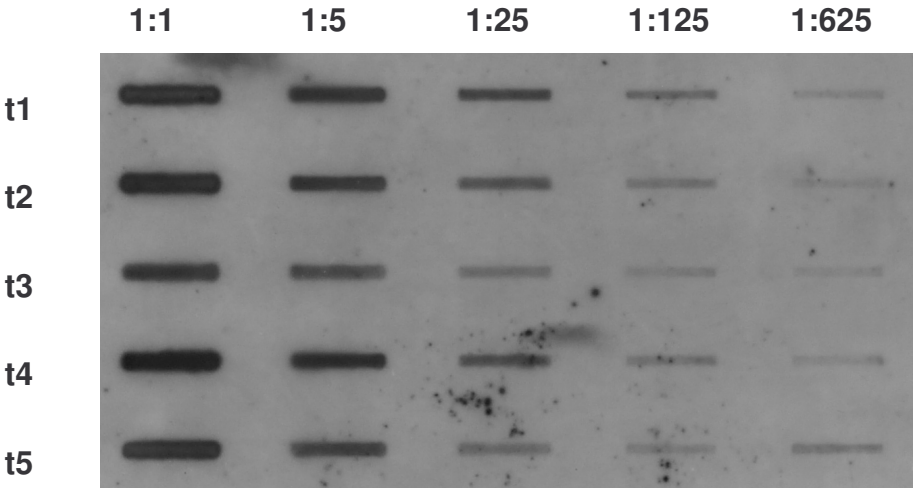


Abb. 15: Slotblot der Gyrase von *S. aureus,* Stamm Newman während den Wachstumsphasen t1 – t5, jeweils 1:5 Verdünnungen

3.3 FISH

3.3.1 Universalsonde EUB / *S. aureus* spezifische Sonde SAP-2

Die FISH stellte sich für *S. aureus* als problematisch dar. Zuerst musste überhaupt erstmal ein Signal erzeugt werden, bevor es zur Optimierung des Verfahrens kommen konnte. Das Größte Hindernis spielte dabei die Zellwand der Bakterien, die in irgendeiner Weise für die Sonde permeabel gemacht werden musste. Ein weiteres Problem stellten die Objektträger dar. Die Objektträger sollten die Hybridisierungs- und Waschlösungen sicher am Ort des Geschehens halten. Durch die hohe Temperatur im Hybridisierungsofen floss die Hybridisierungslösung allerdings leicht vom Objektträger ab. Es fanden sich jedoch entsprechende Objektträger (Firma Medco, München), welche durch eine Beschichtung den Objektträger in zehn Felder unterteilten und so in der Lage waren, dieses Problem zu eliminieren. Nun musste an der Permeabilität der Zellwand gearbeitet werden. Es waren zahlreiche Versuche nötig, bei denen entweder die Lysierungsdauer, die Konzentration der Lysierungslösung oder die Lysierungslösung selber verändert wurde.

Folgende Ansätze bezüglich der Lysierungslösung wurden verfolgt:

- keine Lysierungslösung
- Lysozym [100 µg / ml]
- Lysostaphin [10 µg / ml]
- Lysostaphin [10 µg / ml] + Lysozym [100 µg / ml]
- Lysostaphin [10 µg / ml] + 0,05% Saponin
- Lysostaphin [10 µg / ml] + Lysozym [100 µg / ml] + 0,05%Saponin

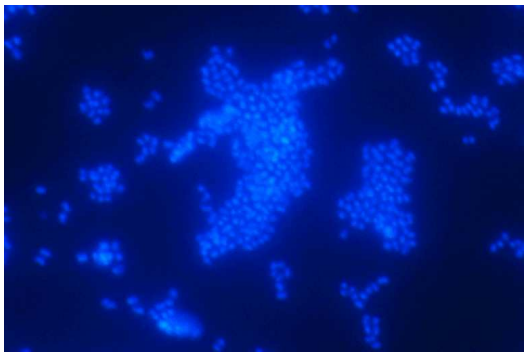
Dabei stellte sich heraus, dass die Verwendung von Lysostaphin [10 µg / ml] + 0,05% Saponin die besten Ergebnisse lieferte. Die Verwendung von Lysozym oder gar keiner Lysierungslösung erbrachte keinerlei Signale.

Anschließend wurde sowohl an der Konzentration als auch an der Einwirkdauer der Lysierungslösung gearbeitet:

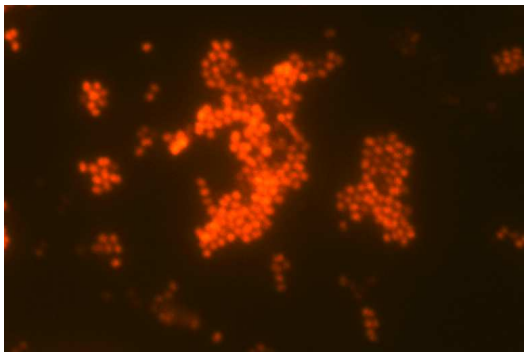
- Lysostaphin [1 µg / ml] + 0,05% Saponin für 5, 10, 20, 30 und 40 min
- Lysostaphin [10 µg / ml] + 0,05% Saponin für 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30 und 50 min
- Lysostaphin [100 µg / ml] + 0,05% Saponin für 1, 5, 10, 20 und 30 min

Eine zu kurze Lyse erwies sich dabei als unzweckmäßig, da schon kurze Abweichungen im Sekundenbereich zu nicht auswertbaren Ergebnissen führten. Einerseits konnte es sein, dass die Bakterien gar nicht, andererseits schon zu stark lysiert waren. Die Reproduzierbarkeit war bei so kurzer Einwirkzeit sehr schlecht. Eine zu lange Einwirkzeit ist wiederum für den Anwender zeitaufwendig. Ein Optimum in der Lysierung wurde schließlich in der Kombination von Lysostaphin [10 µg / ml] mit 0,05% Saponin und 3-minütiger Einwirkzeit bei 37°C gefunden. Es wurden zwei verschiedene Sonden ausgiebig getestet: eine Universalsonde für Eubakterien (EUB) und eine für *S. aureus* spezifische Sonde (SAP-2). Eine dritte, ebenfalls *S. aureus* spezifische Sonde (STAU) brachte gar kein Signal. Es wird vermutet, dass der Fehler an der Bindung zwischen Sonde und Fluoreszenzfarbstoff lag. Es konnte bei den Laborstämmen kein merkbarer Unterschied bezüglich der Intensität zwischen SAP-2 und EUB beobachtet werden (siehe Abb. 16 und 17). Im Wachstumsstadium t3 konnte mit keiner Sonde ein Signal erzeugt werden. Die Frage war, ob dies mit einer veränderten Membranpermeabilität in dieser Phase des Wachstums zu erklären ist oder ob die Bakterien zu diesem Zeitpunkt bereits so wenig rRNA enthalten, dass es für ein positives Signal nicht mehr ausreicht. Mit Hilfe von einem schrittweisen Anstieg der Lysierungsdauer (Lysostaphin [10 µg / ml] + 0,05% Saponin für 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 und 50 min konnte das Argument der veränderten Membranpermeabilität widerlegt werden, da die Bakterien bis zur vollständigen Lyse hybridisiert wurden und im zeitlichen Verlauf kein Signal im Stadium t3 nachgewiesen werden konnte (Darstellung einer vollständigen Lyse siehe Abb. 18). Abb. 16 zeigt das

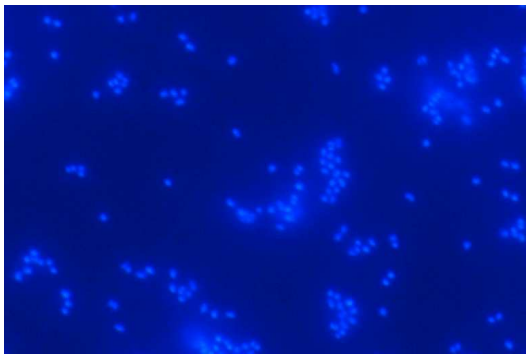
Ergebnis der Hybridisierung von *S. aureus,* Stamm Newman mit der *S. aureus* spezifischen Sonde SAP-2 in den Stadien t1, t2, t3. Weitere Stadien sind nicht abgebildet, da hier ebenfalls kein Signal erzeugt werden konnte. Neben dem Laborstamm Newman wurden weitere *S. aureus* Stämme (RN 6390, SA 113) sowie *S. aureus* Mutanten (ALC355 (Newman, Δ*agr::tet*), AS 3 (Newman *sae*::Tn*917*), CW 25 (Newman, Δ*ica::tet*)) hybridisiert, es konnte zwischen den Stämmen jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Negativkontrollen bei der SAP-2 Sonde wurden mit der Bakterienart *S. epidermidis* durchgeführt.



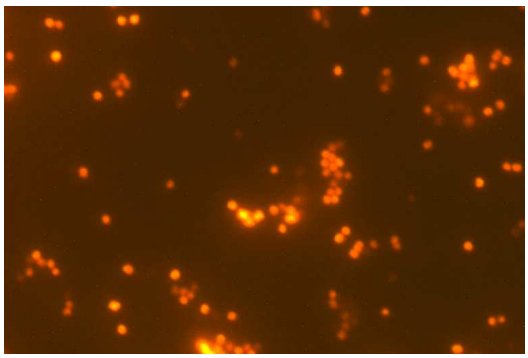
t1 DAPI



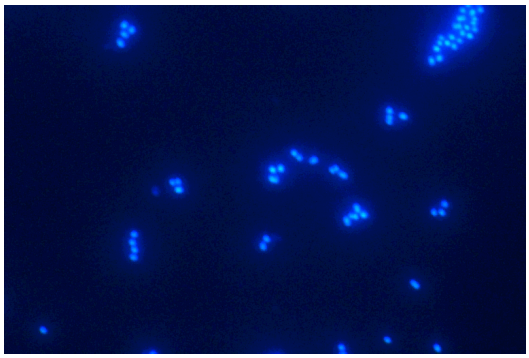
t1 Cy3



t2 DAPI



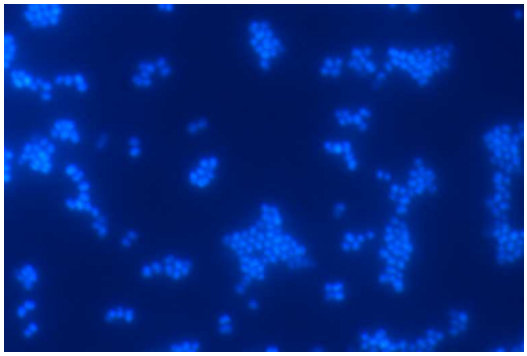
t2 Cy3



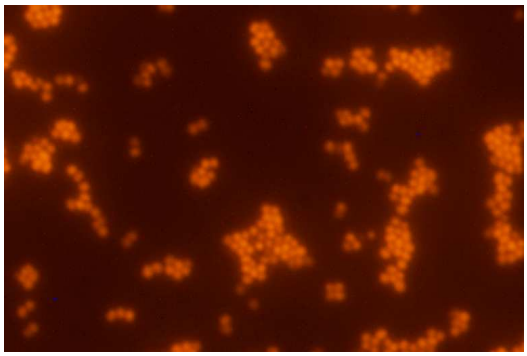
t3 DAPI

t3 Cy3

Abb. 16: FISH von *S. aureus,* Stamm Newman in den Stadien t1, t2 und t3 mit einer Cy3 markierten, *S. aureus* spezifischen Sonde (SAP-2)

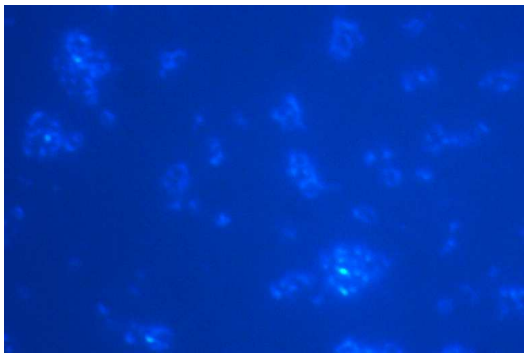


t1 DAPI



t1 Cy3

Abb. 17: FISH von *S. aureus,* Stamm Newman im Stadium t1 mit einer Cy3 markierten Universalsonde (EUB)



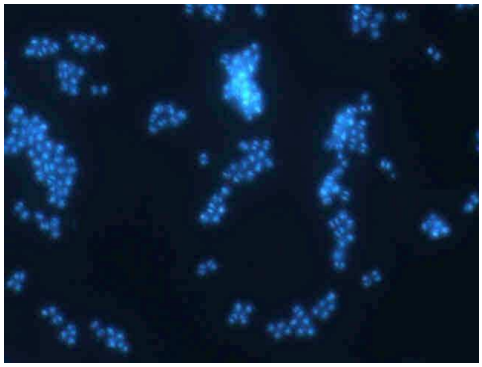
t3 DAPI

t3 Cy3

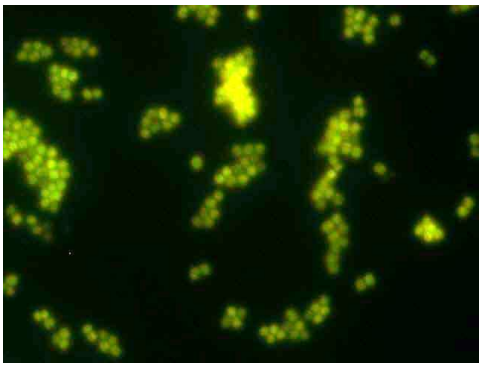
Abb. 18: FISH von *S. aureus,* Stamm Newman im Stadium t3 mit einer Cy3 markierten, *S. aureus* spezifischen Sonde (SAP-2) und 20 min Lysostaphineinwirkung (Bakterien teilweise vollständig lysiert)

3.3.2 PNA Sonde

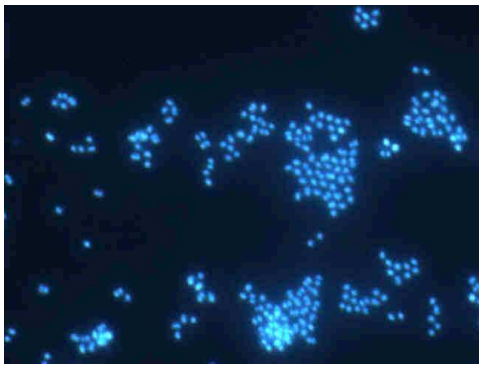
Die PNA Sonde ist in der Handhabung wesentlich besser, größter Vorteil ist die nicht nötige Lysierung der Bakterien vor der Hybridisierung. Abb. 19 zeigt die Verwendung einer solchen PNA Sonde während des Wachstums von *S. aureus*, Stamm Newman.



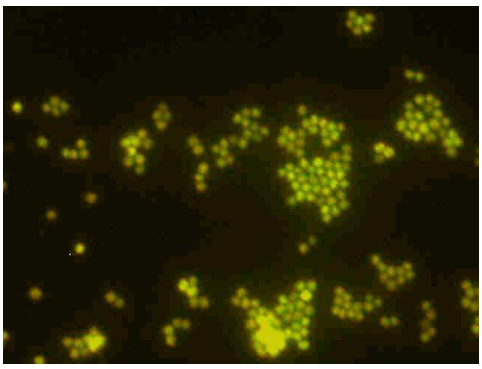
t1 DAPI



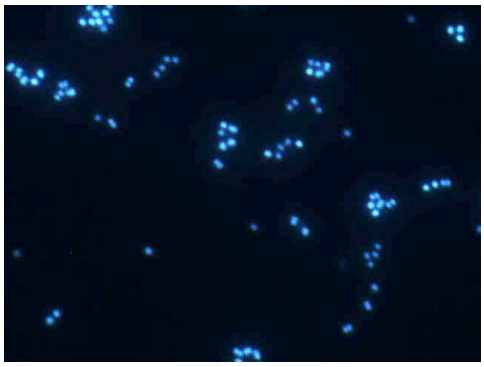
t1 Fluorescein



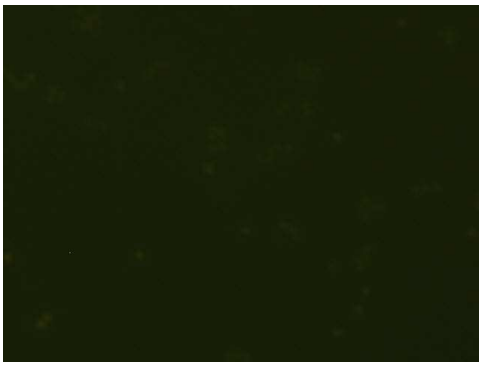
t2 DAPI



t2 Fluorescein

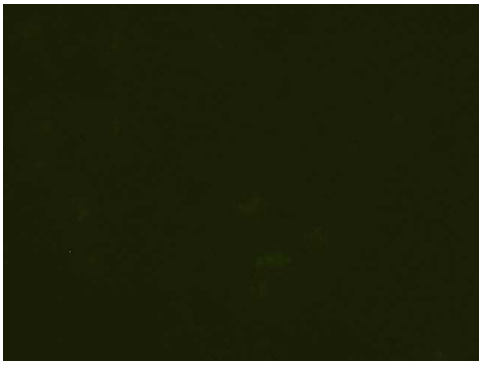


t3 DAPI



t3 Fluorescein

t4 DAPI



t4 Fluorescein

t5 DAPI

t5 Fluorescein

Abb. 19: FISH von *S. aureus,* Stamm Newman in den Stadien t1 – t5 mit einer Fluorescein markierten, *S. aureus* spezifischen PNA Sonde.

Wie bei der SAP-2 und der EUB Sonde auch war mit der PNA Sonde nur in den Stadien t1 und t2 ein Signal detektierbar.

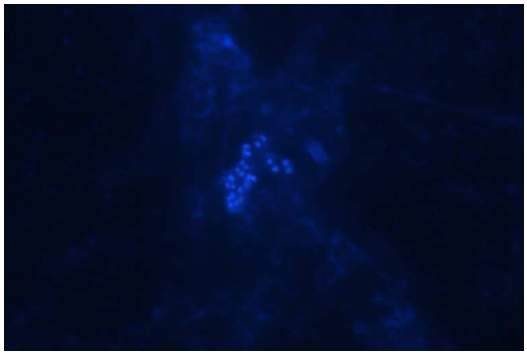
3.4 Nachweis *in vivo*

Die *in vitro* erfolgreich durchgeführte Hybridisierung von *S. aureus* Bakterien sollte nun *in vivo* erprobt werden. Dazu wurden zum einen Sputa und zum andern Exsudate verwendet. Die Signalintensität der Hybridisierung sollte dabei als Maß für die metabolische Aktivität herangezogen werden.

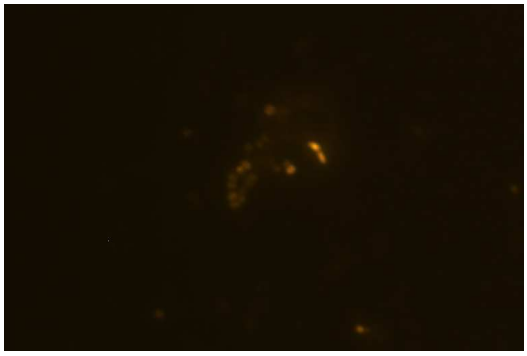
3.4.1 Sputa

Es wurden Sputa von Patienten mit cystischer Fibrose und chronischer *S. aureus* Lungeninfektion hybridisiert. Es zeigte sich, dass hier die EUB Sonde

wesentlich bessere Ergebnisse lieferte als die SAP-2 Sonde. Auch hier musste mit der Lysierungsdauer experimentiert werden, da vermutlich der Schleim des Sputums die Lysierung behindert. Es war im Vergleich zur *in vitro* Hybridisierung eine um 2 min längere Lysierung notwendig (also 5 minütige Einwirkzeit der Lysierungslösung, bestehend aus Lysostaphin [10 µg / ml] mit 0,05% Saponin). Da die Signale besonders bei den Sputa oft sehr schwach waren, wurden diese mit *S. aureus* Bakterien im Stadium t1 vermischt. Die zugemischten Bakterien waren stärker markiert, was das Argument der schlechteren Hybridisierbarkeit von Sputa aufgrund des Schleims widerlegt (Abb. 21). Am besten war bei den Sputa jedoch die PNA Sonde geeignet. Durch die nicht notwendige Lysierung vereinfachte sich der technische Ablauf und die Signalintensität des Fluorescein Farbstoffes war im Vergleich zu dem Cy3 Farbstoff besser. Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Sputa unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen gab es starke Signalunterschiede zwischen Sputa verschiedener CF-Patienten (siehe Abb. 20, 22, 23), zum anderen aber auch innerhalb einer Sputumprobe selbst (siehe Abb. 24).



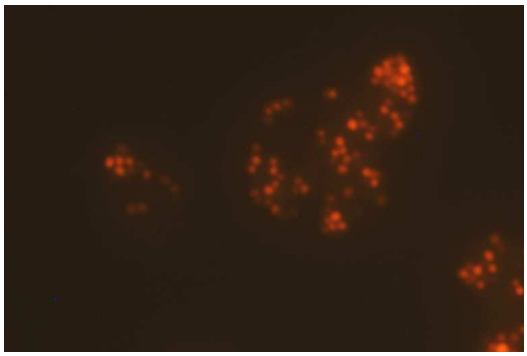
Sputum 1 DAPI



Sputum 1 Cy3

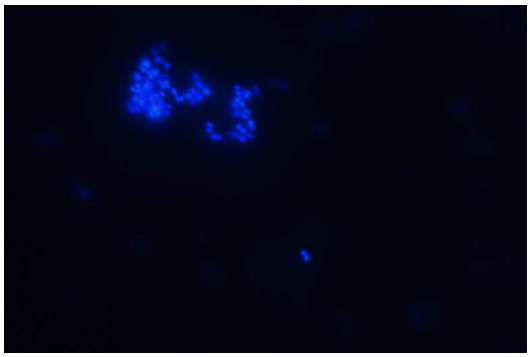
Abb. 20: FISH eines CF-Patienten Sputums mit chronischer *S. aureus* Lungeninfektion mit einer Cy3 markierten Universalsonde (EUB)

Sputum 2 + t1 DAPI

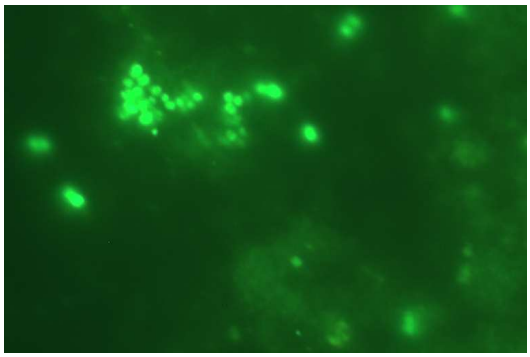


Sputum 2 + t1 Cy3

Abb. 21: FISH eines CF-Patienten Sputums mit chronischer *S. aureus* Lungeninfektion und zugemischten Bakterien von *S. aureus*, Stamm Newman im Stadium t1 mit einer Cy3 markierten Universalsonde (EUB)

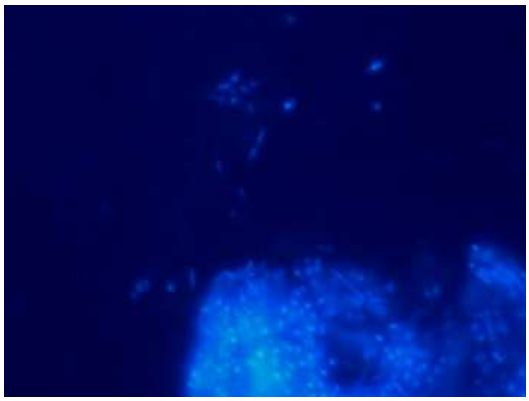


Sputum 3 Dapi

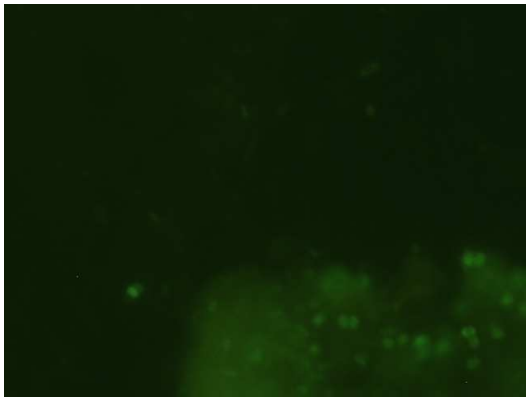


Sputum 3 Fluorescein

Abb. 22: FISH eines CF-Patienten Sputums mit chronischer *S. aureus* Lungeninfektion mit einer Fluorescein markierten, *S. aureus* spezifischen PNA Sonde, starkes Signal

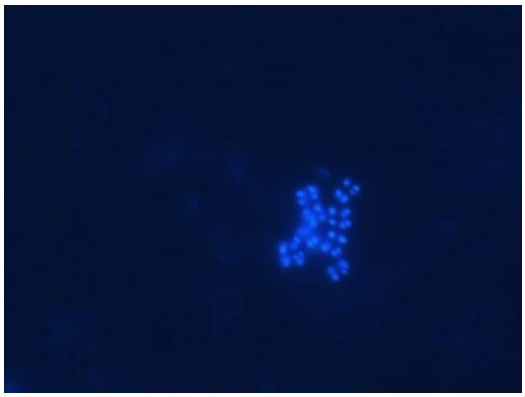


Sputum 4 Dapi

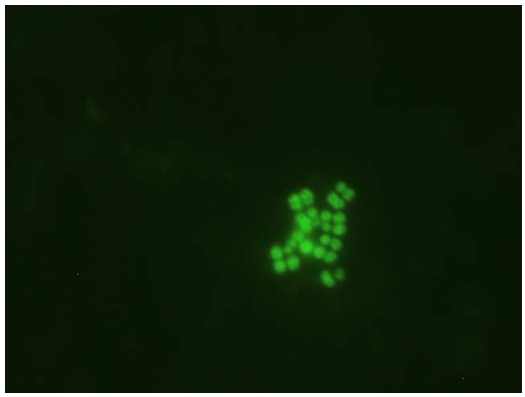


Sputum 4 Fluorescein

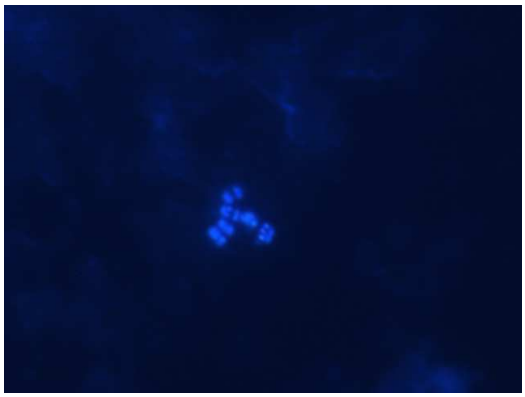
Abb. 23: FISH eines CF-Patienten Sputums mit chronischer *S. aureus* Lungeninfektion mit einer Fluorescein markierten, *S. aureus* spezifischen PNA Sonde, schwaches Signal



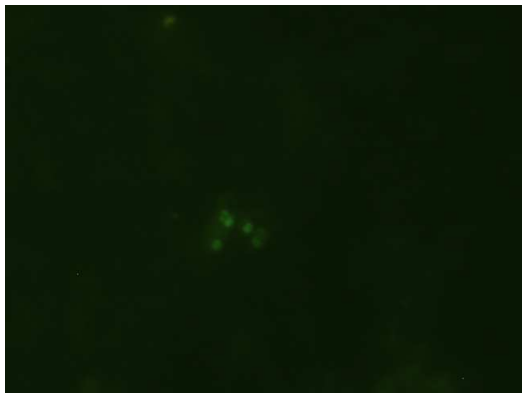
Sputum 5 Dapi



Sputum 5 Fluorescein



Sputum 5 Dapi



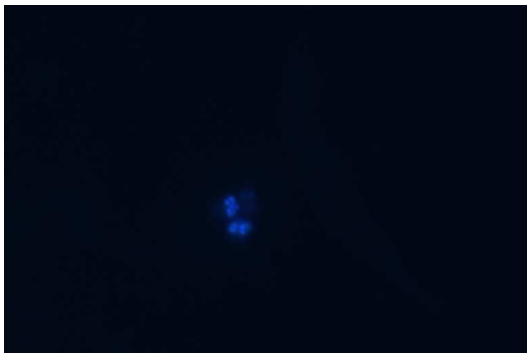
Sputum 5 Fluorescein

Abb. 24: FISH eines CF-Patienten Sputums mit chronischer *S. aureus* Lungeninfektion mit einer Fluorescein markierten, *S. aureus* spezifischen PNA Sonde, schwaches und starkes Signal

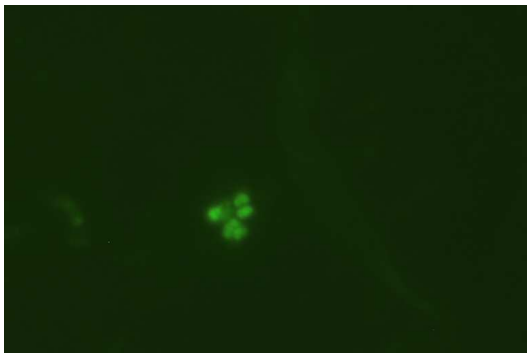
3.4.2 Exsudate

Es wurden Exsudate von *S. aureus* infizierten Fremdkörpern im Tiermodell (Meerschweinchen) hybridisiert. Den Meerschweinchen wurde dabei subkutan ein mit *S. aureus* infizierter Fremdkörper implantiert. Nach 1, 2, 4, 6 und 8 Tagen wurde aus der Fremdkörperregion Exsudat abgezogen. Es standen zwei Versuchsreihen an Exsudaten zur Verfügung. Die eine Hälfte der Exsudate waren formaldehydfixiert, die andere bei -70°C tiefgefroren. Anfänglich wurden nur formaldehydfixierte Exsudate hybridisiert. Diese ließen sich sehr schlecht hybridisieren, die Signalintensität war sehr schwach. Es wurde vermutet, dass

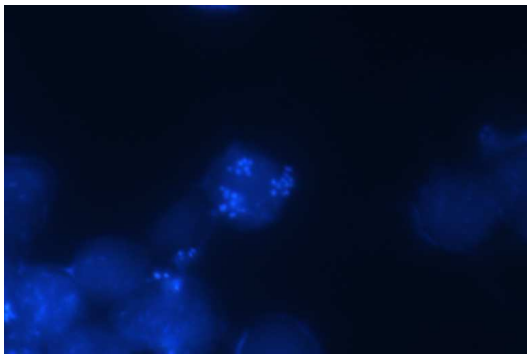
dies mit der Formaldehydfixierung zusammenhängen könnte. Die Vermutung konnte insoweit erhärtet werden, als bei der Hybridisierung der tiefgefrorenen Exsudate wesentlich stärkere Signale erzeugt werden konnten. Wie bei den Sputa auch brachte die PNA Sonde den größten Erfolg da die Signalintensität im Vergleich zu der EUB oder SAP-2 Sonde stärker war.



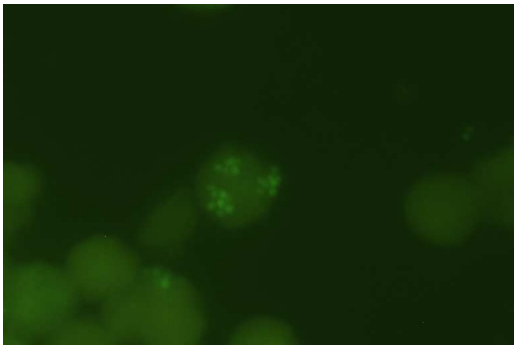
Exsudat 1d DAPI



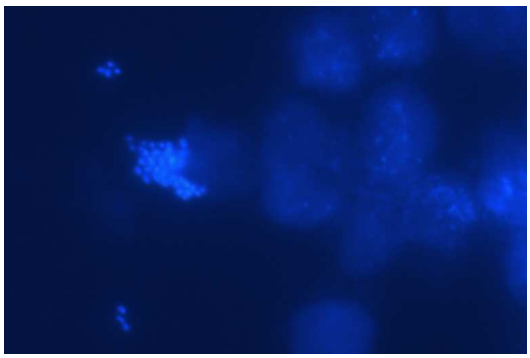
Exsudat 1d Fluorescein



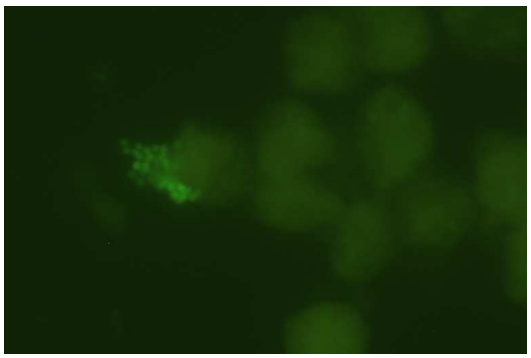
Exsudat 4d DAPI



Exsudat 4d Fluorescein

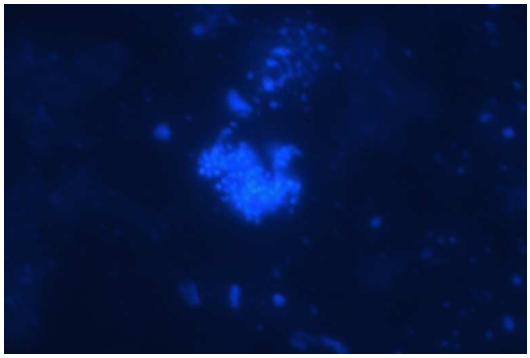


Exsudat 6d DAPI

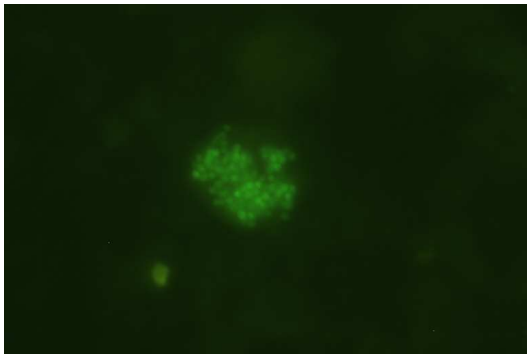


Exsudat 6d Fluorescein

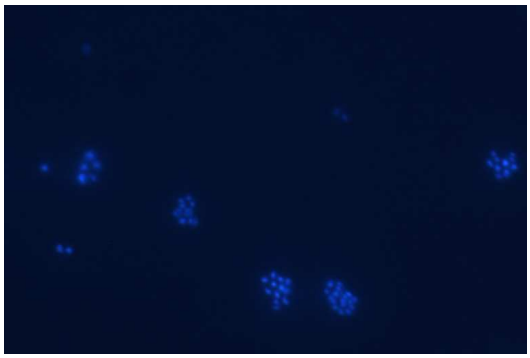
Abb. 25: FISH bei Exsudaten nach 1, 4 bzw. 6 Tagen mit *S. aureus,* Stamm Newman infizierten Fremdkörpern beim Meerschweinchen mit einer Fluorescein markierten, *S. aureus* spezifischen PNA Sonde



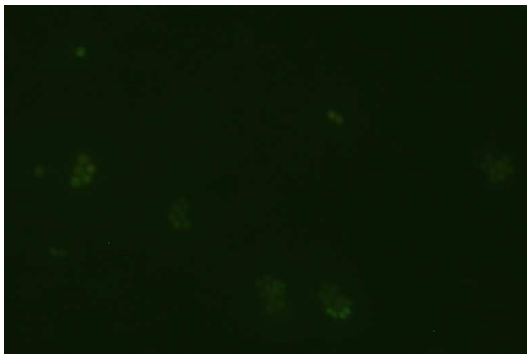
Exsudat 2d DAPI



Exsudat 2d Fluorescein



Exsudat 8d DAPI



Exsudat 8d Fluorescein

Abb. 26: FISH bei Exsudaten nach 2 bzw. 8 Tagen mit *S. aureus,* Stamm Newman infizierten Fremdkörpern beim Meerschweinchen mit einer Fluorescein markierten, *S. aureus* spezifischen PNA Sonde

Nach 1 bzw. 2 Tagen war die Signalintensität recht hoch, nach 4 bzw. 6 Tagen deutlich reduziert und nach 8 Tagen nur noch sehr schwach dedektierbar. Mit zunehmender Infektionsdauer nahm die Signalintensität bei den Exsudaten also ab.

4 Diskussion

Bei *S. aureus* wurde bisher nicht untersucht, ob sich der Gehalt an rRNA pro Bakterienzelle während verschiedener Wachstumsphasen ändert. Vergleichsarbeiten wurden bisher vorwiegend bei gramnegativen Bakterien durchgeführt. Besonders das Bakterium *E. coli* ist in diese Richtung eingehend untersucht worden. Die Arbeitsgruppe um O. Maaloe *et al.* konnte bereits 1966 einen Zusammengang zwischen Wachstumsrate und Ribosomenanzahl pro Bakterienzelle bei E. coli aufzeigen (34).

Grampositive Bakterienarten wie *S. aureus* waren bisher kaum Ziel solcher Untersuchungen.

Bei der vorliegenden Dissertation wurde der Gehalt an rRNA während des Wachstums bei *S. aureus* auf zwei Arten bestimmt. Zum einen über die Isolierung von Gesamt-RNA und zum anderen über die FISH. *In vivo* konnte nur die Verwendung des FISH zum Einsatz kommen. Im Vorfeld zur RNA Isolierung wurden Versuche durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass zwischen der OD und den KBE ein lineares Verhältnis besteht. Somit war es möglich über die OD die Anzahl der KBE zu bestimmen um so immer gleich große Mengen abzuernten. Dies war die Vorraussetzung, um eine Methode etablieren zu können, mit der es möglich ist den Gehalt an RNA pro Bakterienzelle während verschiedener Wachstumsphasen reproduzierbar zu bestimmen. Dazu wurden drei verschiedene Isoliermethoden miteinander verglichen und die beste Methode optimiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine einfache und schnelle Durchführung, möglichst parallele DNA Isoliermöglichkeit sowie eine schonende Behandlung von RNA und DNA gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Trizol Kits die höchste RNA Ausbeute liefert, während die beiden Qiagen Methoden eine signifikant schlechtere Ausbeute hervorbrachten. Außerdem war es mit den Qiagen Methoden nicht möglich auch parallel DNA zu isolieren. Somit wurde die Trizol Methode weiter verfolgt und technisch noch optimiert. Die beste Isoliermenge wurde ermittelt um nicht mit zu kleinen RNA Mengen arbeiten zu müssen. Zu geringe Mengen liegen an der unteren Nachweisbarkeitsgrenze des

Photometers. Da die Bakterien zum Aufschluss der RNA mechanisch zerstört werden mussten stellte sich die Frage nach der Intensität einer solchen Homogenisierung. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Homogenisierung der Zellen auch die Ausbeute an RNA zunimmt, die der DNA jedoch abnimmt. Mittels Gel-Elektrophorese konnte gezeigt werden (nicht dargestellt), dass die DNA mit zunehmender Homogenisierung fragmentiert wurde. Somit wurde mit der zweimaligen Homogenisierung für 2 x 20 s bei 6500 rpm ein Kompromiss bezüglich hoher RNA Ausbeute und intakter DNA geschlossen.

Die isolierte RNA und DNA wurde mit Hilfe verschiedener Methoden quantifiziert. Photometrisch wurde sowohl der Gesamt-RNA als auch DNA Gehalt bestimmt. Bezüglich des rRNA Nachweises kamen noch zwei weitere Methoden hinzu. Die eine Methode bestand aus einer Gel-Elektrophorese, die andere aus einem Slotblot Verfahren, welches zum selektiven Nachweis der 16S rRNA Untereinheit diente. Da der Gesamt-RNA Gehalt zu etwa 80% aus rRNA besteht kann man das Slotblotverfahren und die Gel-Elektrophorese ohne große Fehler mit dem Gesamt-RNA Gehalt vergleichen (29).

Photometrisch zeigte sich zwischen der frühen postexponentiellen Phase t2 und der späten postexponentiellen Phase t3 ein starker Abfall des Gesamt-RNA Gehaltes um mehr als die Hälfte. Zwischen t3 und t5 sank der Gesamt-RNA Gehalt nur noch leicht ab. Dieser sprunghafte Abfall zwischen t2 und t3 konnte ebenfalls im Slotblot nachgewiesen werden und korreliert auch mit den Ergebnissen der Gel-Elektrophorese. Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass der rRNA Gehalt von *S. aureus* während des Wachstums nicht konstant bleibt sondern im Verlauf abnimmt. Bezüglich der DNA fiel der Abfall deutlich geringer aus. Nach einem Peak bei t2 sank der DNA Gehalt im Verlauf bis zum Stadium t5 um nur etwa 25%. Die Arbeitsgruppe um Molin *et. al* beschreibt mehrere Arbeiten anderer Autoren, die ebenfalls eine Änderung von rRNA und DNA während des Wachstums vornehmlich bei E. coli beobachten konnten (36).

Neben dem Slotblot der 16S rRNA wurde noch ein weiterer Slotblot selektiv für Gyrase angefertigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Gyrase wachstumsunabhängig exprimiert wird. Im Hinblick auf die Erstellung von Transkriptionsprofilen von *S. aureus* ist es bisher üblich, die Mengen an isolierter Gesamt-RNA als Referenzgröße zu verwenden. Wie in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden konnte ist der Gesamt-RNA Gehalt aber nicht konstant. Daher wäre es sinnvoll ein konstitutiv exprimiertes Gen wie z.B. die Gyrase als Bezugsgröße zu wählen.

Um die Ergebnisse der RNA Isolierung zu verifizieren und eine Möglichkeit zu haben, die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* anzuwenden wurde eine weitere Methode angewandt. Mit der FISH wurde dabei eine Methode zum Einsatz gebracht, die erst Ende der 80er Jahre entwickelt wurde (1,2,7,43). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde nur mit Oligonukleotidsonden gearbeitet. Oliveira *et al.* beschrieb im Jahr 2002 die Verwendung von PNA Sonden zum Nachweis von *S. aureus* (40). Auf die Verwendung von PNA Sonden wird später eingegangen, es folgt die erst die Diskussion der Verwendung von Oligonukleotidsonden.

Um eine geeignete Methode zu etablieren wurden zunächst verschiedene Arbeitsprotokolle bezüglich der FISH durchgearbeitet. Grundlage für die Durchführung der FISH Technik bildet die Veröffentlichung von Amann *et al.* aus dem Jahr 1990 (1). Viele Protokolle berufen sich auf diese Veröffentlichung, bringen jedoch auch eigene Modifikationen ein.

Größtes Hindernis bei der Hybridisierung von grampositiven Bakterien ist eine ausreichende Lysierung der Zellwand. Die Arbeitsgruppe um Kempf *et al.* beschreibt die Durchführung einer FISH von *S. aureus* und anderen Bakterien in Blutkulturen (26). Sie verwendeten Lysozym (1mg/ml für 10 min bei 30°C) und anschließend Lysostaphin (1mg/ml für 5 min bei 30°C) um die Bakterien zu lysieren.

Die Arbeit von Krimmer *et al.* beschreibt eine Detektion von *S. aureus* und *S. epidermidis* mittels FISH, in der die Bakterien zuerst in Flüssigkulturen angezüchtet und dann während der exponentiellen Phase geerntet wurden (30).

Die Lysierung erfolgte etwas anders. Sie verwendeten einen Lysierungsmix aus Lysostaphin (750 µg/ml), Lysozym (5mg/ml), Natriumphosphat (50mM) und Saponin (0,05%) für 1 h bei 37°C.

Ein direkter Nachweis von Bakterien mittels FISH in Sputa von CF-Patienten mit einer chronischen Lungeninfektion wurde von Hogardt *et al.* erbracht (22). Die Lysierung der Bakterien erfolgte ähnlich wie bei der Arbeitsgruppe um Kempf *et al*. Zuerst erfolgte eine 15 minütige Behandlung mit Lysozym (1mg/ml) und anschließend eine 5 minütige Behandlung mit Lysostaphin (10µg/ml).

Die Verwendung von Lysozym zur Lysierung von *S. aureus* ist als fragwürdig zu betrachten, da *S. aureus* gegenüber Lysozym resistent ist und eine Verwendung daher eigentlich keinen Sinn macht. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar getestet ob das Lysozym irgendeinen positiven Effekt auf die Lysierbarkeit von *S. aureus* Bakterien hat, da dies aber nicht nachgewiesen werden konnte wurde auf die Verwendung von Lysozym verzichtet.

Die unterschiedlichen Vorgehensweisen allein bei der Lysierung sollen deutlich machen, wie variabel eine solche FISH gestaltet werden kann. Angefangen von der Auswahl und initialen Behandlung der Objektträger über die Verwendung eines geeigneten Lysierungspuffer bis zur Herstellung einer feuchten Kammer usw. sind etliche Abwandlungen möglich. Einig sind sich die meisten Autoren in der Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Fixation und Dehydrierung der Zellen auf dem Objektträger vor der Hybridisierung. Einige stellen dem noch eine Hitzefixierung voran. Eine Lysierung vor der FISH bei grampositiven Bakterien wird von allen Autoren beschrieben, Unterschiede bestehen wie angedeutet in der Zusammensetzung und Einwirkdauer einer solchen Lysierungslösung.

Aus all diesen Variablen wurde in etlichen Versuchen ein zumindest *in vitro* adäquates Protokoll entwickelt (siehe Material und Methoden 2.2.7.). Dabei wurde auch die Hilfe von Dr. V.A.J. Kempf aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Tübingen in Anspruch genommen, dessen Arbeitsgruppe schon Erfahrungen mit der FISH gesammelt hat.

Es wurden verschiedene Oligonukleotidsonden getestet. Die eubakterielle Sonde EUB und die *S. aureus* spezifische Sonde SAP-2 waren Cy3 markiert und zeigten *in vitro* keinerlei Unterschiede. Die Verwendung einer mit Alexa Fluor 488 markierten STAU Sonde brachte gar kein Signal hervor. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass allein die Verwendung anderer Fluoreszenzfarbstoffe bei gleicher Sondensequenz das Hybridisierungsverhalten ändern kann (16), es wird jedoch angenommen, dass der Fehler in der Synthese der Sonde und nicht an der Methodik lag. Bei der Herstellung der Sonde seitens der Firma MWG gab es offenbar Probleme den Fluoreszenzfarbstoff an das Oligonukleotid zu binden. Da die Funktion der Sonde nicht sichergestellt werden konnte, wurde die Sonde auch zu einem unter dem sonst marktüblichen Preis verkauft. In die Verwendung des Alexa Fluor Farbstoffes wurden große Erwartungen gesetzt, da er die Cy3 Farbstoffe in der Intensität übertreffen soll.

Nach Etablierung der FISH Methode wurden *S. aureus* Bakterien während verschiedener Wachstumsphasen hybridisiert. Bereits 1958 konnte M. Schaechter *et al.* eine Korrelation zwischen rRNA und Wachstumsrate bei dem gramnegativen Bakterium *Salmonella typhimurium* nachweisen (46). Die Arbeitsgruppe um Poulsen *et al.* konnte bei Biofilmen bestehend aus E. coli zeigen, dass die Signalintensität der FISH ein Maß für den rRNA-Gehalt und somit für die Wachstumsrate darstellt (44). Auch die Arbeitsgruppe um Kempf *et al.* hat die FISH Technik verwendet um bei *Bartonella henselae* Bakterien die rRNA Produktion und Ribosomenanzahl abschätzen zu können (25). Unter dieser Annahme konnte bei der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass ein Eintritt der Bakterien in die späte postexponentielle Phase t3 mit einem drastischen Abfall der rRNA einhergehen muss. Die zuvor gewonnenen Erkenntnisse der RNA Isolierung decken sich also mit denen der FISH.

Nun folgte die Hybridisierung von *S. aureus* Bakterien *in vivo*. Bei den Exsudaten war lediglich eine Vorbehandlung der Objekktträger nötig. Diese wurden vorher Poly-L-Lysin beschichtet. Bei den Sputa war es aufgrund der Zähigkeit nötig, diese pipettierbar zu machen. Verschiedene Verfahren wurden getestet, eine mechanische Schredderung wurde dabei chemischen Verfahren vorgezogen, da diese Einfluss auf den Bakterienmetabolismus ausüben

könnten. Auch waren längere Lysierungszeiten bei den Sputa nötig. Es wird angenommen, dass dies mit dem Schleim zusammenhängt. Erstaunlicherweise zeigten sich sowohl bei den Sputa als auch bei den Exsudaten im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen Unterschiede zwischen den beiden Sonden EUB und SAP-2. Die EUB Sonde lieferte mäßig starke Signale, wohingegen die Signale der SAP-2 Sonde äußerst schwach waren. Es wird angenommen, dass dieses Verhalten mit der Lokalisation der Bindung zwischen der Oligonukleotidsonde und der 16S rRNA Untereinheit zusammenhängt. Die Arbeit von M. Frischer *et al.* beschreibt die Möglichkeit eines solchen Einflusses der Lokalisation der Hybridisierungsstelle auf die Signalstärke (14). Insgesamt brachte die Verwendung von Oligonukleotidsonden *in vivo* nicht den optimalen Erfolg. Da mit den PNA Sonden sehr gute Ergebnisse erzielt wurden, wurde das Feld der Oligonukleotidsonden verlassen. Denkbar wäre hier beispielsweise noch eine Verwendung von so genannten unmarkierten „Helfersonden“ gewesen, die für eine bessere Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonde an die Zielsequenz sorgen sollen (15).

Die Möglichkeit der Verwendung von PNA Sonden in der FISH ist ein Feld, das erst vor kurzem erschlossen wurde. Im Jahr 2002 erschien die erste Veröffentlichung von Oliveira *et al.*, die die Verwendung von PNA Sonden für die Identifizierung von *S. aureus* mittels FISH beschreibt (40). Zu dem Themenkomplex PNA und FISH bei *S. aureus* existieren nur drei weitere Arbeiten, lediglich eine davon stammt von einer anderen Arbeitsgruppe (4,17,39). Daraus ergaben sich erwartungsgemäß mehrere Schwierigkeiten. Zum einen gibt es nur wenig Vergleichsarbeiten, die einem bei Problemen weiterhelfen könnten, zum anderen musste die neue Methodik erst etabliert werden. Dies ließ sich jedoch ohne große Hindernisse durchzuführen. Der große Vorteil liegt in der nicht nötigen Lysierung der Zellwand. Durch den hydrophoben Charakter ist die PNA Sonde in der Lage die Zellwand ohne vorherige Lysierung zu durchdringen. Auch sonst ist die PNA Sonde den Oligonukleotidsonden überlegen. Dadurch, dass sie über ein neutrales Strangrückgrat verfügt bindet sie auch bei niedriger Ionenkonzentration an die komplementäre Zielsequenz (12,37). Daher kann sie auch zur Detektion von

Zielsequenzen verwendet werden, die bei niedrigen Salzkonzentrationen instabil wären. Das neutrale Strangrückgrat trägt darüber hinaus auch zu einer festeren Bindung zwischen PNA und Zielsequenz bei. Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen PNA und DNA (RNA) ist bis zu 100-mal schneller als zwischen DNA und DNA (RNA). Somit wird weniger Zeit für die Hybridisierung benötigt. PNA Sonden sind wenig anfällig für Nucleasen, Proteasen und gegenüber verschiedenen Chemikalien. Weitere große Vorteile gegenüber Oligonukleotidsonden liegen in der höheren Sensitivität und Spezifität. Es wäre zu wünschen, dass in Zukunft noch weitere PNA Sonden mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen auf dem Markt kommen, so dass mehrere Sonden parallel verwendet werden können.

Die Verwendung der PNA Sonde *in vitro* zeigte das gleiche Ergebnis wie die EUB Sonde und die SAP-2 Sonde.

In vivo war die PNA Sonde den beiden Oligonukleotidsonden weit überlegen. Bei den Sputa konnte gezeigt werden, dass sich die *S. aureus* Bakterien (sogar innerhalb ein und desselben Sputums!) in verschiedenen Wachstumsstadien befanden. Meist war das Signal im Vergleich zu den *in vitro* Versuchen schwächer, was auf eine allgemein reduziertere Stoffwechselaktivität schließen lässt. Bei den Exsudaten zeigte sich zu Beginn der Infektion ein rRNA Gehalt vergleichbar mit dem Stadium t2, wogegen mit zunehmender Infektionsdauer eine Abnahme des rRNA Gehaltes beobachtet werden konnte.

Es gibt nur wenig Vergleichsarbeiten zu *in vivo* Versuchen bezüglich der Stoffwechselaktivität von Bakterien. Meist wurden auch nur kurze Zeiträume innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase untersucht, selten darüber hinaus (45).

Die vorliegende Arbeit stellt die Grundlage für weitere Versuche dar. Es wurde eine reproduzierbare Methode zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von *S. aureus* etabliert. Es sollten weitere Versuche besonders *in vivo* erfolgen, die der Fragestellung nachgehen, warum einige Bakterien in den Sputa leuchten, andere hingegen wieder nicht. Liegt es an klinischen Parametern des Patienten wie antibiotischer Abdeckung, allgemeinem Gesundheitszustand oder Stress

etc.? Gibt es Unterschiede in den Stämmen? Existieren Subpopulationen? Eine Möglichkeit hier weitere Versuche durchzuführen wäre die parallele Anwendung von Immunfluoreszenz. Ebenso könnte die Anwendung von Antibiotika während der Fremdkörperinfektion untersucht werden. Sind Antibiotika in der frühen Phase der Infektion wirksamer als im späteren Verlauf?

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, die metabolische Aktivität von *S. aureus in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Die Methoden wurde *in vitro* etabliert und dann auch *in vivo* durchgeführt. Durch Isolierung von RNA während verschiedener Wachstumsphasen wurde die Menge an RNA pro Zelle *in vitro* bestimmt. Die Messung der RNA erfolgte durch photometrische Messungen, Gel-Elektrophorese, Slotblot und FISH. Parallel dazu wurde eine photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes durchgeführt.

Anschließend wurde die etablierte FISH Methode zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der *S. aureus* Bakterien *in vivo* angewendet. Dies geschah zum einem mit Sputumproben von CF-Patienten mit einer chronischen *S. aureus* Lungeninfektion und zum anderen mit Exsudaten im Tiermodell. Meerschweinchen wurden dabei nach 1, 2, 4, 6 und 8 Tagen Exsudat aus einer Fremdkörperinfektion mit *S. aureus* abgezogen.

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass mit dem Eintritt der Bakterien in die späte postexponentielle Phase t3 der RNA Gehalt um mehr als 50% abnimmt. Der Gehalt an DNA hingegen nahm nur um etwa 25% ab.

In vivo konnte mittels PNA FISH gezeigt werden, dass sich die *S. aureus* Bakterien in Sputa in verschiedenen Wachstumsphasen befanden. Es gab nicht nur Unterschiede zwischen den Sputa der verschiedenen Patienten sondern sogar innerhalb der Sputaproben selbst. Meist lag ein schwächeres Signal im Vergleich zu den *in vitro* durchgeführten Versuchen vor, was auf eine reduzierte Stoffwechselaktivität *in vivo* schließen lässt. Die Exsudate zeigten bei der FISH während des zeitlichen Verlaufs der Infektion eine Abnahme in der Intensität, was ebenfalls auf eine reduzierte Stoffwechselaktivität schließen lässt.

Die vorliegende Dissertation bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen *in vivo* wie beispielsweise die Klärung der unterschiedlichen Aktivität der *S. aureus* Bakterien in Sputa. Auch könnte die Verwendung von Antibiotika während der Fremdkörperinfektion im zeitlichen Verlauf untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl**. 1990. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. J.Bacteriol. **172**:762-770.

2. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer**. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol.Mol.Biol.Rev. **59**:143-169.

3. **Casewell, M. W. and R. L. R. Hill**. 1986. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J.Antimicrob.Chemother. **18**:1-12.

4. **Chapin, K. C. and M. C. Musgnug**. 2003. Evaluation of Three Rapid Methods for the Direct Identification of *Staphylococcus aure*us from Positive Blood Cultures. J.Clin.Microbiol. **41**:4324-4327.

5. **Condon, C., C. Squires, and C. L. Squires**. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. Microbiol.Mol.Biol.Rev. **59**:623-645.

6. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott**. 1995. Microbial biofilms. Annu.Rev.Microbiol. **49**:711-745.

7. **Cremer, T., P. Lichter, J. Borden, D. C. Ward, and L. Manuelidis**. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome specific library probes. Hum Genet **80**:235-246.

8. **Davis, P. B., M. Drumm, and M. W. Konstan**. 1996. Cystic Fibrosis. Am.J.Respir.Crit.Care Med. **154**:1229-1256.

9. **de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski**. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect.Immun. **68**:4839-4849.

10. **DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace**. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single cells. Science **243**:1360-1363.

11. **Dockter, G. and H. Lindemann**. 2000. Mukoviszidose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

12. **Egholm, M., O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, Berg R.H., S. K. Kim, B. Norden, and P. E. Nielsen**. 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature **365**:566-568.

13. **Foster, T. J. and M. Höök**. 2000. Molecular Basis of Adherence of *Staphylococcus aureus* to Biomaterials. *In*: Waldvogel, F.A., Bisno, A.L., Infections Associated with Indwelling Medical Devices. ASM Press, Washington.

14. **Frischer, M. E., P. J. Floriani, and S. A. Nierzwicki-Bauer**. 1996. Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization is a result of ribosomal higher order structure. Can.J.Microbiol. **42**:1061-1071.

15. **Fuchs, B. M., F. O. Glöckner, J. Wulf, and R. Amann**. 2000. Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labled Oligonucleotide Probes. Appl.Environ.Microbiol. **66**:3630-3607.

16. **Fuchs, B. M., K. Syutsubo, W. Ludwig, and R. Amann**. 2001. In Situ Accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to Fluorescently Labeled Oligonukleotide Probes. Appl.Environ.Microbiol. **67**:961-968.

17. **Gonzalez, V., E. Padilla, M. Gimenez, C. Vilaplana, A. Perez, G. Fernandez, M. D. Quesada, M. A. Pallares, and V. Ausina**. 2004. Rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia using *S. aureus* PNA FISH. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. **23**:396-398.

18. **Gosden, J., D. Hanratty, J. Starling, J. Fantes, A. Mitchell, and D. Porteus**. 1991. Oligonucleotide-primed *in situ* DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization. Cytogenet Cell Genet **57**:100-104.

19. **Götz, F. and G. Peters**. 2000. Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci. *In*: Waldvogel, F.A.,Bisno, A.L., Infections Associated with Indwelling Medical Devices. ASM Press, Washington.

20. **Herrmann, M. and G. Peters**. 1997. Catheter-associated infections caused by coagulase-negative staphylococci: clinical and biological aspects. *In*: Seifert, H., Jansen, B.Farr, B.M., Catheter-related infections. Dekker, New York.

21. **Hochkeppel, H. K., D. G. Braun, W. Vischer, A. Imm, S. Sutter, U. Staeubli, R. Guggenheim, E. L. Kaplan, A. Boutonnier, and J. M. Fournier**. 1987. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. J.Clin.Microbiol. **25**:526-530.

22. **Hogardt, M., K. Trebesius, A. M. Geiger, M. Hornef, J. Rosenecker, and J. Heesemann**. 2000. Specific and Rapid Detection by Fluorescent In Situ Hybridization of Bacteria in Clinical Samples Obtained from Cystic Fibrosis Patients. J.Clin.Microbiol. **38**:818-825.

23. **John, H., M. Birnstiel, and K. Jones**. 1969. RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. Nature **223**:582-587.

24. **Kauffman, C. A. and S. F. Bradley**. 1997. Epidemiology of community-aquired infection, p. 287-308. *In* K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), The Staphylococci in Human Disease. Churchill Livingstone, New York.

25. **Kempf, V. A. J., M. Schaller, S. Behrendt, B. Volkmann, M. Aepfelbacher, I. Cakman, and I. B. Authenrieth**. 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cell.Microbiol. **2**:431-441.

26. **Kempf, V. A. J., K. Trebesius, and I. B. Authenrieth**. 2000. Fluorescent *In Situ* Hybridization Allows Rapid Identification of Microoganisms in Blood Cultures. J.Clin.Microbiol. **38**:830-838.

27. **Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L. C. Tsui**. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science **245**:1073-1080.

28. **Kluytmans, J. A., A. van Belkum, and H. Verbrugh**. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin.Microbiol.Rev. **10**:505-520.

29. **Koolman, J. and K.-H. Röhm**. 1998. Nukleinsäuren, p. 80-81. Taschenatlas der Biochemie. Thieme, Stuttgart, New York.

30. **Krimmer, V., H. Merkert, C. von Eiff, M. Frosch, J. Eulert, J. F. Löhr, J. Hacker, and W. Ziebuhr**. 1999. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. J.Clin.Microbiol. **37**:2667-2673.

31. **Lenz, W., N. Blümel, G. Bierbaum, B. Herding-Sotzeck, and P. M. Shah**. 2001. Resistenzentwicklung bei *S. aureus* und Typenwechsel bei MRSA-Stämmen. Chemotherapie Journal **5**:174-180.

32. **Longin, A., C. Souchier, M. French, and P. A. Byron**. 1993. Comparison of anti-fading agents used in fluorescence mikroscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. J.Histochem Cytochem **41**:1833-1840.

33. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N.Engl.J.Med. **339**:520-532.

34. **Maaloe, O. and N. O. Kjeldgaard**. 1966. Control of macromolecular synthesis: a study of DNA, RNA, and protein synthesis in bacteria. Benjamin, New York, NY.

35. **Marks, M. I.** 1990. Clinical significance of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. Infection **18**:53-56.

36. **Molin, S. and M. Givskov**. 1999. Application of molecular tools for *in situ* monitoring of bacterial growth activity. Environmental Microbiology **5**:383-391.

37. **Nielsen, P. E., M. Egholm, Berg R.H., and Buchardt O.** 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamid. Science **254**:1497-1500.

38. **Nomura, M.** 1999. Regulation of Ribosome Biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: Diversity and Common Principles. J.Bacteriol. **181**:6857-6864.

39. **Oliveira, K., S. M. Brecher, A. Durbin, D. S. Shapiro, D. R. Schwartz, P. C. De Girolami, J. Dakos, G. W. Procop, D. Wilson, C. S. Hanna, G. Haase, H. Peltroche-Llacsahuanga, K. C. Chapin, M. C. Musgnug, M. H. Levi, C. Shoemaker, and H. Stender**. 2003. Direct Identification of *Staphylococcus aureus* from Positive Blood Culture Bottles. J.Clin.Microbiol. **41**:889-891.

40. **Oliveira, K., G. W. Procop, D. Wilson, J. Coull, and H. Stender**. 2002. Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes. J.Clin.Microbiol. **40**:247.

41. **Pardue, M. L. and J. G. Gall**. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **64**:600-604.

42. **Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer**. 1982. Adherence and growth of coagulase-negative *staphylococci* on surfaces of intravenous catheters. J.Infect.Dis. **146**:479-482.

43. **Pinkel, D., J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, and J. W. Gray**. 1988. Fluorescence *in situ* hybridisation with human chromosome specific labraries: detection of trisomie 21 and translocation of chromosome 4. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **85**:9138-9142.

44. **Poulsen, L. K., G. Ballard, and D. A. Stahl**. 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. Appl.Environ.Microbiol. **59**:1354-1360.

45. **Poulsen, L. K., T. K. Licht, C. Rang, K. A. Krogfeld, and S. Molin**. 1995. Physiological State of *Escherichia coli* BJ4 Growing in the Large Intestines of Streptomycin-Treated Mice. J.Bacteriol. **177**:5840-5845.

46. **Schaechter, M., O. Maaloe, and N. O. Kjeldgaard**. 1958. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. J.Gen.Microbiol. **19**:592-606.

47. **Siegele, D. A. and R. Kolter**. 1992. Life after log. J.Bacteriol. **174**:345-348.

48. **Tuazon, C. U. and J. N. Sheagren**. 1974. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. J.Infect.Dis. **129**:725-727.

49. **von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters**. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. N.Engl.J.Med. **344**:11-16.

50. **von Eiff, C., C. Heilmann, and G. Peters**. 1998. *Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful? Clin.Microbiol.Infect **4**:297-300.

51. **von Eiff, C., C. Heilmann, and G. Peters**. 1999. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to *staphylococci*. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. **18**:843-846.

52. **Zambrano, M. M. and R. Kolter**. 1996. GASPing for life in stationary phase. Cell **86**:181-184.

53. **Zhang, X., A. D. McDaniel, L. E. Wolf, G. T. Keusch, M. K. Waldor, and D. W. Acheson**. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. J.Infect.Dis. **181**:664-670.

7 Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Fertigstellung dieser Dissertation geholfen haben.

Ganz besonders danke ich natürlich Dr. Christiane Wolz für die Überlassung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung.

Mein herzlicher Dank gilt ebenso Dr. Christiane Goerke für ihre ständige Präsenz, die Hilfe bei den Versuchen und praktischen Durchführungstipps.

Auch danken möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Wencke Gabel, Simone Esser und Vittoria Bisanzio für die Unterstützung bei meinen Versuchen.

8 Lebenslauf

Name:	Kai Henry Knümann
Geboren:	27.12.1977 in Köln
Eltern:	Dr. Michael Knümann, Beruf: Dipl. Volkswirt
	Doris Knümann geb. Herkstroeter, Beruf: Realschullehrerin
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	1984-1988 Grund- und Hauptschule Bodelshausen
	1988-1997 Quenstedt-Gymnasium Mössingen
	20.06.1997 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Zivildienst:	1997-1998 bei der Körperbehindertenförderung Neckar-Alb in Mössingen
Studium:	1998-2005 Studium der Zahnmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Staatsexamen:	Tübingen, den 15.10.1999: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	Tübingen, den 11.10.2001: Zahnärztliche Vorprüfung
	Tübingen, den 30.05.2005: Zahnärztliche Prüfung
Promotion:	2001-2004: Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, später dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen eingegliedert