

Untersuchungen zur Wirkungsweise antimikrobieller Kupferoberflächen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Pauline Bleichert
geb. am 17.05.1986 in Kattowitz

Gutachter:

1. PD Dr. J. Boch
2. PD Dr. G. Grass
3. Prof. Dr. J. Kalinowski

Tag der Verteidigung: 12.10.2015

In Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr

„Ein Abend, an dem sich alle Anwesenden einig sind, ist ein verlorener Abend.“

Albert Einstein

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

Bleichert P und Grass G. Einsatz von Kupferflächen gegen B-Schutz-relevante Erreger, M&K, 2014 Sep 33(11): 25

Bleichert P, Meyer H und Grass G. Massive antimikrobielle Kupfer-Flächen im Einsatz gegen nosokomiale und hochpathogene Erreger, Hyg&Med, 2014 Dez, akzeptiert

Bleichert P, Espírito Santo C, Hanczaruk M, Meyer H and Grass G. Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces, BioMetals, 2014 Dec;27(6):1179-89

Bleichert P, Espirito Santo C, Grass G. Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces, Challenge, 2013;2:7-8

Beiträge auf nationalen und internationalen Kongressen

Vorträge

Kill 'em All - Biothreat Agents Succumb to Metallic Copper Surfaces, Biodefense Conference, 22.10-25.10.2013, München

Inaktivierung bakterieller und viraler B-Kampfstofferreger durch metallische Kupferoberflächen, Deutsche Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie – Heinz Gerngroß Nachwuchsförderpreis, Platzierung unter den 5 besten Nachwuchswissenschaftlern, 11.10.2013, Warnemünde

Antimicrobial effect of metallic copper surfaces at bacterial and viral agents, 10th Ulmer symposium for clinical infections, 19.03-22.03.2013, Ulm

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Poster

Bleichert P and Grass G. Killing of Biothreat agents on metallic copper surfaces, DiMiMed-Tagung, 12-13.11.2014, Düsseldorf

Bleichert P, Hanczaruk M, Meyer H, Grass G. Metallic copper surfaces kill bacterial and viral biothreat agents, FEMS-Tagung, 21.7-25.7. 2013, Leipzig

Bleichert P, Hanczaruk M, Meyer H, and Grass G. Inactivation of orthopoxviruses via contact to metallic copper surfaces, VAAM-Jahrestagung, 10.3.-13.03. 2013, Bremen

Bleichert P, Espirito Santo C, and Grass G. Metallic copper surfaces efficiently inactivate bacterial biothreat agents, DGHM-Jahrestagung, 30.9.-3.10. 2012, Hamburg

Bleichert P, Espirito Santo C, and Grass G. Killing of biothreat agents on metallic copper surfaces, 8th International Biometals Symposium, 15.07.-19.7.2012, Brussels

Bleichert P, Espirito Santo C, and Grass G. Killing of Biothreat agents on metallic copper surfaces. VAAM-Jahrestagung, 18.03.-21.03. 2012, Tübingen

Espirito Santo C, Bleichert P, and Grass G. Killing of bacterial biothreat agents on metallic copper, Medical Biondefense Conference München, 25.-28.10.2011, München.

Inhaltsverzeichnis

VERÖFFENTLICHUNGEN.....	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 Kupfer-vermittelte Inaktivierung von Erregern	2
1.2 Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkungsweise Kupfers	5
1.3 Zielsetzung der Arbeit	9
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Verwendete Mikroorganismen.....	11
2.2 Verwendete Zelllinien.....	12
2.3 Primer.....	12
2.4 Chemikalien.....	13
2.5 Kommerzielle Materialien und Lösungen	14
2.6 Puffer und Wachstumsmedien	15
2.7 Reagenzsysteme.....	16
2.8 Geräte	16
2.9 Software und Datenbanken	17
2.10 Anzucht der verwendeten Erreger	18
2.10.1 Bakterien	18
2.10.2 Viren	18
2.11 Vorbehandlung der Metall-Testflächen	19
2.12 Experimenteller Ansatz zum Nachweis des <i>Contact-Killings</i>	20
2.13 Lebensfähiger aber nicht kultivierbarer Zustand.....	21
2.14 Evolution von Kupfer toleranten Bakterien.....	21
2.15 Lebend-Tot Färbung.....	23
2.16 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Kupfersulfat .	24

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

2.17	Wachstumskinetiken	24
2.18	Massenspektrometrische Analysen	24
2.18.1	MALDI-TOF MS Analysen	24
2.18.2	Fettsäureanalyse	26
2.18.3	ICP-MS Analysen	27
2.19	Antibiotika-Resistenztestung Testungen	29
2.19.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	29
2.19.1.1	Mikrodilutionstest	29
2.19.1.2	Gradientendiffusionstest.....	31
2.20	Nukleinsäurepräparationen	32
2.20.1	Quantifizierung der Nukleinsäuren	32
2.21	Polymerase Ketten Reaktion	32
2.21.1	Agarosegelelektrophorese	34
2.22	Sequenzierung	34
2.22.1	Sequenzierung von Nukleinsäuren nach Sanger Methode	34
2.22.2	Ganzgenomsequenzierung.....	36
2.22.3	Vergleichende cDNA Sequenzierung	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Inaktivierung von Hochpathogenen Erregern durch metallische Kupferoberflächen	39
3.1.1	Inaktivierung nicht Endosporen-bildender Bakterien	39
3.1.2	Inaktivierung von <i>Bacillus anthracis</i> und seinen Endosporen	41
3.1.3	Inaktivierung von Orthopockenviren.....	42
3.1.4	Nachweis der Inaktivierung durch LIVE/DEAD Färbung.....	43
3.2	Kupfer-Toleranz von MRSA und <i>E. coli</i>	48
3.2.1	Inaktivierung von <i>E. coli</i> und MRSA Wildtyp-Zellen durch Kupfer	48
3.2.2	Bakterien treten nach „Kupfer-Stress“ nicht in den VBNC-Status über	49
3.2.3	Generierung Kupfer-toleranter Bakterien durch gerichtete Selektion	51
3.2.4	Kupfer-Toleranz ist ein stabiler Phänotyp.....	53
3.2.5	Analyse der Wachstumskinetiken zwischen den Phänotypen.....	55
3.2.6	Massenspektrometrische Analysen	56
3.2.6.1	MALDI-TOF MS Analysen	56

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.6.2	Fettsäureanalysen	60
3.2.6.3	ICP-MS Analysen der <i>E. coli</i> Mutante und des Wildtyps	62
3.2.7	Bestimmung der Zellintegrität der Wildtyp- als auch Mutanten-Zellen	65
3.2.8	Kupfer-Toleranz und Kupferionen-Empfindlichkeit	68
3.2.9	Kupfer-Toleranz und Antibiotika-Empfindlichkeit	69
3.2.10	Ganzgenomsequenzierung der mCu60 Mutanten	72
3.2.10.1	Vergleichende genomische Analysen von <i>E. coli</i> Wildtyp und mCu60	72
3.2.10.2	Die $\Delta ycbX$ Mutante überlebt den <i>Contact Killing</i> nicht	74
3.2.10.3	Vergleichende genomische Analysen von MRSA und MRSA mCu60	75
3.2.11	Vergleichende Transkriptionsanalysen der mCu60 Mutanten	76
3.2.11.1	Das <i>ycbY</i> Gen wird in <i>E. coli</i> mCu60 hoch-reguliert	77
3.2.11.2	Unterschiede in den Transkriptionsraten zwischen MRSA und MRSA mCu60	78
4	DISKUSSION	80
4.1	Hochpathogene Erreger werden durch metallische Kupferoberflächen abgetötet	80
4.1.1	Bakterielle Erreger	81
4.1.2	Virale Erreger	85
4.2	Metallisches Kupfer begünstigt nicht den VBNC-Status	87
4.3	Kupfertolerante Erreger	88
4.3.1	Zur Wirkungsweise von Kupfer und der Bildung von Resistenz- Mechanismen	88
4.3.1.1	Kupfer-Toleranz und Antibiotika-Resistenzen treten nicht gleichzeitig auf	93
4.3.1.2	Metallische Kupfer-Toleranz und ionische Kupfer-Resistenz sind nicht gekoppelt	95
4.3.2	Massenspektrometrische Analysen zeigen Unterschiede zwischen Wildtyp und mCu60 Mutanten	96
4.3.3	Genom- und Transkriptom-Analysen zur Kupfer-Toleranz	98
4.4	Ausblick	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	REFERENZEN	103

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

I. ANHANG	117
I.I Metallzusammensetzung in <i>E. coli</i> mCu60 und Wildtyp	117
I.II Mutationsanalysen der mCu60 Mutanten und Wildtypen.....	121
I.II.I <i>E. coli</i>	121
I.II.II MRSA	123
I.III Expressionsraten der mCu60 Mutanten und der Wildtypen	124
I.III.I <i>E. coli</i>	124
I.III.II MRSA	132
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133
III. DANKSAGUNG.....	135
IV. LEBENSLAUF	137
V. ERKLÄRUNG.....	139

1. Einleitung

Der Begriff Kupfer leitet sich vom lateinischen Wort *cuprum* ab, welches auf den Abbau von Kupfer auf der Insel Zypern (lat. *cyprum*) im Altertum zurückzuführen ist. Aufgrund der einfachen Verarbeitung gehört Kupfer zu den ältesten verwendeten Metallen.

Kupfer wurde schon im Altertum als Desinfektionsmittel oder zur Behandlung von Infektionen genutzt [Dollwet *et al.* 1985]. Es gibt aus dem Jahre 2400 v. Chr. Anhaltspunkte für diese Art von Verwendung. So wurde im altägyptischen Smith Papyrus, welches die älteste bekannte Sammlung medizinischen Wissens ist, bereits von der Wirkung Kupfers als Desinfektionsmittel für Wasser und Wunden berichtet [Breasted 1930]. Ebenso gibt es aztekische Überlieferungen zur Verwendung von Kupfer bei Rachen- und Wundinfektionen [Emmart 1949]. Vom Gründer der Medizin, Hippokrates, wurde Kupfer zur Behandlung von Infektionen verwendet [Dollwet *et al.* 1985]. Seit der Verwendung von Kupfer, wurde dieses immer wieder zur Desinfektion, vor allem von Trinkwasser, genutzt [Dollwet *et al.* 1985], obwohl zum damaligen Zeitpunkt noch gar nicht bekannt war, dass es Mikroorganismen, wie Bakterien oder Viren, gibt. Während der großen Cholera-Epidemien (1832/49/52) wurde festgestellt, dass Kupfer-Minenarbeiter resistent gegenüber *Vibrio cholerae* waren. Folglich wurden Kupfer und seine Salze bis ins 20. Jahrhundert als Heilmittel gegen Infektionen verwendet.

Erst mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahre 1928 ging der Siegeszug des Kupfers zu Ende und die Ära der Antibiotika begann [Fleming 1944]. Da jedoch in der heutigen Zeit, nach der massiven Verwendung von Antibiotika gehäuft Resistenzen gegenüber Antibiotika auftreten, ist man gezwungen, zu neuen bzw. alten Mittel in der Hygiene und

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Gesundheit zu greifen. Das Augenmerk darf nicht mehr länger nur auf der Behandlung einer Infektion, sondern muss vor allem auf deren Vermeidung liegen. Die Anwendung von massiven Kupferoberflächen kann hier einen Beitrag leisten, doch dafür muss die Wirkungsweise zunächst vollständig aufgeklärt und verstanden sein.

1.1 Kupfer-vermittelte Inaktivierung von Erregern

Pathogene Organismen können entweder im Rahmen einer Präventivmaßnahme noch vor einer potentiellen Infektion inaktiviert, und/oder durch Antibiotika während einer Infektion abgetötet werden. Das Verstehen der grundlegenden Prinzipien von Infektionen und Verbreitungen ist dafür von essentieller Bedeutung (Abbildung 1).

Unter dem Begriff nosokomiale Infektion versteht man die Erkrankung eines Patienten im engen zeitlichen Zusammenhang mit seinem Aufenthalt in einer Klinik oder einer anderen Gesundheits- oder Pflegeeinrichtung. Die Infektion findet nach maximal 48 Stunden statt, und die Erregerübertragung steht somit in einem direkten Bezug zur Behandlung [Horan *et al.* 1992]. Nach Studien zur Verbreitung von nosokomialen Infektionen durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) infizieren sich 8,7% aller Patienten mit nosokomialen Erregern [Tikhomirov 1987].

In Deutschland erkranken jedes Jahr bis zu 600.000 Menschen an nosokomialen Infektionen [Gastmeier *et al.* 2010], was ca. 3,5% aller Patienten auf den allgemeinmedizinischen Stationen und ca. 15% der Intensivpatienten ausmacht. In den USA erkranken bis zu 2 Millionen Patienten an nosokomialen Infektionen. Bei einer Mortalitätsrate von 1:20 bzw. 1:4 (Intensivstationen) sterben jedes Jahr wenigstens 100.000 Menschen an diesen vermeidbaren Infektionen [CDC, <http://www.cdc.gov/24-7/CDCFastFacts/laboratories.html>]. Im Jahr 2005 erkrankten in England 300.000 Menschen, wobei jede 60. Erkrankung tödlich verlief.

Neben Infektionen durch virale Erreger infizieren sich die Patienten zumeist mit Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oder Enterobakterien wie *Escherichia coli* und *Salmonella enterica*. Diese Erreger, werden unter dem Sammelbegriff ESKAPE zusammengefasst [Boucher *et al.* 2009]. Durch die vermehrte und oft unangemessene Verwendung von Antibiotika entstehen zunehmend Antibiotika-resistente Keime wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Um die Verbreitung dieser Keime sowie die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen zu unterbinden, ist regelmäßige Hände- und Oberflächenhygiene unabdingbar. Als Übertragungswege von Infektionen kommen zum einem die direkte Übertragung von Personal, Patienten oder Besuchern untereinander und zum anderen die indirekte Übertragung über Oberflächen in Betracht. Dazu zählen immobile Kontaktflächen wie Türgriffe oder Bettgestelle aber auch mobile Kontaktflächen wie Stethoskope (Abbildung 1).

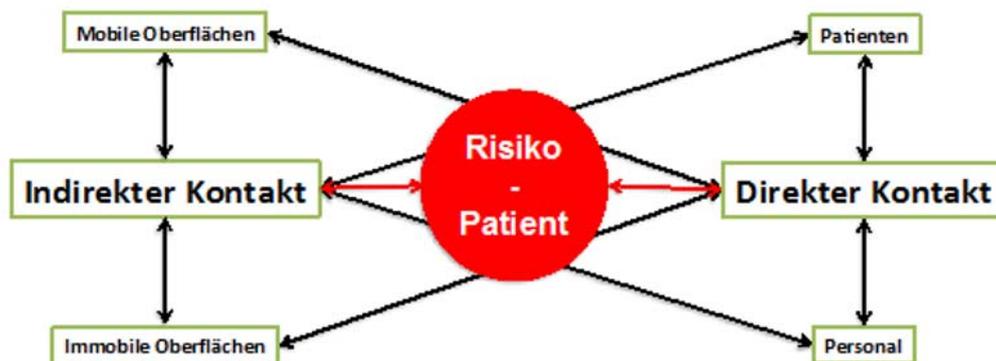


Abbildung 1: Übertragungswege nosokomialer Infektionen.

Die Übertragung nosokomialer Infektionen kann über den direkten Kontakt von Mensch zu Mensch oder über die indirekte Übertragung durch mobile oder immobile Oberflächen erfolgen (modifiziert nach www.antimicrobialcopper.org).

Um in den USA Medizinprodukte offiziell verwenden zu dürfen, müssen diese durch die amerikanische Umweltbehörde EPA (*Environmental Protection Agency*) zugelassen werden. Bisher wurden 282 verschiedene massive Kupfermaterialien validiert und freigegeben. Damit ist Kupfer das einzige Vollmetall, welches eine EPA-Zulassung erhalten hat. Diese Zulassung ist nur

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

für die USA gültig, wird jedoch zumeist in anderen Ländern, wie Deutschland, anerkannt [EPA, <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm>]. Generell sollten die Materialien einen Kupfergehalt von mindestens 65% aufweisen, um nachweislich eine antimikrobielle Wirkung zu besitzen.

Der Grundstein dieser Entwicklung von Kupfer zum antimikrobiellen Werkzeug wurde bereits 1983 durch Dr. Phyllis Kuhn gelegt [Kuhn 1983]. Kuhn beobachtete, dass Messingoberflächen (67% Kupfer, 33 % Zink) eine geringere Belastung mit Staphylokokken und Streptokokken zeigten, als entsprechende Edelstahlflächen. Dieses Wissen geriet für 20 Jahre in Vergessenheit. Erst nach der Jahrtausendwende wurden diese Ergebnisse im Zusammenhang mit einer systematischen Untersuchung des beobachteten Effekts wieder aufgegriffen.

Indessen haben aktuelle klinische Studien in Krankenhäusern gezeigt, dass die Keimzahlen auf metallischen Kupferflächen signifikant bis drastisch, um mehrere Dezimalstufen, reduziert werden [Casey *et al.* 2010; Mikolay *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2012] und diese Oberflächen sogar dazu beitragen können, die Infektionsraten zu verringern [Salgado *et al.* 2013]. Diese Ergebnisse haben in letzter Zeit weltweit zu einer steigenden Verwendung von Kupferflächen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen geführt. Bis heute erfolgten in mindestens 26 Ländern Studien zur klinischen Anwendung von Kupfer (Abbildung 2). In diesen Studien wurden entweder einzelne Bestandteile durch massives Kupfer (z.B. Türknöpfe, Bettgestelle oder Handläufe) oder in ganzen Patientenzimmern alle Edelstahlflächen durch Kupferflächen ersetzt.

Die bekanntesten Studien wurden in Großbritannien, Deutschland und den USA erhoben [Casey *et al.* 2010; Mikolay *et al.* 2010; Noyce *et al.* 2006a; Salgado *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2012]. In der Universitätsklinik Birmingham wurden ab 2007 einzelne Patientenzimmerarmaturen gegen Kupfermaterialien ausgetauscht und über 10 Wochen beprobt. Als Kontrollen dienen zumeist Edelstahloberflächen. Die Keimbelastung war auf Kupfer um 90-100% geringer als auf den Kontrollflächen [Casey *et al.* 2010]. An der Asklepios Klinik in Hamburg wurden 2008 einzelne Bauteile wie z. B.

Lichtschalter ausgetauscht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Keimzahlen auf Kupferoberflächen um bis zu 63% geringer waren, als auf den Kontrollflächen und dass die Wiederbesiedlungsgeschwindigkeit auf Kupfer langsamer erfolgte als auf Vergleichsflächen [Mikolay *et al.* 2010]. Die bis heute größte Studie zur klinischen Anwendung von Kupfer wurde in den USA durchgeführt. An der Universitätsklinik der Universität von South Carolina, am Ralph H. Johnson Krankenhaus, beide in Charleston, sowie am Memorial Sloan-Kettering Krankenhaus in New York wurden teilweise ganze Patientenzimmer neu mit Kupfer-Materialien ausgestattet. In dieser Studie konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Keimbelastung um bis zu 83 % gesenkt wurden, sondern auch, dass die Infektionsraten in solchen „Kupferzimmern“ um bis zu 40% gegenüber den Kontrollzimmern reduziert werden konnten [Salgado *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2012].



Abbildung 2: Zusammenfassung öffentlicher klinischer Studien zur Wirksamkeit antimikrobieller Kupferoberflächen.

Zusätzlich zu den publizierten klinischen Studien gibt es noch eine Vielzahl an kleineren Kliniken und Praxen, die Kupferoberflächen verwenden, jedoch an keinen offiziellen Studien teilnehmen (DKI, persönliche Mitteilung). Modifiziert nach www.antimicrobialcopper.com

1.2 Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkungsweise Kupfers

Bei Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung metallischen Kupfers und Kupferlegierungen im Laborversuch unterscheidet man die sogenannte nasse

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

von der trockenen Methode. Bei der nassen Methode wird eine Erregersuspension mit einer definierten Zellzahl auf eine Oberfläche getropft oder nur wenig verstrichen und inkubiert [McLean *et al.* 1993]. Bei diesem Vorgehen sind die Erreger nicht im direkten Kontakt mit der zu untersuchenden Fläche sondern diffundieren frei im Volumen des Mediums. Bei der trockenen Methode [Espirito Santo *et al.* 2008], deren Anwendung als *Contact Killing* bekannt ist [Grass *et al.* 2011], handelt es sich um eine Simulation, die die realen Bedingungen möglicher Anwendungsgebiete von antimikrobiellen Oberflächen, wie z. B. in Krankenhäusern oder Arztpraxen, widerspiegeln sollen. Hierbei wird eine definierte Erregerzahl in einem sehr kleinen Volumen aufgenommen und auf die gewünschten Oberflächen verstrichen. Die überschüssige Flüssigkeit evaporiert innerhalb weniger Sekunden, so dass die Erreger im direkten Kontakt mit der Oberfläche stehen [Espirito Santo *et al.* 2008]. Auch bei den möglichen Anwendungsgebieten von reinem, massiven Kupfer und massiven Kupferlegierungen kann nach einer kurzen Berührung ein minimaler Schweißfilm auf den Oberflächen zurückbleiben, der sofort verdunstet, so dass die Erreger im direkten Kontakt zur Oberfläche stehen. Insgesamt entspricht die trockene Methode eher der Realität der Mikrobenexposition in Gesundheitseinrichtungen als die feuchte Methode, die mehr einer Kontamination z. B. mit Blut oder anderen Flüssigkeiten in der Lebensmittelproduktion entspräche.

In der Vergangenheit wurde die antimikrobielle Wirkung von massiven metallischen Kupferflächen sowohl durch die nasse, als auch durch die trockene Methode gegen eine Vielzahl von Erregern der Biosicherheitsstufe (BSL) 1, wie z. B. nicht-pathogene *Staphylococci* [Espirito Santo *et al.* 2012b; Quaranta *et al.* 2011], *Escherichia coli* [Espirito Santo *et al.* 2011] oder *Enterococcus hirae* [Molteni *et al.* 2010] nachgewiesen. Ebenso konnte die Wirksamkeit von massivem Kupfer gegen eine Vielzahl von BSL-2 Erregern gezeigt werden. Hierbei wurden nicht nur Bakterien, wie zum Beispiel der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* [Weaver *et al.* 2010b], *Pseudomonas aeruginosa* [Elguindi *et al.* 2009] und *Salmonella enterica* [Faundez *et al.* 2004] untersucht, sondern auch Viren, wie das behüllte ssRNA

Virus Influenza A [Noyce *et al.* 2007] und das unbehüllte ssRNA Norovirus [Warnes *et al.* 2013; Warnes *et al.* 2014].

Die Inaktivierung der Mikroorganismen durch metallisches Kupfer erfolgt multifaktoriell (Abbildung 3). Der Vorgang wird zum einem durch Kupferionen, die vom metallischen Körper gelöst werden, initiiert, wobei hier ein großer Unterschied zwischen der nassen und der trockenen Methode besteht. Die Konzentration gelösten Kupfers steigt bei der trockenen Methode innerhalb von wenigen Sekunden auf bis zu 10^9 Kupfer-Atome/Zelle an, was zur Inaktivierung der Erreger innerhalb weniger Minuten führt [Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b; Quaranta *et al.* 2011]. Im nassen Milieu steigt die Konzentration gelösten Kupfers jedoch deutlich langsamer an. Die Inaktivierung dauert bis zu mehrere Stunden [Elguindi *et al.* 2010; Molteni *et al.* 2010].

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielt bei der Inaktivierung ebenfalls eine gewisse Rolle. Dies konnte indirekt durch die Zugabe von Chelatoren und ROS-Quenchern gezeigt werden [Espirito Santo *et al.* 2011; Quaranta *et al.* 2011; Warnes *et al.* 2012]: durch die Schädigung der Membran wird deren Semipermeabilität gestört, was zur Aufhebung des Konzentrationsgradienten und der Atmungskette führt [Warnes *et al.* 2012]. Die Unterdrückung von ROS durch Antioxidantien wie Glutathion (gshA) ist ebenfalls ein wichtiger Mechanismus zum Schutz des Zytoplasmas und der DNA, weshalb *E. coli* gshA Mutanten wesentlich schneller als Wildtyp-Zellen durch massives Kupfer inaktiviert werden [Grosse *et al.* 2014].

Aber auch die Laborbedingungen sind für die Geschwindigkeit der Inaktivierung relevant. So steigt die Inaktivierungsgeschwindigkeit thermodynamisch proportional zur Umgebungstemperatur [Espirito Santo *et al.* 2008; Michels *et al.* 2009; Wilks *et al.* 2006]. Allerdings verhält sich die Inaktivierungs-geschwindigkeit umgekehrt proportional zur Raumfeuchte [Elguindi *et al.* 2010; Michels *et al.* 2009].

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

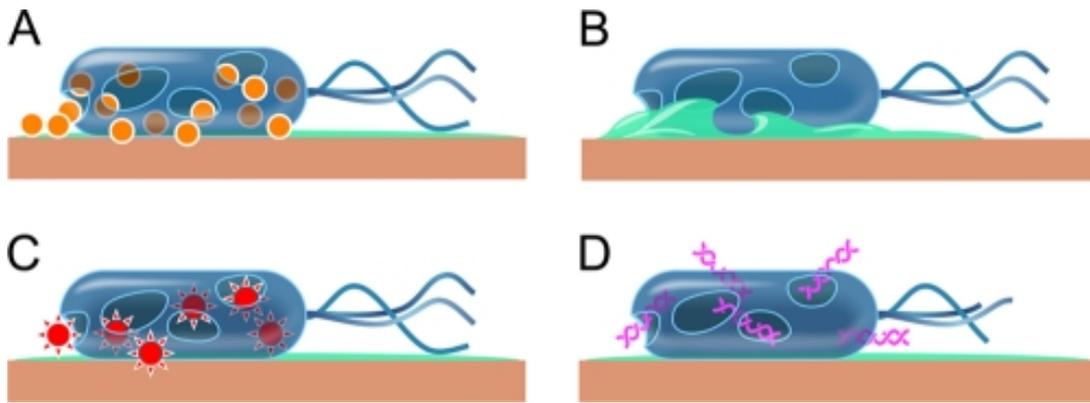


Abbildung 3; Zusammenfassung der Wirkungsweise des *Contact Killings* nach Grass *et al.* 2011.

A: Kupfer löst sich von der Oberfläche und sorgt für erste Zellschäden.

B: Die Zellmembran ruptiert aufgrund von Kupfer-verursachtem Stress.

C: Kupferionen führen zur Bildung von ROS und damit zu intrazellulären Zellschäden.

D: Nukleinsäuren (DNA und RNA) werden degradiert.

Aus [Grass *et al.* 2011]

Trotz einer ähnlich hohen intrazellulären Kupfer-Akkumulation [Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b] werden Gram-positive Bakterien langsamer als Gram-negative Bakterien inaktiviert [Elguindi *et al.* 2010; Espirito Santo *et al.* 2010; Espirito Santo *et al.* 2012b; Molteni *et al.* 2010; Noyce *et al.* 2006a; 2006b]. Vermutlich fungiert die dickere Peptidoglykanschicht bei Gram-positiven Bakterien als Diffusions-Barriere bzw. als Puffer. Viele Studien konnten durch Färbetechniken nachweisen, dass die Membran ein primäres Target für die Kupfer-induzierte Toxizität ist [Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b; Quaranta *et al.* 2011]. Dabei kommt es, durch die Peroxidation der Membranfettsäuren, zum Zusammenbruch des Membranpotentials [Hong *et al.* 2012]. Neben der Membran ist auch das genetische Material (DNA) ein Angriffspunkt für die von metallischem Kupfer ausgehende Toxizität [Espirito Santo *et al.* 2011; Warnes *et al.* 2010]. Letztlich bricht die vollständige zelluläre Integrität durch das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen auf mehrere Zellbestandteile zusammen [Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b].

Aufgrund des immer häufiger werdenden Auftretens von Antibiotika-Resistenzen stellte sich die Frage, ob eine solche Form der Resistenz auch bei massiven Kupferoberflächen auftreten könne. Es ist bekannt, dass es Co-Lokalisationen von verschiedenen Metallionen- und Antibiotika-Resistenzen gibt [Aarestrup *et al.* 2004; del Castillo *et al.* 1991; Hasman *et al.* 2005; Hasman *et al.* 2006; Kim *et al.* 2012; Li *et al.* 1997]. Co-Resistenzen treten oft dann auf, wenn entsprechende Resistenzdeterminanten auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Transposons oder transduzierender Phagen kodiert sind [Foster 1983; Ghosh *et al.* 2000; Novick *et al.* 1968]. Vor allem in der Massentierhaltung wurden Resistenzen, welche auf Co-Selektion beruhen, beobachtet und gut untersucht. Hier treten Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin, Tetracycline, Chloramphenicol und β -Lactamasen in Verbindung mit Resistenzen gegenüber Ionen von Kupfer, Arsen, Zink, Mangan, Cobalt und Silber auf [Aarestrup *et al.* 2004; Hasman *et al.* 2005; Hasman *et al.* 2006; Kim *et al.* 2012; Ruiz *et al.* 2003; Silver 1996]. In der Schweinezucht ist der Einsatz von Kupfersulfat-Verbindungen als Futterzusatz zur Erhöhung des Mastgewichtes weit verbreitet. Verschiedene *E. coli*- und *E. faecium*- Stämme zeigten in dieser Umgebung eine höhere Prävalenz für Antibiotika-Resistenzen. Jedoch zeigten die untersuchten Erreger im Vergleich zu Kontrollstämmen keine erhöhte Resistenz gegenüber metallischen Kupferoberflächen, wohl aber gegen Kupferionen [Aarestrup *et al.* 2002; Hasman *et al.* 2002; 2005].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der Schutz vor gefährlichen Erregern in der Bevölkerung und bei Einsätzen in Krisengebieten hat hohe Priorität. Dies erfährt man auch zur Zeit wieder bei der Ebola-Epidemie in Westafrika, bei der passive antimikrobielle Oberflächen sicher einen Beitrag zur Hygiene leisten könnten, sofern sie denn auch eingesetzt würden. Vor dieser Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, ob massive metallische Kupferflächen auch gegen hochpathogene Erreger, die möglicherweise auch als Bio(terror)-Waffen eingesetzt werden können, wirksam sind. Als erstes Ziel dieser Arbeit wurden daher sowohl die Effizienz

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

als auch die Wirkungsweise von Kupferoberflächen gegen hochpathogene virale und bakterielle Erreger untersucht.

Aufgrund der Erfahrungen mit langjährigem Ge- und Missbrauch von Antibiotika wäre zu vermuten, dass Bakterien trotz der nachweislich antimikrobiellen Eigenschaften von Kupferoberflächen auch gegen das *Contact Killing* resistent werden könnten. In der Vergangenheit konnten bereits Kupferoberflächen-resistente bzw. -tolerante Bakterien von Kupfermünzen isoliert werden [de Carvalho *et al.* 2014; Espirito Santo *et al.* 2010; Kalita *et al.* 2013]. Einige dieser Isolate waren gegenüber massivem Kupfer vielfach toleranter als Kontrollstämme der gleichen Spezies. Die Genome einiger dieser toleranten Bakterien wurden sequenziert und analysiert [Espirito Santo *et al.* 2012a]. Jedoch konnte in den genetischen Sequenzinformationen keine Ursache für die erhöhte Widerstandskraft der Isolate gegenüber metallischem Kupfer, im Vergleich zu den Ursprungsstämmen, festgestellt werden. Daher wurde als zweiter Schwerpunkt dieser Dissertation die spezifischen Resistenz- bzw. Toleranz-Entwicklung gegenüber metallischen Kupferflächen in Modellbakterien untersucht. Hierfür wurden *in vitro* Evolutionsexperimente durchgeführt und die resultierenden Mutanten phäno- und genotypisch charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen

Tabelle 1: Verwendete Erreger.

Erreger	Genotyp	Risiko- gruppe
<i>Escherichia coli</i> K12 (W3110)	Wildtyp	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Serotyp O6 Referenzstamm	1
<i>Escherichia coli</i> K12 (7636)	$\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ ; rph-1, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	1
<i>Escherichia coli</i> K12 ($\Delta ycbX$)	$\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ ; $\Delta ycbX763::kan$, rph-1, $\Delta(rhaD-$ <i>rhaB) 568</i> , <i>hsdR514</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	Methicillin resistent (MRSA)	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Wildtyp	2
<i>Bacillus anthracis</i> Sterne	pXO1 ⁺ /pXO2 ⁻	2
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	Wildtyp	3
<i>Brucella melitensis</i> NCTC 10094	Wildtyp	3
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 3709	Wildtyp	3
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 08016-03	Wildtyp	3
<i>Francisella tularensis tularensis</i> FSC 237	Wildtyp	3
<i>Yersinia pestis</i> NCTC 2028	Wildtyp	3
<i>Yersinia pestis</i> EV76	Impfstamm, pgm ⁻	2
Vacciniavirus Elstree	Wildtyp (Impfstamm)	2
Affenpockenvirus Copenhagen	Wildtyp	3

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

2.2 Verwendete Zelllinien

Für die experimentellen Ansätze mit dem Affenpocken- und Vaccinia-Virus wurden Zellen der Grünen Meerkatze (MA 104, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine FLI, Greifswald) als Wirtszellen verwendet.

2.3 Primer

Tabelle 2: Verwendete Primer und die erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp).

Primer	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Amplifikat- Größe (bp)
<i>uspG</i>	GGCAGGGCGGGATACTTATT	TCATGATTAACAGGGAGAAAGGGT	481
<i>ybgQ</i>	GATAAGCGGGGAGCGAAATC	GCACGCTGGATGTCAAAGTG	420
<i>yniB</i>	TTGAGGATAATGGCCGCTCC	CGCCTTTAAAGAATGGGCGA	648
<i>rhaA</i>	CCTGGGAGCTAGCGAAACAG	GCATGGGAAAGCGTAAAGCC	427
<i>yihU</i>	CAAGTTGAACGTGCCACACC	ACGGACCTGTTCCAGAATGG	435
<i>yhfW</i>	GGCGCTTATGACAACGGTTT	GGTATGGTGGCTGTGACCAA	411
<i>yeiA</i>	TTGGCTGTGGACGCTGTTAT	ACGCGCGTAAGAAATGATGTG	462
<i>yhiM</i>	GGATTAATTTGAAAAGCCACCCGA	TGGCTTGAAGAGATGTTTCTAATCT	463
<i>dcuA</i>	AGCTGATGCCATGACCTTCC	GATTGGGGGTGCTGGTTCTT	407
<i>icd</i>	ACTACATTTCTGACGCCCTGG	ACCGTTAGCAGCCTAACAAA	402
<i>proP</i>	GCGCTGATTTTTCTGGCGTT	GCAACAAATATCGACGCCCC	510

2.4 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	VWR, Darmstadt
Agarose MEEO Ultra Rothi® Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua dest., Milli-Q Biocell A10	MERCK Millipore, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	MERCK, Darmstadt
Ethanol abs.	MERCK, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid	BD, Franklin Lakes USA
Formalin 37%	MERCK, Darmstadt
Isopropanol 70%	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	MERCK, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Kristallviolett	MERCK, Darmstadt
Kupfersulfat	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
Natriumphosphat	MERCK, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
RNase freies Wasser	5Prime, Hamburg
Salpetersäure	MERCK, Darmstadt
Schwefelsäure	MERCK, Darmstadt
Trifluoressigsäure	VWR, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan	Roth, Karlsruhe
α -Zyano-4 Hydroxymethylsäure (HCCA)	Bruker Daltonics, Bremen

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

2.5 Kommerzielle Materialien und Lösungen

Tabelle 4: Alle kommerziellen Materialien, Lösungen und Hersteller.

Materialien und Lösungen	Hersteller
0,05% Trypsin-EDTA	Life Technologies, Darmstadt
100bp Leiter (0,05µg/µL)	Roth, Karlsruhe
Anti-Anti (Antimykotikum/Antibiotika)	Life Technologies, Darmstadt
BBL™ Mueller-Hinton II Broth	Beckton Dickinson, Franklin Lakes USA
Bruker Bacterial Teststandard (BTS)	Bruker Daltonics, Bremen
Columbia Blood Agar	Beckton Dickinson, Franklin Lakes USA
DNA-Gel Loading Buffer 10x	Eppendorf, Hamburg
Edelstahlplättchen, U2A AISI 321	Wieland, Ulm
Fötale Kälber-Serum, FKS	Biochrom AG, Berlin
GelRed™	Biotium, Hayward USA
Glasperlen, Ø 2 mm	Roth, Karlsruhe
HCA-Agar-Base	Inverness Medical, Köln
Kristallviolett	MERCK, Darmstadt
Kupfer-Nickelplättchen, N12 / C75700 CuNi₁₂Zn₂₄, Cu 64%; Ni 12%; Zn 24%	Wieland, Ulm
Kupferplättchen, C11000, Cu 99.9%	Wieland, Ulm
Luria-Bertani Agar	MERCK, Darmstadt
Luria-Bertani Bouillon	MERCK, Darmstadt
Polymyxin 1000U	MERCK, Darmstadt
Schafsblut	Oxoid Thermo Scientific, Waltham USA
Trypanblue solution	Sigma Aldrich, St. Louis USA

2.6 Puffer und Wachstumsmedien

Alle autoklavierten Medien wurden, sofern nicht anders erwähnt, mit Hilfe eines Dampfdruckautoklaven bei 121°C für 15 Minuten sterilisiert.

Tabelle 5: Selbsthergestellte Puffer und Medien.

Medium / Puffer	Zusammensetzung
2%ige Agarose	4 g (w/w) Agarose in 200 mL 1 × TAE Puffer gelöst
50x TAE-Puffer	242,0 g TRIS (w/w), 100 mL 0,5 M EDTA (w/v), 57,1 mL 0,2 M Essigsäure (v/v) mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
Erhaltungsmedium (EM)	MEM mit 1x Anti-Anti (nur im BSL-3) und 3% FKS (v/v)
Herz-Cystein-Agar	51,0 g HCA Agar Base in 1 L Aqua dest. gelöst, autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, mit 100 mL Schafsblut versehen
Kristallviolett-Formalin-Inaktivierungs- Lösung	7,5 g (w/w) Kristallviolett, 292,5 mL EtOH abs. und 270 mL 37% Formalin (v/v) mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt
LB-Agar	37,0 g LB-Agar Trockensubstanz in 1L Aqua dest. gelöst und autoklaviert
LB-Bouillon	25,0 g LB Bouillon Trockensubstanz in 1L Aqua dest. gelöst und autoklaviert
PBS	8,0 g NaCl (w/w), 0,2 g KCl (w/w), 0,12 g KH ₂ PO ₄ (w/w) und 0,91 g Na ₂ HPO ₄ (w/w) mit 1L Aqua dest. aufgefüllt und autoklaviert
Wachstumsmedium (WM)	MEM mit 1xAnti-Anti (nur im BSL-3) und 5% FKS (v/v)

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

2.7 Reagenzsysteme

Tabelle 6: Verwendete kommerzielle Testsysteme.

Kits	Hersteller
Cryobank	MAST Diagnostica, Bootle UK
DyeEx2.0	Qiagen, Hilden
LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit	Invitrogen, Darmstadt
MHK GN Platten	Merlin-Diagnostika, Berlin
MIC Test Strip	Manufacture Liofilchem, Roseto d. A., Italien
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaQuick PCR Purifikation	Qiagen, Hilden
Cycle Sequencing Kit	BD, Franklin Lakes USA
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden

2.8 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Biofuge stratos	Heraeus Instruments, Hanau
Class III glovebox „Glovebox“ -350 Pa	UniEquip, Martinsried
Class III glovebox „Tierisolator“-150 Pa	UniEquip, Martinsried
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentation ChemiDoc XRS	BioRad, München
Gelelektrophorese Horizon®	Applied Biosystems, Darmstadt
Heizplatte/ Magnetrührer	Phoenix Instrument, Garbsen
Inkubator (BSL2), 5%CO₂ HeraCell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Inkubator (BSL3), 5%CO₂ BBD 6220	Thermo Scientific, Dreieich

Gerät	Hersteller
Konfokales Lasermikroskop LSM T-PMT	Carl Zeiss MicroImagene, Jena
Microflex MALDI-TOF MS	Bruker Dalconic, Bremen
Mikroskop DMILLED	Leica, Solms
Mikrowelle	Bosch
NanoDrop® ND-1000	peQLab, Erlangen
Neubauer Zählkammer 0,1mm/0,0025mm²	Brand, Wertheim
pH-Meter	Inolab WTW, Weilheim
Qubit 2.0 Fluorometer	Life Technology, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Uniflow UVVB 1800 (BSL2)	UniEquip, Martinsried
Vortex-Schüttler, LAB DANCER	VWR, Darmstadt
Vortexer IKA MS3 basic	VWR, Darmstadt
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.9 Software und Datenbanken

Tabelle 8: Verwendete Software und Datenbanken.

Software / Datenbank	Hersteller
Basic Local Alignment Search Tool	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi
BioEdit Sequence Alignment Editor	Tom Hall©, Carlsbad USA
BioNumerics V6.6	AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgien
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
Data Collection V3.0	Applied Biosystems, Darmstadt

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

Software / Datenbank	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters EndNotes, Carlsbad USA
Entrez Genome	www://ncbi.nlm.nih.gov/entrez
ExPASy TagIdent Tool	www.wb.expasy.org/tagident
Office 2010	Microsoft
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.html
QuantityOne	Biorad, München
SeqScape	Applied Biosystems, Darmstadt
ZEN 2008	Carl Zeiss MicroImagine, Jena

2.10 Anzucht der verwendeten Erreger

2.10.1 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien wurden auf LB-Agar, Columbia Blutagar oder Herz-Cystein-Agar angezogen. Alle Bakterien mit Ausnahme von *F. tularensis tularensis* wurden bei 37°C für 16-24 Stunden angezogen. *F. tularensis tularensis* wurde für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ (v/v) angezogen.

2.10.2 Viren

Es wurden verschiedene Orthopockenvirenspezies untersucht. Während der Impfstamm Vaccinia (Elstree) unter Bedingungen der Biosicherheitsstufe (BSL)-2 angezogen werden kann, ist das Affenpocken-Virus (MPXV, Copenhagen) unter BSL-3 Bedingungen zu kultivieren. Zur Anzucht wurden Nierenepithelzellen der Afrikanischen Meerkatze verwendet (MA 104, FLI, Greifswald), die unter BSL-2 Bedingungen in 75 cm² großen mit 30 mL Minimal Medium und 5 % (v/v) fötalem Kälber-Serum (Wachstumsmedium,

WM) bei 37°C angezogen wurden. Die Zellen wurden einmal pro Woche geteilt. Dafür wurde das Medium entnommen und die Zellen mit 5mL 0,25 % (v/v) Trypsin-EDTA für 5 bis 10 min bei 37°C gelöst. Durch Zugabe von 15 mL WM konnte die Wirkung von Trypsin abgestoppt werden. Die Zellen wurden nun im Verhältnis 1:10 geteilt, in ein neues Zellkulturgefäß überführt und auf 30 mL mit WM aufgefüllt.

Zur Infektion wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 95% angezogen. Anschließend wurde das Wachstumsmedium vollständig entnommen und 1 mL Virus-Suspension mit 2 mL MEM auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden nun für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei die Zellkulturflasche alle 20 Minuten geschwenkt wurde. Anschließend wurden 30 mL MEM mit 3% FKS (v/v) (Erhaltungsmedium, EM) hinzugegeben und für 3-4 Tage unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Beim Erreichen eines zytopathischen Effektes von 4+ wurde die Infektion abgestoppt. Um die Virus-Partikel zu lösen wurden die Zellen dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Die Zellsuspensionen wurden in Aliquots zu je 1 mL abgefüllt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Genau 24 Stunden vor Beginn eines Experiments wurden 5×10^4 Zellen in 2 mL EM pro Loch einer 6-Loch Platte ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ (v/v) inkubiert.

2.11 Vorbehandlung der Metall-Testflächen

Für die experimentellen Ansätze wurden drei verschiedene Testoberflächen verwendet. Zum einen massive Kupferflächen (C11000, Cu 99,9%), Kupfer-Nickel Legierungen (N12 / C75700 CuNi₁₂Zn₂₄, Cu 64%; Ni 12%; Zn 24%) und als Kontrollflächen Edelstahlplättchen (U2A AISI 321). Alle verwendeten Oberflächen besitzen eine Oberfläche von 2,5 cm². Die Oberflächen wurden sowohl für die BSL-2 Experimente als auch für die BSL-3 Experimente im BSL-2 Labor vorbereitet. Hierfür wurden die Kupfer bzw. Kupfer-Nickel Plättchen 30 Sekunden in 3% (w/v) Natriumhydroxid gewaschen und anschließend mit Aqua dest. abgespült und getrocknet. Die Plättchen wurden im Anschluss zügig

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

in 10% (v/v) Schwefelsäure gelegt, ebenfalls für 30 Sekunden inkubiert und anschließend mit sterilem Aqua dest. gespült und getrocknet. Um die Sterilität zu erhalten, wurden die Oberflächen im Anschluss mit Ethanol gespült und in sterilen Petri-Schalen getrocknet. Die Edelstahlplättchen wurden lediglich mit Ethanol gewaschen und in sterilen Petri-Schalen getrocknet. So konnten die Oberflächen in das BSL-3 Labor überführt werden.

2.12 Experimenteller Ansatz zum Nachweis des *Contact-Killings*

Alle Bakterien wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,2) auf einer Zellzahl von $2,5 \times 10^9$ Zellen pro mL eingestellt. Aus dieser Suspension wurden 40 μ L entnommen, auf ein steriles Wattestäbchen gegeben und dreimal auf die Plättchen ausgestrichen. Die zurückgebliebene Flüssigkeit verdampfte innerhalb von wenigen Sekunden und es blieben ca. 0,5 % der eingesetzten Erreger auf der Oberfläche zurück [Espirito Santo *et al.* 2008]. Nach dem Auftragen wurden die Metallflächen für unterschiedliche Zeitpunkte bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Plättchen in 50 mL Zentrifugationsröhrchen mit 10 mL PBS und ca. 25 Glaskugeln überführt. Diese wurden für eine Minute mit einem Vortexschüttler gemischt, die Erreger verdünnt und auf feste Nährmedien ausplattiert. Die überlebenden Kolonien wurden nach 24-48 Stunden als Koloniebildende Einheiten (KBE) ausgezählt.

Um einen *Contact Killing*-entsprechenden Vorgang bei Viren nachzuweisen, wurden die Virensuspensionen aufgetaut und ein Volumen von 40 μ L ($\sim 10^6$ Plaque-bildende Einheiten, PBE) auf sterile Wattestäbchen gegeben, und, wie oben beschrieben, auf die Plättchen ausgestrichen, bei Raumtemperatur inkubiert und abgewaschen. Die Virussuspensionen wurden verdünnt und in die vorbereiteten 6-Loch Platten zur Infektion von MA 104 Zellen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 48-62 Stunden unter 5% CO₂ (v/v) wurden die aktiven Viruspartikel als PBE quantifiziert. Hierfür wurde das Medium entnommen und für 10 min in 3 mL Kristallviolett /10% Formalin

Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung mit Aqua dest. ausgewaschen und die PBE gezählt.

2.13 Lebensfähiger aber nicht kultivierbarer Zustand

Die vorbehandelte, sterile Kupfer- bzw. Edelstahl-Plättchen wurden nach dem Auftragen von 40 µL Bakteriensuspension ($2,5 \times 10^9$ Zellen pro mL) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plättchen wurden in vorbereitete, mit 10 mL PBS gefüllte 50 mL Zentrifugationsröhrchen transferiert und für eine Minute mit einem Vortexschüttler gemischt. Die Suspension wurde vorsichtig in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen dekantiert und 10 min bei $7.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen. Um die gelösten Kupfer-Ionen zu binden und damit die Zellen aus dem möglichen viablen, aber nicht kultivbaren (Viable but not culturable, VBNC)-Zustand durch Umkehrung des verursachenden Stresses wiederzubeleben (resusziieren), wurde das Pellet mit 1 mL 500 µM Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA) gewaschen. Die Suspension wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und eine Minute bei $7000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 mL 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde für 21 Tage bei 28°C inkubiert. Jeden Tag wurde eine Probe (1 µL) entnommen, auf Festmedium ausplattiert und Bakterien, die aus dem VBNC-Zustand wieder in den kultivbaren Zustand übergetreten waren, als KBE bestimmt.

2.14 Evolution von Kupfer toleranten Bakterien

Zur Generierung Kupfer toleranter Erreger wurden *E. coli* W3110 und *S. aureus* N315 (MRSA) verwendet. Beide Erreger wurden mit PBS auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^9$ Zellen/ mL eingestellt. Von dieser Suspension wurden 40 µL auf sterile Wattestäbchen gegeben, auf vorbehandelte Kupferoberflächen aufgetragen und inkubiert. Durch Arbeiten von Espirito Santo *et al.* war

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

bekannt, dass *E. coli* nach 1 Minute [Espirito Santo *et al.* 2008] und *S. haemolyticus* nach 7 Minuten [Espirito Santo *et al.* 2012b] inaktiviert sind. Um tolerante Erreger zu generieren, wurde *E. coli* zunächst für 30 Sekunden und MRSA für 3 Minuten auf Kupferflächen inkubiert, anschließend abgewaschen, 1 mL dieser Lösung wurde auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37° inkubiert. Die überlebenden Kolonien wurden erneut ausgestrichen und inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen aufkonzentriert und das Experiment wiederholt, jedoch wurde die Inkubationszeit nach und nach um 0,5-1 Minute erhöht, so dass mit jedem Zyklus die Bakterien toleranter gegenüber massivem Kupfer wurden (Abbildung 4).

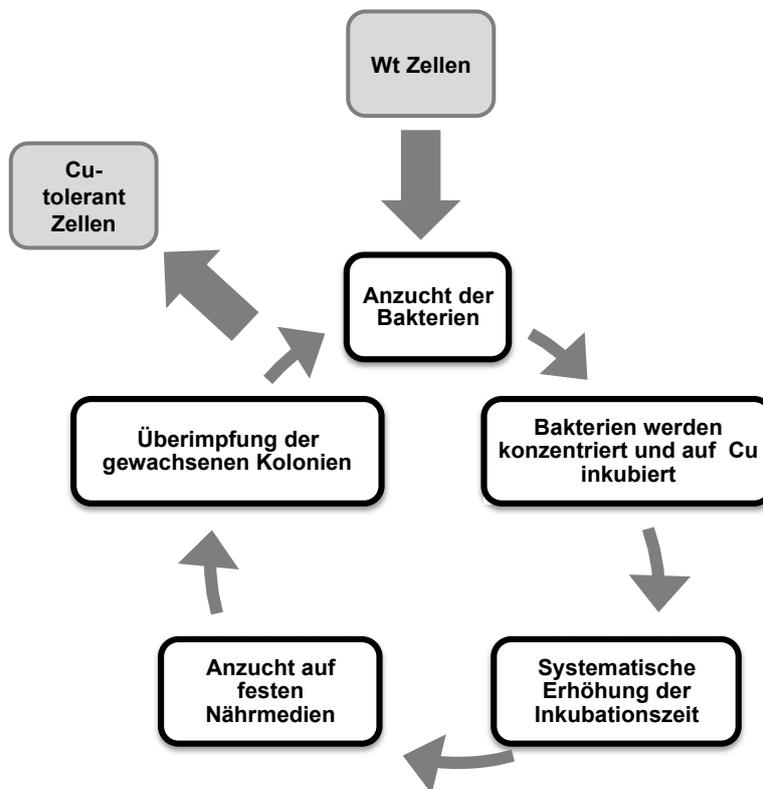


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung Kupfer-toleranter Bakterien.

Durch diese systematischen Wiederholungen konnte ein *E. coli* sowie ein MRSA Stamm kreiert werden, welcher mindestens 60 Minuten auf Kupfer-Oberflächen überleben konnte. Die hier generierten Mutanten wurden *E. coli*

Mutant Cu60' (*E. coli* mCu60) und MRSA *Mutant Cu60'* (MRSA mCu60) bezeichnet.

2.15 Lebend-Tot Färbung

Mit Hilfe des *Live/Dead BacLight bacterial viability kit* lässt sich zwischen geschädigten und intakten bakteriellen Membranen differenzieren. Hierbei werden zwei unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet, welche mit doppelsträngiger DNA interkalieren. Der grün-fluoreszierende Farbstoff SYTO9 penetriert geschädigte als auch intakte Membranen. Der zweite rot-fluoreszierende Farbstoff Propidium Iodid kann intakte Membranen nicht penetrieren und färbt dementsprechend nur Zellen mit perforierten Membranen. Dabei reduziert Propidium Iodid die Fluoreszenz von SYTO9. Folglich sind sowohl lebende, als auch tote Zellen grün gefärbt, aber nur die toten oder sterbenden Zellen mit perforierter Membran zusätzlich rot.

Für die lebend-tot Färbung wurden die Bakterien wie im *Killing Assay* beschrieben (2.12) vorbehandelt: 4 μL der Suspension wurden auf Kupfer- bzw. Stahl-Plättchen aufgetragen und für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Die Zellen wurden mit 100 μL PBS von den Oberflächen gespült und mit 10% (v/v) Formaldehyd für eine Stunde fixiert und inaktiviert. So konnten die experimentellen Ansätze aus dem BSL-3 Bereich in den BSL-2 Bereich transferiert werden. Die Zellen wurden zweimal mit 500 μL 0,9 (w/v) NaCl (6000 \times g, 1 Minute) gewaschen und anschließend in 500 μL 0,9 NaCl Lösung resuspendiert. Daraufhin wurde 1,5 μL einer 1:1 SYTO9 / Propidium Iodid Lösung hinzugegeben und die Suspension für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zellsuspension aufzukonzentrieren, wurden die Zellen 2 Minuten bei 6000 \times g zentrifugiert und im Anschluss 490-495 μL des Überstandes abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und 5 μL auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops untersucht (λ_{Ex} 488/543 nm, λ_{Em} 522/590 nm). Zur bildgebenden Analyse wurde das ZEISS-eigene Programm ZEN verwendet.

2.16 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Kupfersulfat

Die bakteriellen Erreger wurden bei 37°C und 200 rpm auf einem Schüttler in LB Medium bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Eine 1:100 Verdünnung der Kultur in frischem Medium wurde erstellt und bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phase inkubiert. Die Suspensionen wurden auf LB Agar mit unterschiedlichen Kupfersulfat-Konzentrationen aufgetragen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die MHK wurde als die minimale Konzentration an Kupfersulfat bestimmt, bei der kein Wachstum mehr stattfand.

2.17 Wachstumskinetiken

Die zu untersuchenden Bakterien wurden bei 37°C und 200 rpm auf einem Schüttler bis zum Erreichen der stationären Phase in LB Medium inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen 1:100 verdünnt und erneut inkubiert. Alle 20 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Zelldichte bei OD₆₀₀ gemessen. Die Messungen erfolgten bis zum Erreichen der stationären Phase.

2.18 Massenspektrometrische Analysen

2.18.1 MALDI-TOF MS Analysen

Um mittels *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) Proben zu bestimmen, müssen diese mit einem Laser beschossen und so ionisiert werden (Laser Desorption/Ionisation). Die ionisierten Teilchen werden in einem starken elektromagnetischen Feld beschleunigt und fliegen dann zum Detektor. Dort wird mittels der Fluggeschwindigkeit die Masse der Proteinteilchen bestimmt und deren relative Anzahl mittels der Auftreffintensität gemessen. Für ein bestimmtes

MATERIAL UND METHODEN

Protein einer bestimmten Masse entsteht so ein Massen-Peak. Die Summe der Massen-Peaks ergeben so das Massenspektrum.

Die zu untersuchenden Keime wurden über Nacht bei 37°C auf festen Nährmedien inkubiert. Eine Impföse (1 µL) Zellmaterial wurde abgenommen und in 300 µL hochreines Wasser eingerieben. Die Proben wurden durch Vortexen homogenisiert und 900 µL Ethanol abs. hinzugefügt und gemischt. Die Suspension wurde anschließend bei 13000 × g zentrifugiert, die komplette Flüssigkeit abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurden 10 – 50 µL 70%ige Ameisensäure hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Im Anschluss wurde die gleiche Menge Acetonitril wie Ameisensäure hinzugegeben und die Probe gut homogenisiert. Die Proben wurden 2 Minuten bei 13000 × g zentrifugiert. Dann wurde 1 µL des klaren Überstandes auf die MALDI-Target-Platte pipettiert und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die mit Proben belegten Messfelder der MALDI-Target Platte wurden mit 2 µL Matrixlösung überschichtet und erneut trocknen gelassen. Anschließend wurden die Proben mittels MALDI-TOF MS Analyse an Microflex MALDI-TOF mass spectrometer gemessen. Folgende Einstellungen wurden zur Messung eingestellt:

Spannung:	positiv
Pulsdauer:	120 nsec
Ionenspannung:	20 kV, 18,05 kV
Linsenspannung:	6 kV
Probennahme:	2 nsec
Wiederholungsrate:	240 Messungen pro Spot mit einer Wiederholungsrate von 60Hz

Um die Matrixlösung herzustellen, wurde zunächst eine Stock-Lösung angesetzt.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Stock-Lösung (1 mL)

- 475 µL hochreines Wasser
- 25 µL 100% Trifluoressigsäure
- 500 µL Azetonitril

Matrixlösung

2,5 mg α -Zyano-4 Hydroxycimtsäure (HCCA) in 250 µL Stock-Lösung gelöst.

2.18.2 Fettsäureanalyse

Bakterien wurden ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C auf LB-Agar inkubiert. Die Fettsäuremethylester (*fatty acid methyl ester*: FAME) wurden nach dem MIDI *technical note* #101 Protokoll (http://www.midi-inc.com/pdf/MIS_Technote_101.pdf) extrahiert, an einem Agilent Gas Chromatographen gemessen und anschließend analysiert. Für die Vorbereitung wurden folgende Reagenzien hergestellt:

Lösung 1: 45 g Natriumhydroxid

150 mL Methanol

150 mL Aqua dest.

Lösung 2: 325 mL 6,0 M Salzsäure

275 mL Methanol

Lösung 3: 200 mL Hexan Lösung

200 mL tert-butyl-methyl-Ether

Lösung 4: 10,8 g Natriumhydroxid

900 mL Aqua dest.

Nach der Anzucht der Bakterien wurden ca. 40 mg (Feuchtwicht) der Bakterien abgenommen und zur Esterabspaltung (Verseifung) in 1 mL Lösung

1 resuspendiert. Die Proben wurden gevortext und für 5 Minuten auf 100°C erhitzt, erneut gevortext und für weitere 25 Minuten auf 100°C erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt. Zur Methylierung wurden 2 mL der Lösung 2 hinzugegeben, gevortext, für 10 Minuten auf 80°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Um die Fettsäuren zu extrahieren, wurden 1,25 mL Lösung 3 hinzugegeben und für 10 Minuten vorsichtig geschüttelt, so dass sich 2 Phasen bilden. Die wässrige Phase wurde abgenommen und verworfen. Um die organische Phase von den Resten der wässrigen Phase zu reinigen, wurden 3 mL Lösung 4 hinzugegeben und für 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde 2/3 dieser Phase entnommen und mittels Agilent Gas Chromatographen gemessen¹.

2.18.3 ICP-MS Analysen

Um eine Veränderung in der Aufnahme von Cu-Ionen in den in dieser Arbeit generierten Mutanten nachzuweisen, wurden *E. coli* und *E. coli* mCu60 mit Hilfe der *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS) untersucht. Dabei wird aus einem hochfrequenten ionisierten Argon-Strom bei bis zu 10.000°C Argon-Plasma gebildet. Die zu untersuchten Proben werden ionisiert und ihre Massen getrennt. Anschließend können die Massen quantitativ erfasst werden.

Um den Metall-Gehalt zu bestimmen, wurden je 40 µL der Zellsuspensionen ($2,5 \times 10^9$ Zellen / mL) des Wildtyps oder der Kupfer toleranten Mutante auf Kupfer- bzw. Edelstahlplättchen aufgestrichen und bis zu 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente das gleiche Volumen an PBS. Nach Inkubation wurden die Zellen mit 100 µL PBS abgewaschen und 30 Minuten bei 4°C und $4500 \times g$ zentrifugiert Um ungebundenes Kupfer zu eliminieren, wurden die entstandenen Pellets

¹ Erlern wurde die Methode von mir bei einem Forschungsaufenthalt 2012 am Instituto do Mar (IMAR-CMA) der Universität Coimbra (Portugal) in der AG Prof. Dr. Paula V. Morais. Jedoch wurden die in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisse durch Dr. Romeu Francesco (AG Prof. Dr. Paula V. Morais) gemessen.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

zweimal mit eiskaltem Tris-HCl / 10 mM EDTA-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit 67% (w/v) HNO₃ bei 70°C für 2 Stunden mineralisiert.

Für den Nachweis des Metall-Gehaltes in der Zytoplasma- und Membran-Fraktion, wurden parallele Ansätze gemischt und mechanisch durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer sowie den Rohextrakt voneinander zu trennen, wurde zur Fraktionierung bei 20800 × g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Rohextrakt konnte anschließend durch erneute Zentrifugation bei 98000 × g für 30 Minuten bei 4°C in die lösliche und die Membran-Fraktion getrennt werden. Anschließend wurde die Protein-Konzentration bestimmt und eine definierte Konzentration in 67% (w/v) HNO₃ mineralisiert [Lowry *et al.* 1951].

Die unterschiedlichen Fraktionierungen wurden mit Reinstwasser auf eine Endkonzentration von 2% (w/v) HNO₃ verdünnt. Als interner Standard wurde Indium mit einer Endkonzentration von 10 ppb (parts per billion) verwendet. Die Messungen wurden anschließend mit Hilfe der Plasma-induzierten Massenspektrometrie bestimmt².

Die errechneten Werte wurden von ppm (parts per million), ppb oder ppt (parts per trillion) durch Verwendung der molaren Masse in Atome / Probe umgerechnet. Durch die vorherige Bestimmung der KBE konnte die Anzahl der Zellen / Probe bestimmt werden und somit die Zell-Fraktion als mg / mL Protein errechnet werden. Die intrazelluläre Metall-Konzentration wurde durch Verwendung des mittleren Volumens von *E. coli*-Zellen (2 μm³) während des mittleren exponentiellen Phase bestimmt [Outten *et al.* 2001] .

² Die Messungen wurden durch Lucy Bauer und Martin Herzberg (AG Prof. Dr. Dietrich H. Nies) am Institut für molekulare Mikrobiologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

2.19 Antibiotika-Resistenztestungen

2.19.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Für die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von *E. coli*, *E. coli* mCu60, MRSA und MRSA mCu60 gegenüber verschiedenen Antibiotika wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet: der Mikrodilutionstest und der Gradientendiffusionstest. Zur Validation der Experimente dienten die Kontrollstämme *E. coli* ATCC 25922 für Gram-negative Erreger und *S. aureus* ATCC 29213 für Gram-positive.

Um die MHK zu bestimmen, wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C auf LB Agar inkubiert. Eine (bis einige) Kolonien wurden in 5 mL 0,9% (w/v) NaCl Lösung bis zum Erreichen einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen / mL (die etwa einem McFarland-Standard von 0,5 entsprachen, [McFarland 1907]) eingerieben.

2.19.1.1 Mikrodilutionstest

Ein Volumen von 50 µL der in NaCl gelösten Suspension wurde in 11 mL Müller-Hinton II Medium transferiert. Je 100 µL dieser Suspension wurde in eine Lochkammer der für Gram negative bzw. positive Erreger spezifischen Micronaut-S-Bw 96-Lochplatten pipettiert (Abbildung 5). Die Lochkammern dieser Mikrotiterplatten sind mit verschiedenen lyophilisierten Antibiotika in verschiedenen Mengen beschichtet, so dass nach Kulturzugabe definierte Antibiotikakonzentrationen im Wachstumsmedium resultieren. Anschließend wurden die Platten durch Klebefolie verschlossen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die MHK wurde durch die visuelle Überprüfung der Trübung bzw. der Bodensatzbildung verursacht durch Bakterienwachstum in µg / mL des jeweiligen definiert vorliegenden Antibiotikums bestimmt.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

A

<i>E. coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMC	CAZ	IMP	RAM	CMP	T/S	STR	GEN	DOX	TGC	CIP	LEV
R	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □
A	64/32 □	64 □	32 □	8 □	64 □	32/608 □	32 □	32 □	32 □	4 □	4 □	4 □
B	32/16 □	32 □	16 □	4 □	32 □	16/304 □	16 □	16 □	16 □	2 □	2 □	2 □
C	16/8 □	16 □	8 □	2 □	16 □	8/152 □	8 □	8 □	8 □	1 □	1 □	1 □
D	8/4 □	8 □	4 □	1 □	8 □	4/76 □	4 □	4 □	4 □	0,5 □	0,5 □	0,5 □
E	4/2 □	4 □	2 □	0,5 □	4 □	2/38 □	2 □	2 □	2 □	0,25 □	0,25 □	0,25 □
F	2/1 □	2 □	1 □	0,25 □	2 □	1/19 □	1 □	1 □	1 □	0,125 □	0,125 □	0,125 □
G	1/0,5 □	1 □	0,5 □	0,125 □	1 □	0,5/9,5 □	0,5 □	0,5 □	0,5 □	0,063 □	0,063 □	0,063 □
H	0,5/0,125 □	0,5 □	0,25 □	0,063 □	0,5 □	0,25/4,75 □	0,25 □	0,25 □	0,25 □	0,031 □	0,031 □	GC □
	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	S □

B

MRSA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	PEN	VAN	CLI	IMP	CIP	LEV	GEN	TGC	DOX	RAM	CMP	LIZ
R	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □	> □
A	2 □	64 □	8 □	32 □	4 □	4 □	32 □	4 □	8 □	8 □	64 □	16 □
B	1 □	32 □	4 □	16 □	2 □	2 □	16 □	2 □	4 □	4 □	32 □	8 □
C	0,5 □	16 □	2 □	8 □	1 □	1 □	8 □	1 □	2 □	2 □	16 □	4 □
D	0,25 □	8 □	1 □	4 □	0,5 □	0,5 □	4 □	0,5 □	1 □	1 □	8 □	2 □
E	0,125 □	4 □	0,5 □	2 □	0,25 □	0,25 □	2 □	0,25 □	0,5 □	0,5 □	4 □	1 □
F	0,0625 □	2 □	0,25 □	1 □	0,125 □	0,125 □	1 □	0,125 □	0,25 □	0,25 □	2 □	0,5 □
G	0,03125 □	1 □	0,125 □	0,5 □	0,063 □	0,063 □	0,5 □	0,063 □	0,125 □	0,125 □	1 □	0,25 □
H	0,015625 □	0,5 □	0,063 □	0,25 □	0,031 □	0,031 □	0,25 □	0,031 □	0,063 □	0,063 □	0,5 □	GC □
	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	< □	S □

Abbildung 5: Belegungsschemata der zu untersuchenden Keime.

Schematische Darstellung einer 96-Loch MHK Platte mit verschiedenen Antibiotika in aufsteigenden Konzentrationen (in µg / mL) für *E. coli* Wildtyp und mCu60 (A), sowie MRSA Wildtyp und mCu60 (B). In grün wurden die nach den Richtlinien des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>) zu erwartenden Ergebnisse markiert. Die untersuchten Antibiotika für *E. coli* (A) waren: Amoxicillin-Clavulansäure (AMC), Ceftazidim (CAZ), Imipenem (IMP), Rifampin (RIF), Chloramphenicol (CMP), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (T/S), Streptomycin (STR), Gentamicin (GEN), Doxycycline (DOX), Tigecycline (TGC), Ciprofloxacin (CIP) und Levofloxacin (LEV). Für MRSA (B) wurden folgende Antibiotika untersucht: Penicillin (PEN), Vancomycin (VAN), Clindamycin (CLI), Imipenem (IMP), Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LEV), Gentamicin (GEN), Tigecycline (TGC), Doxycyclin (DOX), Rifampin (RAM), Chloramphenicol (CMP) und Linezolid (LIZ). Sensitive Stämme wurden mit S und resistente Stämme mit R bestimmt. Eine Wachstumskontrolle (GC) wurde für jede Messung durchgeführt.

2.19.1.2 Gradientendiffusionstest

Der Gradientendiffusionstest ist eine Kombination aus Agardiffusionstest und MHK-Wertbestimmung. Die Wirkstoffstreifen enthalten einen Antibiotika-Gradienten, d.h. eine aufsteigende Antibiotika-Konzentration.

Zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration wurde ein steriler Watte-Tupfer in die oben im Mikrodilutionstest beschriebene Suspension getaucht und die Zellsuspension gleichmäßig auf eine LB-Agar Platte ausgestrichen, so dass ein gleichmäßiges, rasenartiges Wachstum erwartet werden konnte. Anschließend wurde der mit einem Antibiotikum als Gradient vorliegendem Test-Streifen in die Mitte der Platte gelegt und vorsichtig mit einer sterilen Pinzette angedrückt. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C bebrütet (Abbildung 6). Nach Ausbildung eines Hemmhofes bei sensiblen Keimen kann am Schnittpunkt des ellipsoiden Hemmhofes mit dem Teststreifen anhand einer aufgedruckten Skala der MHK-Wert abgelesen werden.

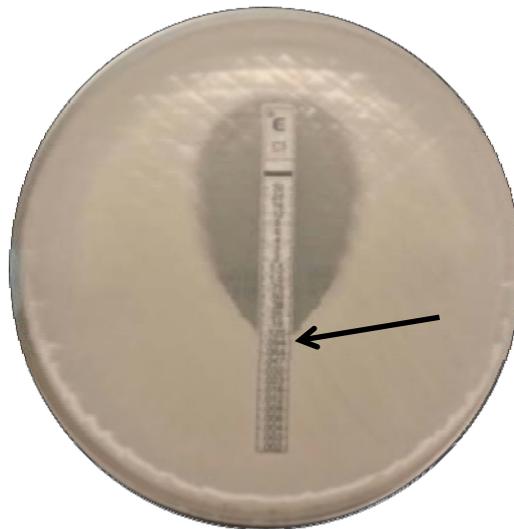


Abbildung 6: Quantitative Auswertung eines Agardiffusionstests.

Der ellipsoide Bereich um den antibiotikahaltigem Streifen definiert die Wachstumsgrenze (Pfeil). Der MHK-Wert wird hier definiert als die niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der kein Erregerwachstum mehr sichtbar ist.

2.20 Nukleinsäurepräparationen

Für die Extraktion von Nukleinsäuren wurden die Bakterien über Nacht auf LB Agar bei 37°C inkubiert. Um die Gesamt-DNA zu extrahieren, wurde das QIAmp DNA Mini Kit verwendet. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Proben wurden mit 100 µL RNase freiem Wasser aus der Affinitätssäule eluiert.

Um Gesamt-RNA zu isolieren wurden einige wenige Kolonien in 100 µL RNase freiem Wasser eingerieben und für 3 Minuten bei 8000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µL RNase freiem Wasser resuspendiert. Dann wurden 100 µL einer 1:1 Chloroform/Phenol Lösung hinzugegeben und die Lösung für 30 Minuten bei 70°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 10.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Genau 100 µL des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte durch das RNeasy Kit. Hierbei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das Elutionsvolumen betrug 50 µL.

2.20.1 Quantifizierung der Nukleinsäuren

Um Nukleinsäure zu quantifizieren, wurden diese mittels NanoDrop oder Qubit gemessen. Hierbei wurden die Nukleinsäurepräparate nach den Herstellerangaben behandelt, am Gerät vermessen und die Konzentration der DNA bzw. der RNA berechnet.

2.21 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Abschnitten. Die zu replizierende Sequenz wird durch Primer (kurze, einzelsträngige DNA Stücke) begrenzt, welche den Startpunkt der Replikation für die DNA Polymerase angeben. Die

MATERIAL UND METHODEN

Anlagerung (= Annealing) der Primer an die DNA (Primer-abhängig zwischen 50°C und 80°C) folgt dem Aufschmelzen (Denaturierung) des doppelsträngigen DNA-*Templates* bei 95°C. Die Replikation der DNA durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Elongation* der Einzelstränge) findet bei der optimalen Temperatur des Enzyms statt (meist 72°C). Der *Elongation* folgt die Trennung des neusynthetisierten Stranges vom *Template* durch erneutes Schmelzen. Der Prozess wird mehrere Male wiederholt, was zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA- Fragmentes führt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze. FP = Vorwärtsprimer, RP= Rückwärtsprimer

Reagenz	Menge in 1x Ansatz	Endkonzentration
Qiagen HotStar® MasterMix	25 µL	1x
FP (10µM)	1 µL	0,4 µM
RP (10 µM)	1 µL	0,4 µM
PCR-Wasser	21 µL	-

Danach Zugabe von 2 µL Proben-DNA.

Insgesamt 46 µL Mastermix + 2 µL Proben-DNA + 2 µL Primer = 50 µL pro Ansatz

Tabelle 10: Amplifikationsprotokoll für die PCR-Ansätze.

Temperatur	Zeit	Schritt	Zyklen
95°C	5 min	Aktivierung der Taq Polymerase	1
95°C	30 sec	Denaturierung	
60°C	30 sec	<i>Annealing</i>	37
72°C	30 sec	<i>Elongation</i>	
72°C	7 min	Finale <i>Elongation</i>	1
4°C	∞	Kühlung	∞

2.21.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standard-Methode um amplifizierte DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung mit Hilfe eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Ein 2%iges Agarosegel wurde durch mehrmaliges Aufkochen von 2 g Agarose in 100 mL 1xTAE-Puffer hergestellt, in die Gelelektrophorese-Kammer eingelegt und die Kammer mit 1 x TAE-Puffer befüllt. Zur Auftrennung der Amplifikate wurden 3 µL Amplifikat und 3 µL gefärbter 2 x „Loading Buffer“ zusammengemischt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Größenkontrolle der Fragmente wurde ein 100 bzw. 1 kb Basenpaar (bp) Marker-Mix verwendet, der standardisierte Banden im Größenbereich von 100 bis 1000 bp bzw. 1000 bis 10.000 umfasste. Die Proben wurden bei 100 Volt und 400 Ampere für 30 Minuten aufgetrennt.

Danach wurden die Agarosegele für ca. 30 Minuten in GelRed (3x) gefärbt. GelRed® ist ein Farbstoff, der in die Helixstruktur der DNA interkaliert, aber weniger giftig als z.B. Ethidiumbromid ist. Unter UV-Bestrahlung wurden die DNA-Banden visualisiert und die Gele mittels ChemiDoc fotografiert sowie katalogisiert.

2.22 Sequenzierung

2.22.1 Sequenzierung von Nukleinsäuren nach Sanger Methode

Nachdem die gewünschten DNA-Abschnitte amplifiziert und mittels Gelelektrophorese kontrolliert wurden, wurden die Amplifikate für die weitere Sequenzierung von Enzymen, Salzen und Oligonukleotiden gereinigt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente mittels QiaQuick PCR Purifikation erfolgt nach dem Prinzip der selektiven und quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren (Ausbeute bis zu 10 µg, Mindestgröße 100 bp) an eine Silicagelmembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während andere Bestandteile die Membran ungebunden passieren können. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

MATERIAL UND METHODEN

Es wurde nach der Didesoxymethode nach Sanger [Sanger *et al.* 1977] auf Grundlage der Kettenabbruchreaktion sequenziert. Im Terminator ReadyReaction Mix sind mit Fluoreszenz-Farbstoff markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs, unterschiedlich markiert), sowie übliche dNTPs enthalten. Die ddNTPs besitzen im Gegensatz zu den dNTPs keine 3`Hydroxygruppe und verhindern das kovalente Binden einer Phosphatgruppe, so dass die *Elongation* abbricht. Folge dieses Kettenabbruchs sind Fragmente mit unterschiedlicher Länge, die mit unterschiedlich markierten ddNTPs enden. Es wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Tabelle 11: Zusammensetzung der Farbmarkierungsreaktion. FP = Vorwärtsprimer, RP = Rückwärtsprimer

Reagenz	Menge in 1x Ansatz	Endkonzentration
Terminator Ready Reaction Mix	4 μ L	-
FP oder RP (10 μ M)	1 μ L	1 μ M
Template	2 μ L	3-20 ng
PCR-Wasser	3 μ L	-

Markiert wurden die Amplifikate nach folgendem Thermoprotokoll:

Tabelle 12: Thermocycler Protokoll der Farbmarkierung.

Temperatur	Zeit	Schritt	Zyklen
96°C	1 min	Aktivierung der Taq Polymerase	1
96°C	10 sec	Denaturierung	35
50°C	5 sec	<i>Annealing</i>	
60°C	4 min	<i>Elongation</i>	
4°C	∞	Kühlung	∞

Nach der Markierung wurden die Amplifikate mittels des DyeEX 2.0 Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Je 3 μ L der aufgereinigten Amplifikate

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

wurden mit je 12 µL des Lösemittels Formamid versetzt und in eine optische 96-Well Platte pipettiert, verschlossen und sequenziert.

Die Haus-interne Sequenzierung erfolgte am 3130 Genetic Analyzer. Verwendet wurde ein 36 cm langes Kapillarsystem, welches das Sequenzieren von bis zu 500 bp erlaubt. Die Fragmente wurden entsprechend ihrer Größe geordnet, vom Gerät sortiert und per Elektropherogramm wiedergegeben. Sequenziert wurden immer beide komplementären Einzelstränge, so dass durch das Übereinanderlagern von Vorwärts- und Rückwärtsstrang Sequenzen bis 800 bp ermittelt werden konnten. Dies erfolgte über die Elektropherogramme mittels der Software BioNumerics.

2.22.2 Ganzgenomsequenzierung

Die Sequenzierung, Annotierung und Assemblierung der Genome wurde mittels MiSeq durchgeführt. Die Sequenzierung mit dieser Technologie basiert auf der Hybridisierung von DNA-Molekülen an zwei verschiedenen oberflächengekoppelten Oligonukleotiden auf einer sog. *Flow Cell* und der anschließenden Vervielfältigung per *Bridge Amplification* zu Clustern. Um die Moleküle von beiden Seiten zu sequenzieren, sind spezifische Adapter an den Enden notwendig.

Das DNA-Ausgangsmaterial wird dafür zuerst in ca. 200 bp lange Fragmente zerkleinert und an beiden Enden werden chemisch Adapter angelagert. Die vorpräparierte DNA wird an einer festen Oberfläche, der *Flow Cell*, gebunden. Auf dieser befinden sich vorgefertigte Adaptoren, an denen die vorpräparierten DNA-Moleküle binden können. Der gebundene einzelsträngige DNA-Strang dient nun als Vorlage für weitere Amplifikationen. Hierbei wird der einzelsträngige DNA-Strang über das freie Ende an einen neuen Adaptor gebunden (*Bridge Amplification*). Anschließend werden Nukleotide mit reversiblen, fluoreszenzmarkierten Terminatoren, zur Neusynthese des Gegenstrangs eingebaut. Die doppelsträngige DNA wird wiederum durch einen Denaturierungsschritt gelöst und abgespaltet. So können die eingebauten Basen anhand eines Vier-Farben Systems bestimmt werden. Ist die

Sequenzierung erfolgreich, so können die Cluster regeneriert werden und die Moleküle können von der anderen Seite her sequenziert werden (Abbildung 7).

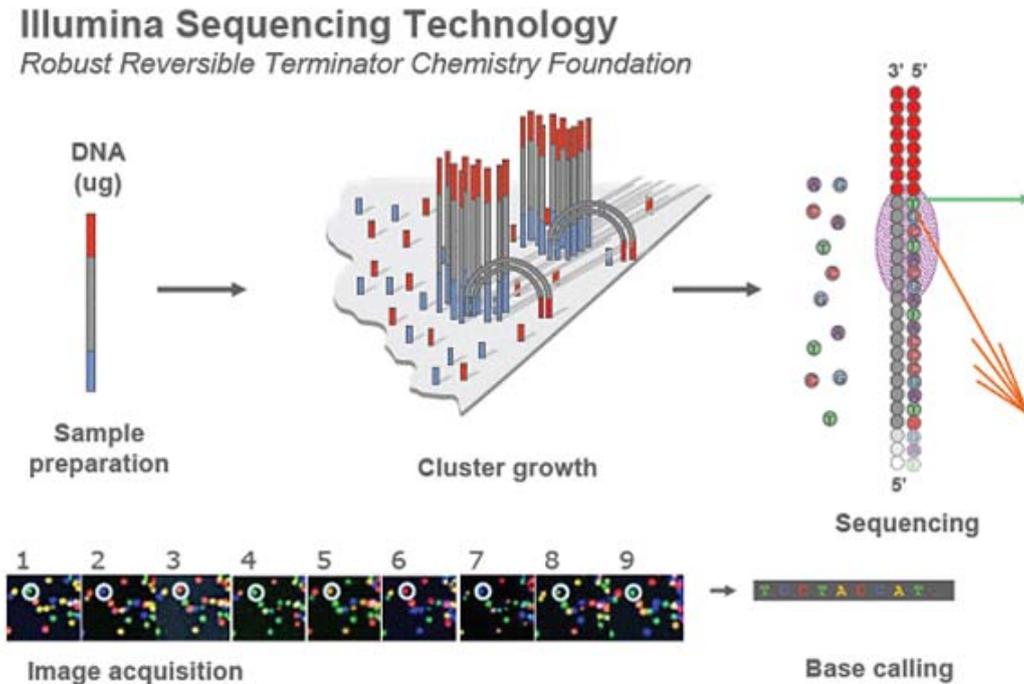


Abbildung 7: Prinzip der Illumina MiSeq Sequenzierung.

Um DNA zu sequenzieren wird diese zunächst in 200 bp lange einzelsträngige DNA-Fragmente zerkleinert und mit Adaptoren an beiden Enden verbunden. Diese Adaptoren binden wiederum an immobilisierten komplementären Gegenstücken auf der Flow Cell und bilden sog. Brücken (*Bridge Amplification*). An diese nun fixierten einzelsträngigen DNA-Molekülen binden fluoreszenzmakierte Nukleotide und bilden so doppelsträngige DNA-Moleküle. Diese können abgespalten werden, als Fluoreszenz-Signal detektiert und ausgewertet werden.

(http://openwetware.org/images/7/76/BMC_IlluminaFlowcell.png)

Je 5 µg genomischer DNA der Stämme *E. coli* W3110, *E. coli* W3110 mCu60, MRSA N315 und MRSA N315 mCu60 wurde für jeden zu sequenzierenden Stamm präpariert. Anschließend wurde Whole Genome Sequence (WGS) Bibliotheken aus der gewonnenen genomischen DNA durch das Illumina-compatible Nextera DNA Sample Prep Kit nach dem Hersteller-Protokoll erstellt und auf dem Illumina MiSeq Sequenzierer als „2 x 250 bp“ Läufe sequenziert. Die *E. coli* Sequenzen wurde im Anschluss gegen *E. coli*

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

W3110: NC_007779.1 und die MRSA Sequenzen gegen MRSA N315: NC_002745.2 mit Hilfe des Alignment Programms SARUMAN [Blom *et al.* 2011] gemappt³. Die Sequenziertiefe lag zwischen 200 und 350. Als CutOff Wert wurden Single Nucleotide Polymorphismus (SNPs) nur mit einem Minimum von 10 Sequenz-Wiederholungen und einer Allel-Häufigkeit von mindestens 80% festgelegt. Um eine *de novo* Assemblierung durchführen zu können, wurde der Newbler Assembler v2.8 von Roche verwendet.

2.22.3 Vergleichende cDNA Sequenzierung

Um das Transkriptom der zu untersuchenden Stämme zu charakterisieren, wurde zunächst 10 µg totaler RNA präpariert. Die vorhandene ribosomale RNA wurde mit Hilfe des Ribo-Zero rRNA removal kit for Bacteria nach Hersteller Anleitung entfernt und durch Ethanol Präzipitation gereinigt. Für jede gereinigte RNA Probe wurde je eine cDNA Bibliothek erstellt. Dafür wurde das TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die erstellten Bibliotheken wurden auf dem Illumina MiSeq Sequenzierer als „2 x 50 bp“ Läufe sequenziert. Die *E. coli* Sequenzen wurden gegen das Referenzgenom *E. coli* W3110 (NC_007779.1) und die MRSA Sequenzen gegen das Referenzgenom MRSA N315 (NC_002745.2) mit Hilfe des Alignment Programms SARUMAN gemappt. Die relativen Expressionsraten wurden mit Hilfe von ReadXplorer [Hilker *et al.* 2014] kalkuliert und visualisiert.

³ WGS - und RNASeq-Sequenzierungen wurden von Dr. Christian Rückert (AG Prof. Dr. Jörn Kallinowski) am CeBiTec der Universität Bielefeld durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Inaktivierung von Hochpathogenen Erregern durch metallische Kupferoberflächen

Die effektivste Methode, die Wirkung antimikrobieller Kupferoberflächen nachzuweisen, ist die sogenannte *Contact Killing* Methode [Espirito Santo *et al.* 2008]. Dabei wird eine vorher definierte Zellzahl in einem geringen Volumen auf die zu untersuchende Kupferoberfläche gebracht. Die geringe Flüssigkeitsmenge verdunstet in Sekunden, so dass die Zellen in direkten Kontakt zur Oberfläche kommen. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit wird in sogenannten *Killing Curves* dargestellt, in denen die Zahl der überlebenden Zellen gegenüber der Expositionszeit aufgetragen wird.

3.1.1 Inaktivierung nicht Endosporen-bildender Bakterien

Die Untersuchung der Inaktivierungsgeschwindigkeiten von B-Agenzien auf metallischen Kupferoberflächen ergab, dass alle getesteten nicht Sporenbildenden Erreger innerhalb von wenigen Minuten vollständig inaktiviert waren. Auf den Kontrollflächen aus Edelstahl konnte nur eine leichte Abnahme der Erregerlast nachgewiesen werden. Diese leichte Inaktivierung auf Edelstahloberflächen wurde durch das Auftragen auf die Oberflächen selbst als auch durch die Austrocknung verursacht (Abbildung 8). Auf Kupferoberflächen wurden die untersuchten Erreger *B. mallei* und *B. pseudomallei* innerhalb von 30 Sekunden vollständig inaktiviert (Abbildung 8 A und B). *Y. pestis* war nach einer Minute inaktiviert (Abbildung 8 C) und *B. melitensis*, sowie *F. tularensis tularensis* nach 3 bzw. 5 Minuten (Abbildung 8 D und E).

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

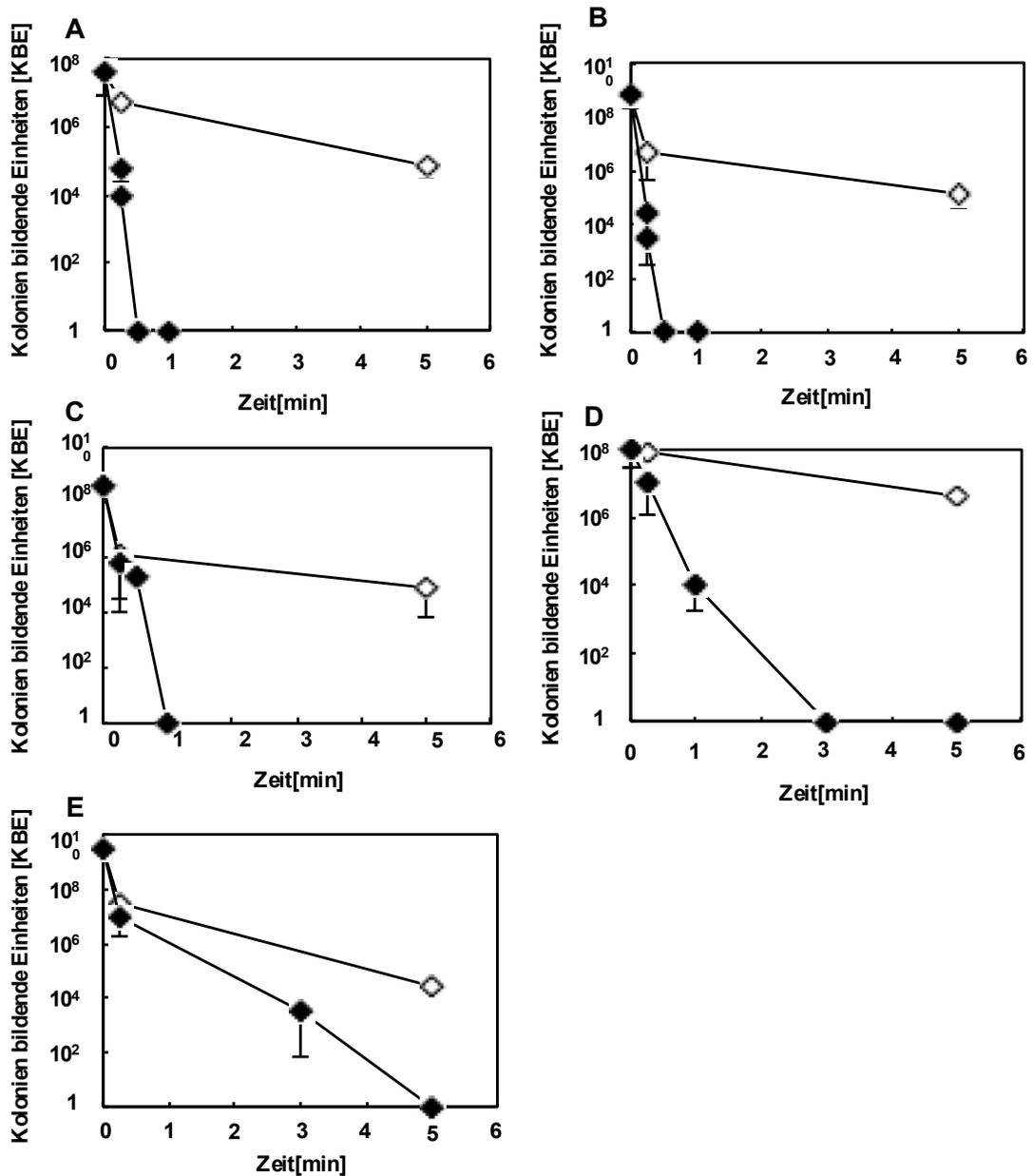


Abbildung 8: Inaktivierung von B-Agenzien durch metallische Kupferoberflächen.

Die Erreger wurden auf massive Kupferplättchen (schwarze Symbole) oder Edelstahl aufgetragen (offene Symbole), für unterschiedliche Zeiten inkubiert, von den Oberflächen abgewaschen und auf feste Nährmedien ausplattiert. Die Kulturen wurden für 24 - 48 Stunden inkubiert und überlebende Zellen als Kolonien bildende Einheiten (KBE) gezählt. Dargestellt sind *B. mallei* (A), *B. pseudomallei* (B), *Y. pestis* (C), *B. melitensis* (D) und *F. tularensis* (E).

3.1.2 Inaktivierung von *Bacillus anthracis* und seinen Endosporen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die in dieser Studie untersuchten B-Agenzien durch metallische Kupferoberflächen inaktiviert wurden, blieb zu klären, ob Kupferoberflächen ebenfalls das Gram positive Endosporenbildende Bakterium *B. anthracis* inaktivieren können. Für die experimentellen Ansätze wurden zwei Stämme verwendet: zum einen der hochpathogene Stamm Ames und der attenuierte Stamm Sterne. Beide Stämme unterscheiden sich in den Virulenzplasmiden. So besitzt der voll virulente Stamm Ames sowohl das pXO1 als auch das pXO2 Plasmid (pXO1⁺/pXO2⁺). Für die Ausprägung des Krankheitsbildes Milzbrand sind die Pathogenitätsfaktoren beider Plasmide notwendig. Das pXO1 Plasmid kodiert für die alternativen binären Exotoxine, bestehend aus dem protektivem Antigen, das die Endozytose vom Ödem- bzw. Letalfaktor in der Wirtszelle vermittelt. Das pXO2 Plasmid kodiert für Gene, die für die Kapselbildung aus Poly- γ -Glutaminsäure verantwortlich sind. Die Kapsel verhindert die Phagozytose durch Wirtsmakrophagen. Der Stamm Ames wird folglich der Risikogruppe 3 zugeordnet, während der attenuierte Impfstamm Sterne lediglich über die Exotoxine (pXO1⁺/pXO2⁻) verfügt und damit ein Erreger der Risikogruppe 2 ist.

Beide Stämme wurden durch massives metallisches Kupfer innerhalb von mindestens 24 Stunden nicht inaktiviert (Abbildung 9, A und B). Die Zellzahl beider Stämme reduziert sich in den ersten 10 Minuten der Inkubation auf Kupfer um eine Log₁₀-Stufe und verblieb danach sowohl für den virulenten (Abbildung 9 A) als auch für den attenuierten (Abbildung 9 B) Stamm konstant.

Dieser anfängliche Rückgang der Lebendzellzahlen um eine Log₁₀-Stufe, gefolgt von konstanter Zahl KBE, könnte durch Endosporen verursacht werden, die einen erheblichen Anteil *Bacillus* Kulturen ausmachten. Um dies zu prüfen, wurden alle vegetativen Zellen des Ames Stammes durch Erhitzen der Kultur in einem Wasserbad für 30 Minuten bei 70°C inaktiviert. Die Gesamtzahl der lebenden Zellen reduzierte sich durch die Hitzebehandlung schon zu Beginn um 2-log₁₀ Einheiten im Vergleich zum ursprünglichen Ansatz und blieb aber dann über 24 Stunden Inkubation auf Kupfer konstant (Abbildung 9 C). Daraus wurde geschlossen, dass von den eingesetzten 10⁶ Zellen ca. 10% (10⁵)

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Sporen waren, von denen wiederum 10% (10^4) die Hitzebehandlung und die 24 stündige Inkubation auf massivem Kupfer überlebten. Damit wurde deutlich, dass vegetativen Zellen, nicht aber Endosporen, von *B. anthracis* effizient durch massive metallische Kupferoberflächen inaktiviert wurden.

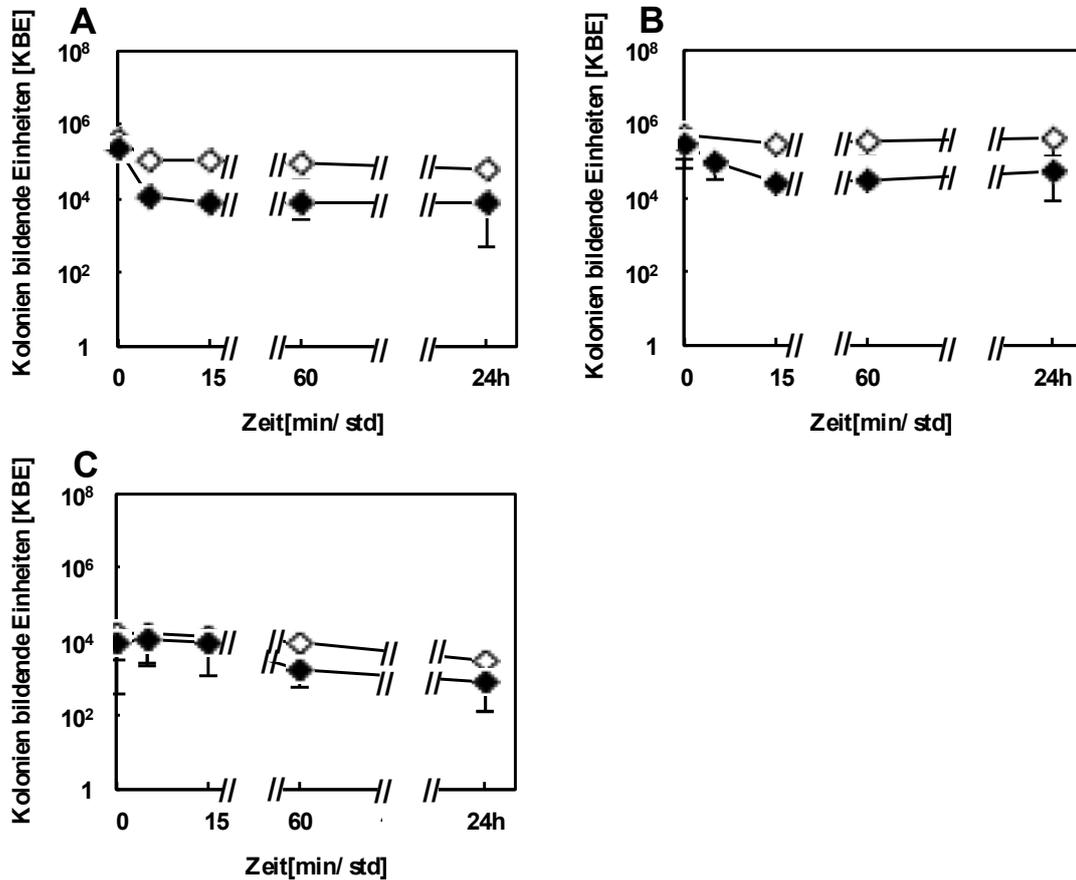


Abbildung 9: *B. anthracis* Endosporen widerstehen massivem Kupfer.

Bakteriensuspensionen bestehend aus vegetativen Zellen und Sporen wurden auf Kupfer (schwarze Symbole) und Edelstahl (offene Symbole) aufgetragen und für bis zu 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgenommen, auf festen Nährmedien ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die überlebenden Zellen wurden als KBE gezählt. Zu sehen ist der attenuierte Stamm Sterne (A) und der virulente Stamm Ames (B), sowie der für 30 Minuten bei 70°C erhitzte Ames Stamm (zur Inaktivierung vegetativer Zellen) (C).

3.1.3 Inaktivierung von Orthopockenviren

Um Rückschlüsse auf die Inaktivierung von Echten Pocken (*Orthopoxvirus variola*) ziehen zu können, wurden exemplarisch zwei Orthopockenviren-

Vertreter untersucht: zum einen das Vaccinia Virus (*Orthopoxvirus vaccinia* VACV, Impfstamm für Echte Pocken) und zum anderen das hochpathogene Affenpockenvirus (*Orthopoxvirus simiae* MPXV). VACV (Abbildung 10 A) sowie das hochpathogene MPXV (Abbildung 10 B) wurden innerhalb von 3 Minuten durch massive Kupferoberflächen vollständig inaktiviert, während die Viruspartikel auf Edelstahl überlebten. Für den Nachweis des *Contact Killings* bei Viren wurden die Plaque-bildenden Einheiten (PBE) nach der Anzucht auf Zellkulturen gezählt. Diese wurden für die Rückschlüsse auf die Effizienz des *Contact Killings* verwendet.

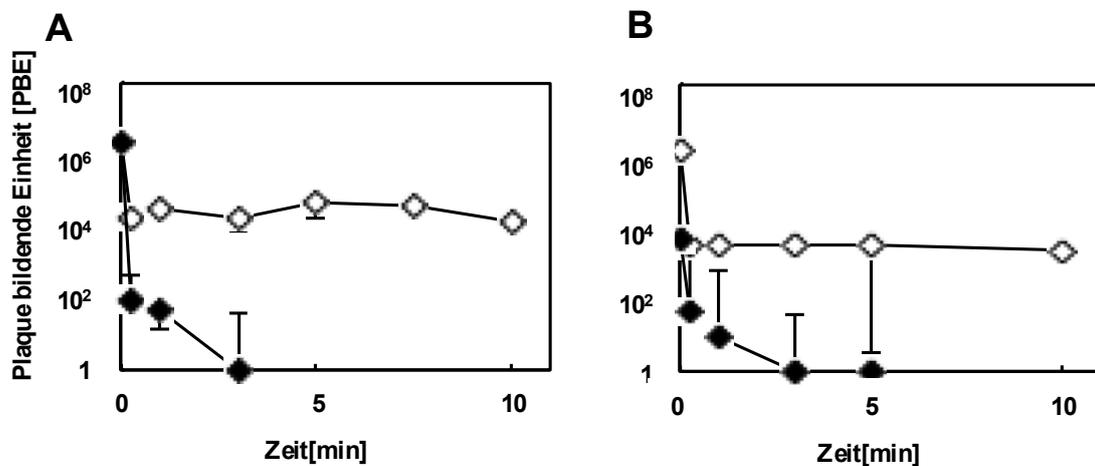


Abbildung 10: Inaktivierung von VACV und MPXV durch Kupferoberflächen.

Die Viruspartikel wurden auf Kupfer (schwarze Symbole) und Edelstahl (offene Symbole) für unterschiedliche Zeitpunkte exponiert, abgewaschen und zur Infektion von Zellen der afrikanischen Grünen Meerkaze (MA 104) verwendet. Die infizierten Zellen wurden für 48-62 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ (v/v) inkubiert. Die Zellen wurden nach erfolgreicher Infektion mit Kristallviolett gefärbt und die Viruspartikel als PBE gezählt. Dargestellt sind die PBE von VACV (A) und MPXV (B) nach Kupfer- und Edelstahl -Exposition.

3.1.4 Nachweis der Inaktivierung durch LIVE/DEAD Färbung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der erste Schritt zur vollständigen Inaktivierung von Erregern der Risikogruppen 1 und 2 die irreversible Zerstörung der Zellmembran ist [Espirito Santo *et al.* 2011; Horie *et al.* 2008; Noyce *et al.* 2006a; Quaranta *et al.* 2011]. Um nachzuweisen, dass auch bei hochpathogenen Bakterien die zytoplasmatische Membran als erstes

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

geschädigt wird, wurden diese Erreger nach Kupferstress mittels LIVE/DEAD Färbung markiert und mikroskopisch untersucht.

Aus Biosicherheitsgründen und auf Grund der technischen Ausstattung konnten die Bakterien nicht im BSL-3 Labor gefärbt werden, sondern mussten inaktiviert und aus dem BSL-3 Labor ausgeschleust werden, um dann im BSL-2 Labor gefärbt und mikroskopiert werden zu können. Um sicherzugehen, dass die Formaldehyd-Inaktivierung keinen negativen Einfluss auf die Erreger und folglich auf die Färbeeigenschaften der Zellen hat, wurde zunächst im BSL-2 Bereich *E. coli* als Modellorganismus mittels Formaldehyd inaktiviert und mikroskopiert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in den Färbeeigenschaften zu den nicht inaktivierten *E. coli* Zellen. Die Zellmembran wurde durch Formaldehyd nicht zerstört, weshalb sowohl die inaktivierten als auch die nicht-inaktivierten Zellen grün, und in einem geringeren Maße auch rot fluoreszierten. Der einzige Unterschied war die geringere Zelldichte, die durch Verluste infolge der verschiedenen Waschschriffe verursacht wurde.

Mittels *Killing Curve* Analyse konnte nachgewiesen werden, dass *B. pseudomallei* und *B. mallei* nach 30 Sekunden vollständig durch Kupfer inaktiviert wurden (Abbildung 8 A und B). Durch die LIVE/DEAD Färbung wurde nachgewiesen, dass alle Zellen nach 30 Sekunden rot fluoreszierten und somit die Zellmembran perforiert war und die Zellen tot waren (Abbildung 11 A und B). Gleichzeitig konnte aber gezeigt werden, dass Zellen, welche auf Edelstahl inkubiert wurden, nach 5 Minuten größtenteils grün fluoreszierten und somit metabolisch intakt waren (Abbildung 11 A und B). Diese Ergebnisse konnten ebenfalls bei *Y. pestis* nach 1 Minute (Abbildung 11 C), bei *B. melitensis* nach 3 Minuten (Abbildung 11 D) und bei *F. tularensis* nach 5 Minuten (Abbildung 11 E) auf massivem Kupfer gezeigt werden.

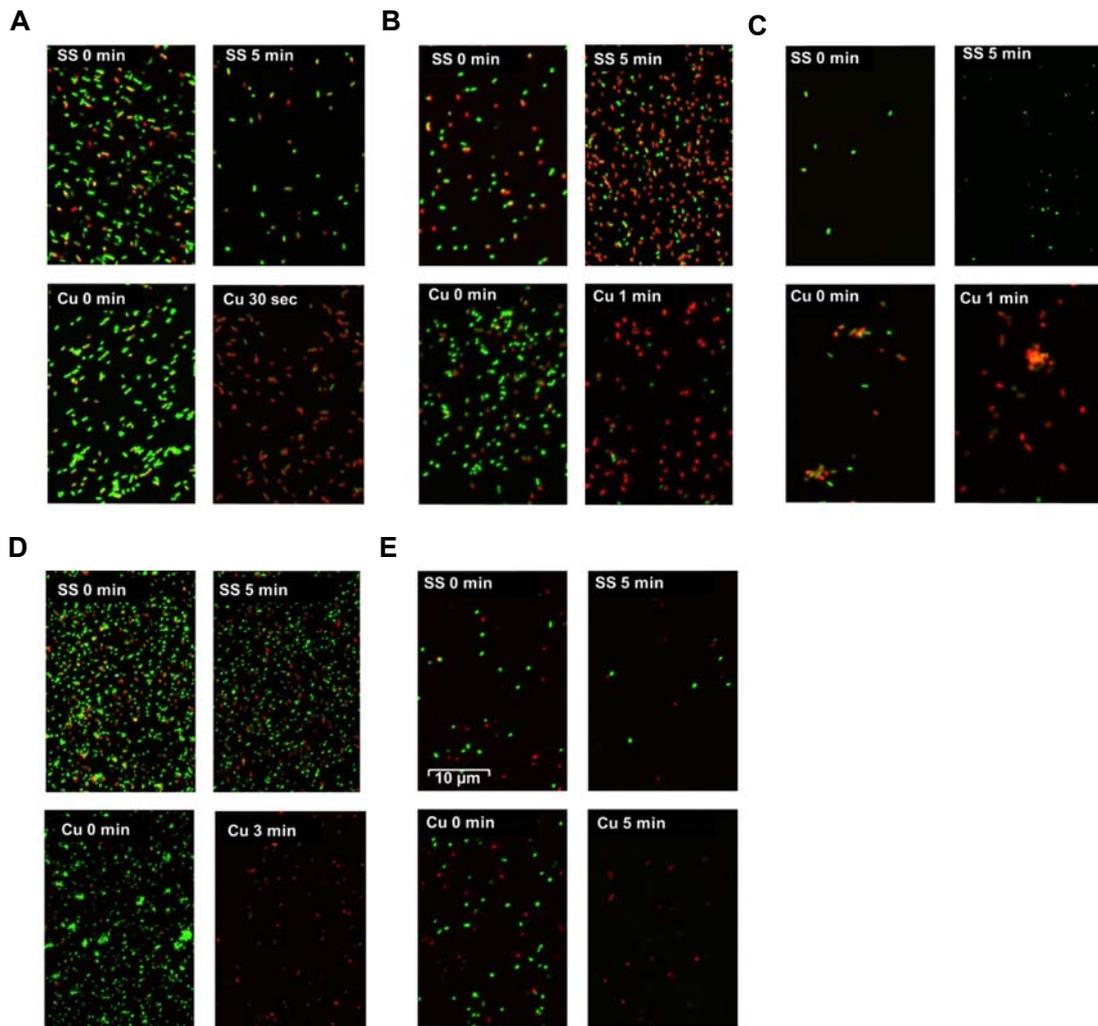


Abbildung 11: Lebend/Tot Färbung von B-Agenzien nach Kupfer- und Edelstahl-Exposition.

Die Erreger wurden auf die Oberflächen aufgetragen, für unterschiedlich lange Zeitpunkte inkubiert, durch Formaldehyd inaktiviert, gewaschen und mit LIVE/DEAD gefärbt. Zellen mit Membranschäden fluoreszieren rot, während Zellen mit intakter Membran grün fluoreszieren. Dargestellt sind *B. pseudomallei* (A), *B. mallei* (B), *Y. pestis* (C), *B. melitensis* (D) und *F. tularensis* (E). Die unterschiedlichen Zelldichten sind auf die Inaktivierung und die damit verbundenen Verluste durch Waschschritte vor dem Mikroskopieren zurückzuführen. Dargestellt sind repräsentative Bild-Ausschnitte aus mehrfach durchgeführten Experimenten.

Durch die LIVE/DEAD Färbung wurde nachgewiesen, dass die untersuchten Erreger spätestens nach 5 Minuten auf Kupfer eine geschädigte Zellmembran aufweisen. Um die Verbindung zwischen perforierter Zellmembran und Zelltod nachzuweisen, wurden die untersuchten Erreger bis

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

zu 60 Minuten auf massivem Kupfer inkubiert. Damit sollte gezeigt werden, ob die verlängerte Inkubation auch zur Auflösung der Zellintegrität führte. Es wurde der Impfstamm *Y. pestis* Ev76 als auch *B. anthracis* Sterne verwendet. *Y. pestis* Ev76 wurde als Modelorganismus für die vorher untersuchten Hochpathogenen gewählt und *B. anthracis* Sterne als Endo-Sporenbildner und somit als Vertreter für durch Kupfer nicht inaktivierbare Keime. Beide Erreger wurden bis zu 60 Minuten auf massivem Kupfer und Edelstahl inkubiert. *Y. pestis* Ev76 zeigte nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten auf Edelstahl keine stark erhöhte Zahl an rot fluoreszierenden Zellen (Abbildung 12 A). Während der virulente *Y. pestis* Stamm nach 1 Minute auf Kupfer eine vollständige Inaktivierung (Abbildung 8 C) sowie vollständig rot fluoreszierende Zellen (Abbildung 11 C) zeigte, war *Y. pestis* Ev76 zwar nach 1 Minute ebenfalls vollständig inaktiviert und rot fluoreszierend (Daten nicht gezeigt), wobei die Zellen dieses Stammes jedoch bereits nach 15 Minuten vollständig lysiert waren. Folglich wurden die Zellen nicht nur komplett inaktiviert, es ging sogar die komplette Zell-Struktur verloren (Abbildung 12 A).

Es wurde gezeigt, dass Endosporen des virulenten *B. anthracis* Stamms Ames als auch des attenuierten *B. anthracis* Stamms Sterne sogar nach 24 Stunden auf massivem Kupfer nicht inaktiviert wurden (Abbildung 9 A und B), die vegetativen Zellen jedoch bereits nach wenigen Minuten (Abbildung 9 C). Nach Inkubation einer kompletten Zellsuspension für 60 Minuten auf Kupfer konnte durch Kanalauftrennung gezeigt werden, dass die Sporen grün, die vegetativen Zellen aber rot fluoreszieren (Abbildung 12 B).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine reine Sporensuspension sowohl vor als auch nach Kupfer-Exposition mikroskopiert, wobei der überwiegende Teil der Sporen auch nach Kupfer-Exposition grün fluoreszierte (Daten nicht gezeigt). Damit wurde nachgewiesen, dass nur die vegetativen Zellen, jedoch nicht die Endosporen von *B. anthracis* durch massives Kupfer inaktiviert werden. Allerdings zeigten die vegetativen Zellen selbst nach 60 Minuten keine vollständige Auflösung der Zellstruktur wie dies bei *Y. pestis* EV76 (Abbildung 12 A) der Fall war. Somit scheinen selbst die vegetativen *B.*

anthracis Zellen robuster gegen die vollständige Lyse durch massives Kupfer zu sein als die von *Y. pestis*.

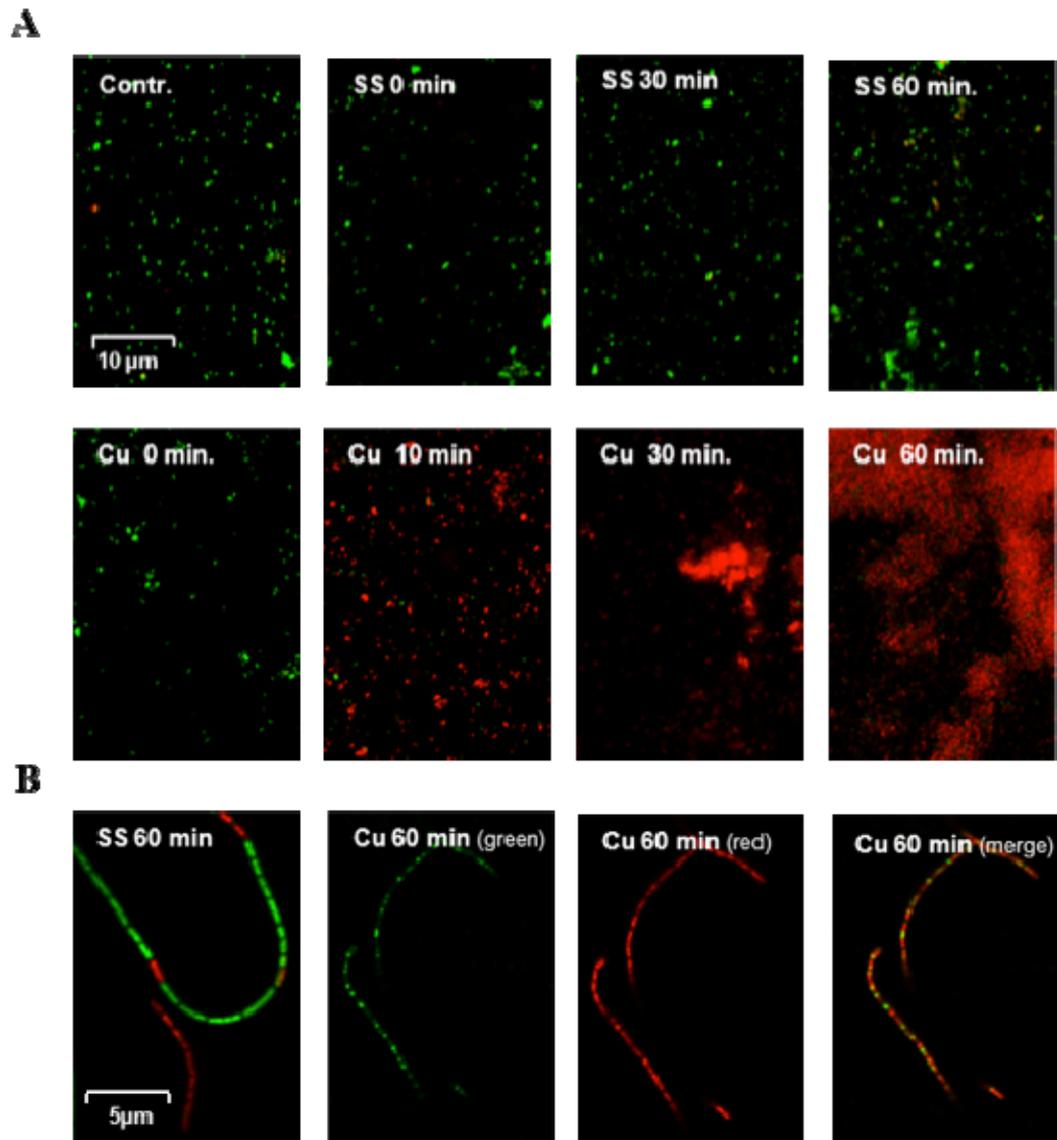


Abbildung 12: Verlängerte Exposition von *Y. pestis* EV76 und *B. anthracis* auf massiven Kupfer-Oberflächen.

Y. pestis EV 76 (Impfstamm, A) sowie *B. anthracis* Sterne (B) wurden Kupfer bzw. Edelstahl für bis zu 60 Minuten ausgesetzt und anschließend mittels LIVE/DEAD Färbung gefärbt. Um die vegetativen Zellen und Endosporen von *B. anthracis* besser zu unterscheiden zu können, wurden die Farbkanäle überlagert (merge) als auch einzeln (green, red) dargestellt (B).

3.2 Kupfer-Toleranz von MRSA und *E. coli*

Im Zusammenhang mit antimikrobiellem metallischem Kupfer ist bisher die Frage unbeantwortet, ob gegen solche Oberflächen auch Toleranzen oder Resistenzen entstehen können, und ob diese relevant für den klinischen Alltag sind. Bei der antimikrobiellen Wirkung von Stoffen (wie Antibiotika oder Kupfer) kann es über die Zeit hinweg immer zum Auftreten einer oder mehrerer Resistenzen kommen. Um eventuell auftretende Resistenzen zu identifizieren und charakterisieren, wurden zwei verschiedene Bakterienspezies untersucht: das Gram-positive nosokomial-relevante MRSA (N315) und das Gram-negative Referenzbakterium *E. coli* (W3110).

3.2.1 Inaktivierung von *E. coli* und MRSA Wildtyp-Zellen durch Kupfer

Vor der Generierung und Charakterisierung von Mutanten wurden die Wildtyp-Bakterien von *E. coli* und MRSA mittels *Contact Killing* untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass *E. coli* innerhalb einer Minute nach Kontakt mit massivem Kupfer vollständig inaktiviert wurde (Abbildung 13 A). Für MRSA wurde der Zeitpunkt der vollständigen Inaktivierung durch den *Contact Killing* Mechanismus ebenfalls bestimmt: Die vollständige Inaktivierung erfolgte nach 5 Minuten auf massivem Kupfer (Abbildung 13 B).

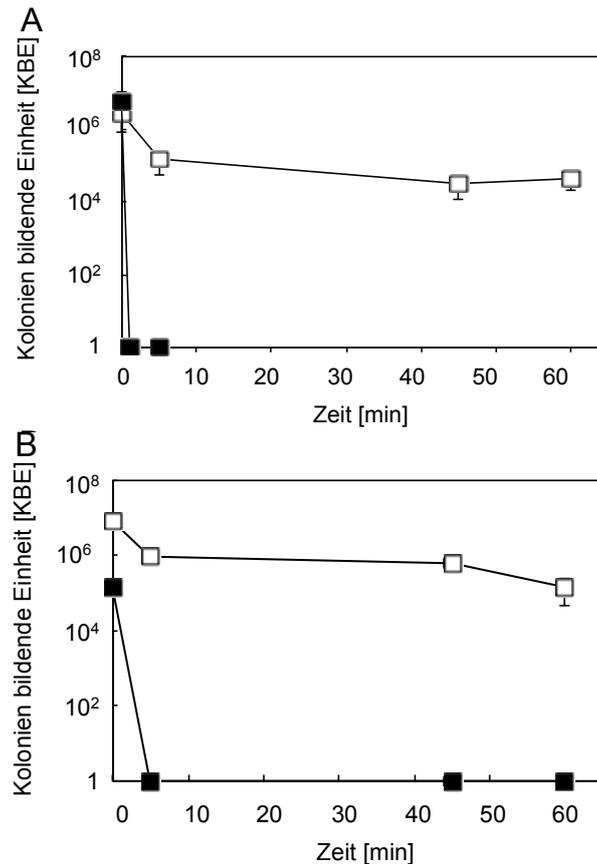


Abbildung 13: Inaktivierung von *E. coli* W3110 und MRSA N315 durch metallische Kupferoberflächen.

Die Erreger wurden auf massive Kupferplättchen (schwarze Symbole) oder Edelstahl (offene Symbole) aufgetragen, für unterschiedliche Zeiten inkubiert, von den Oberflächen abgenommen und auf feste Nährmedien ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden als KBE gezählt.

3.2.2 Bakterien treten nach „Kupfer-Stress“ nicht in den VBNC-Status über

Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine Vielzahl von Bakterien bei Stress in den Viablen, aber nicht kultivierbaren (Viable but not culturable, VBNC)-Status übergehen und wieder aus diesem Stadium zurück in den metabolisch-aktiven Zustand eintreten können [Alexander *et al.* 1999; Besnard *et al.* 2002; Cook *et al.* 2007; Ghezzi *et al.* 1999; Oliver 1995; 2010; Xu *et al.* 1982]. Wenn humanpathogene Bakterien durch massive Kupferflächen wie z. B. Türklinken

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

gestresst werden, stellt sich die Frage, ob diese dann auch in den VBNC-Status übergehen, für den bekannt ist, dass die Erreger in diesem Zustand infektiös bleiben können [Oliver 2010].

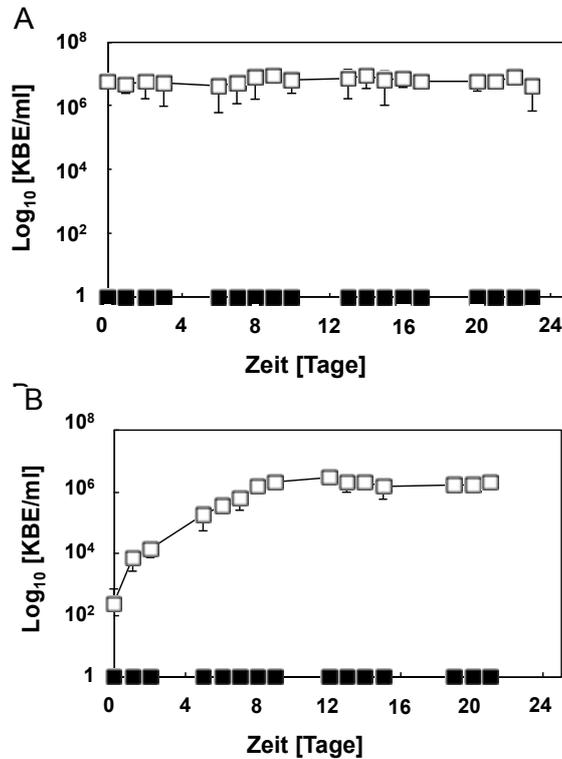


Abbildung 14: Kupfer-gestresste Bakterien treten nicht in den VBNC-Status über.

Nach Stress durch massives Kupfer (schwarze Symbole) oder Edelstahl (offene Symbole) wurden *E. coli* (A) oder MRSA (B) mit einem Metallionenchelator gewaschen und über 3 Wochen auf Austritt aus dem VBNC-Status beobachtet.

Es wurde untersucht, ob Keime nach Kupferflächen-Stress, zur möglichen Induktion des VBNC-Zustands und anschließender Stressumkehr durch Inkubation mit einem Metallionenchelator zur Wiederbelebung (Resuszitierung) der Erreger, wieder vermehrungsfähig und somit metabolisch aktiv werden würden. Dafür wurden die Erreger für bis 10 Minuten auf Kupfer- bzw. Stahloberflächen inkubiert, mit EDTA (als Kupferionen-Chelator) gewaschen und bei 28°C inkubiert. Der Zeitpunkt 10 Minuten wurde gewählt, da dann die Zellen zwar tot sind, die Zellintegrität jedoch noch vorhanden ist.

Jeden Tag wurde ein Aliquot entnommen und die KBE bestimmt. *E. coli* und MRSA, welche auf massivem Kupfer inkubiert wurden, wiesen nach drei Wochen Inkubationszeitraum keine Resuszcitation auf. Die Zellzahlen nach Kupferstress betragen konstant null, Wachstum wurde nie beobachtet. Im Vergleichsexperiment nach Stahl-induziertem Stress belief sich die Zellzahl konstant auf ca. 10^7 Zellen/ mL für *E. coli* (Abbildung 14 A), wo hingegen MRSA nach „Edelstahl-Stress“ neun Tage benötigte, um die Ausgangszellzahl von 10^6 Zellen/ mL zu erreichen und diese konstant zu halten (Abbildung 14 B).

Insgesamt konnte festgehalten werden, dass reines, massives metallisches Kupfer in den getesteten Erregern keinen VBNC-Zustand ausgelöst hatte. Die Inaktivierung, das *Contact Killing* durch trockene Kupferflächen, kann damit als vollständig und endgültig angesehen werden.

3.2.3 Generierung Kupfer-toleranter Bakterien durch gerichtete Selektion

Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnten Kupfer-tolerante Bakterien von normalen Münzen aus dem Zahlungsverkehr isoliert und charakterisiert werden [de Carvalho *et al.* 2014; Espirito Santo *et al.* 2010; Kalita *et al.* 2013]. Aufgrund dieser Beobachtung sollte es möglich sein, auch künstlich die Toleranz von Bakterien gegenüber massivem Kupfer zu steigern. Um dies zu testen wurden *adaptive laboratory evolution* (ALE) Experimente und *mutation accumulation experiments* (MAE) kombiniert. ALE ist eine *in vitro* Methode, die grundlegenden Mechanismen molekularer Evolutionen und adaptiven Veränderungen, ausgelöst durch selektiven Stress, innerhalb von bakteriellen Populationen nachzuweisen [Conrad *et al.* 2009; Fong *et al.* 2005; Fridman *et al.* 2014; Herring *et al.* 2006]. MAE hingegen führt durch Stress zu kontinuierlichen, spontanen Mutationen. Dabei entstehen die Mutanten durch Fehler in der DNA Replikation, durch DNA Beschädigung oder durch genomische Neuaneordnungen.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Hierfür wurden *E. coli* und MRSA, die durch massives Kupfer inaktiviert werden können (Abbildung 13), für eine verkürzte Zeit Kupferstress ausgesetzt. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass nur Zufallsmutanten, welche toleranter gegenüber Kupfer sind, gerade noch überlebten. Die meisten Zellen wurden inaktiviert, während einige wenige überlebten. Diese überlebenden Kolonien wurden erneut vermehrt und als Gründerpopulation für die nächste Runde des Experiments, mit etwas verlängerter Expositionszeit auf Kupfer, verwendet, so dass die Toleranz gegenüber Kupfer mit jeder Generation gesteigert wurde (Abbildung 4). Der wiederholte Wachstumsschritt wurde eingeführt, um das Wachstum ohne Selektionsdruck zu fördern und die genetische Vielfalt durch Replikationsfehler zu steigern (Drake 1991).

Diese Form der künstliche Evolution wurde für *E. coli* 41 und für MRSA 38 Mal wiederholt, bis beide Erreger Toleranz gegenüber massivem Kupfer entwickelt hatten. Die entstandenen Mutanten wurden *E. coli* mCu60 und MRSA mCu60 genannt. Um diese Toleranz ebenfalls im *Contact Killing* Assay nachzuweisen, wurden die mCu60 Mutanten für 60 Minuten auf Kupfer inkubiert und die KBE ausgezählt (Abbildung 15). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Toleranz von *E. coli* gegenüber massivem Kupfer 60-fach gesteigert wurde, da die Mutanten nicht wie der Wildtyp nach 1 Minute (Abbildung 13 A) vollständig inaktiviert wurden, sondern mindestens 60 Minuten überlebten (Abbildung 15 A). Bei MRSA wurde die Toleranz gegenüber dem Wildtyp- Stamm um das 12-fache gesteigert. So wurde MRSA nach 5 Minuten (Abbildung 13 B) vollständig inaktiviert, der mutierte mCu60 Stamm jedoch überlebte selbst mindestens 60 Minuten (Abbildung 15 B) auf massivem Kupfer. Auch hier wurden als Kontrolle Edelstahl Plättchen verwendet. Hierbei gab es keinen Unterschied zwischen den Wildtyp Zellen (Abbildung 13) und denen der Mutanten (Abbildung 15) gab.

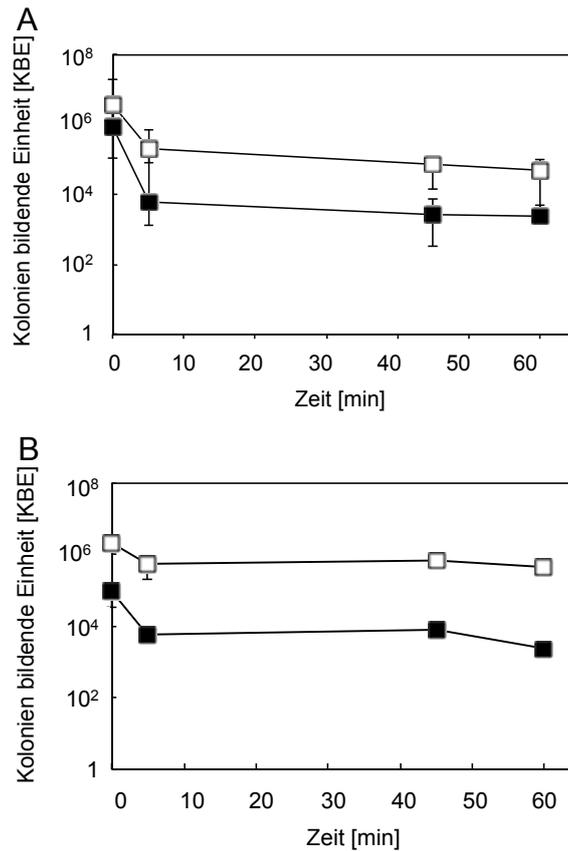


Abbildung 15: Die Kupfer-toleranten Bakterien überleben das *Contact Killing* auf massivem Kupfer.

E. coli mCu60 (A) und MRSA mCu60 (B) wurden auf Kupfer (schwarze Symbole) oder Edelstahl (offene Symbole) Plättchen für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert, von den Oberflächen abgenommen, auf feste Nährmedien überführt und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach der Inkubation wurden die überlebenden Kolonien als KBE gezählt.

3.2.4 Kupfer-Toleranz ist ein stabiler Phänotyp

Wurde das *Contact Killing* auf der Kontrolloberfläche Edelstahl durchgeführt, so konnte in den ersten Minuten der Inkubation meist eine kleine Reduktion um 1 bis 2 log₁₀-Stufen in den KBE festgestellt werden (Abbildung 15). Diese minimale Reduktion der Zellzahl ist nicht auf den Einfluss des *Contact Killing* selbst zurückzuführen, sondern auf den Stress durch das experimentelle Prozedere. Dieser Stress wurde durch die massive und schnelle antimikrobielle Wirkung der Kupferoberflächen maskiert.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Vergleicht man die Inaktivierung der mCu60 Mutanten durch die Inkubation auf Kupfer- oder Edelstahlflächen, so erkennt man, dass innerhalb der ersten Sekunden eine Kupfer-unabhängige Inaktivierung stattfindet, da sowohl die Wildtyp-Zellen als auch die evolvierten Mutanten durch Edelstahl um 1-2 \log_{10} -Stufen reduziert wurden (Abbildung 15). Jedoch wurde die Mutante ebenfalls um 2 \log_{10} -Stufen auf massivem Kupfer reduziert. Dies führte zu der Annahme, dass sich innerhalb der evolutionären Veränderungen 2 Subpopulationen entwickelt haben könnten: eine hoch tolerante und eine sensitive Population. Um herausfinden zu können, ob sich solche Subpopulationen entwickelt haben oder ob der Phänotyp instabil ist, wurden die Zellen ohne den Druck des *Contact Killing* inkubiert, so dass die Fraktion der Kupfer-sensitiven Zellen mit jeder verstrichenen Generation zunehmen sollte. Sollte die Toleranz gegenüber massivem Kupfer nicht stabil sein, so könnte das im *Contact Killing* Experiment durch eine stärkere Inaktivierung gezeigt werden.

Um dies zu testen, wurden die Wildtypen als auch die mCu60 Mutanten bei -80°C eingefroren und wieder in Kultur gebracht. Diese Zellen wurden im *Contact Killing* mit den nicht-eingefrorenen Zellen verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Um die putativen Subpopulation weiter zu separieren, wurden die Wildtypen als auch die mCu60 Mutanten für 21 Tage ohne Kupfer-Stress täglich passagiert (ca. 250 Generationen ohne Kupfer-Stress). Die letzte Passage wurde für beide Erreger und beide Phänotypen im *Contact Killing* Experiment untersucht. Die Ergebnisse waren ähnlich zu den nicht passagierten Mutanten wie auch zu Wildtyp-Zellen (Abbildung 16). Damit wurde nachgewiesen, dass die Toleranz gegenüber massivem Kupfer, stabil weitervererbt wurde, was sich auf genetischen Veränderungen in den Zellen zurückführen lassen sollte.

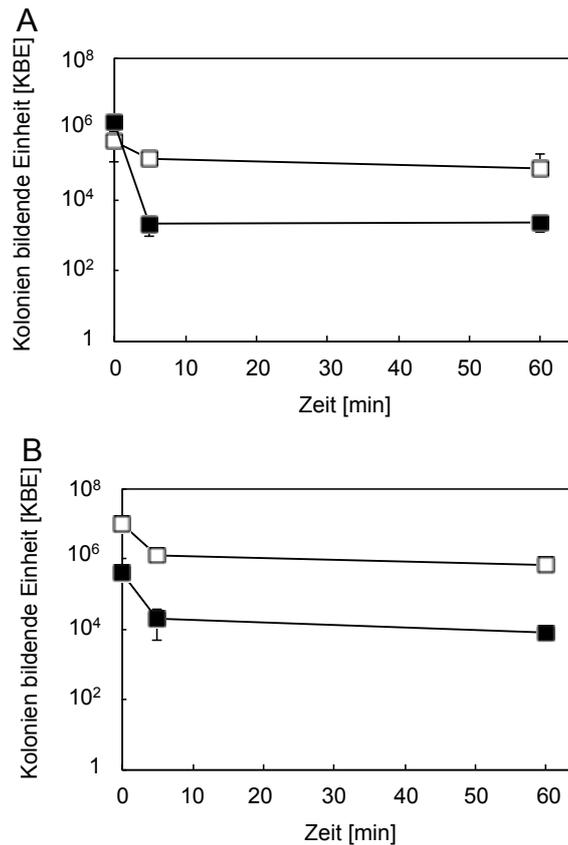


Abbildung 16: Der evolvierte Kupfer-tolerante Phänotyp ist stabil.

Um nachzuweisen ob die Toleranz gegenüber dem *Contact Killings* stabil ist, wurden die Mutanten bei -80°C eingefroren, aufgetaut und für 3 Wochen, ohne Stress oder anderen Selektionsdruck, täglich neu passagiert. Anschließend wurde die letzte Passage der *E. coli* Stämme (A) sowie der MRSA Stämme (B) dem *Contact Killing* durch massives Kupfer (schwarze Symbole) oder Edelstahl (offene Symbole) ausgesetzt.

3.2.5 Analyse der Wachstumskinetiken zwischen den Phänotypen

Um die Fitness der Mutanten im Vergleich zu den parentalen Zellen zu charakterisieren, wurden zeitabhängige Wachstumsversuche zum Vergleich der Wachstumsparameter durchgeführt. Für beide Spezies, *E. coli* und MRSA, wurden Wachstumsparameter wie lag-Phase, Verdopplungszeit und die finalen Zellzahlen in der stationären Phase bestimmt. Die Ergebnisse zwischen *E. coli* und *E. coli* mCu60 bzw. MRSA und MRSA mCu60 waren sehr ähnlich (Abbildung 17). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass der stabile

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Kupfer-tolerante Phänotyp keinerlei Einfluss auf die Wachstumskinetik der evolvierten mCu60 Mutanten hatte.

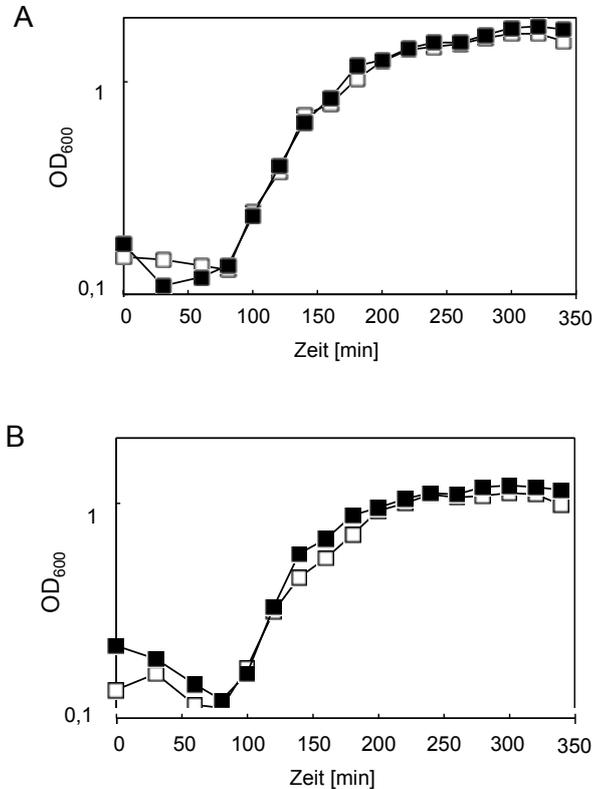


Abbildung 17: mCu60 Mutanten unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Wachstumskinetiken von ihren Wildtyp-Eltern.

mCu60 Mutanten- (schwarze Symbole) und Wildtyp-Zellen (offene Symbole) von *E. coli* (A) und MRSA (B) wurden in LB-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase bebrütet, anschließend 1:100 in frischem Medium verdünnt und bis zum Erreichen der stationären Phase erneut bebrütet. Alle 20 Minuten wurden eine Probe entnommen und die optische Dichte (OD₆₀₀) gemessen.

3.2.6 Massenspektrometrische Analysen

3.2.6.1 MALDI-TOF MS Analysen

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) mit Flugzeitanalysator (TOF) Massenspektrometrie (MS) wird zunehmend in der Diagnostik zur Analyse und Identifikation von Mikroben genutzt [Caprioli *et al.*

1997; Patel 2015]. Innerhalb von 10 Jahren ist die Anwendung dieser Methode immer vielfältiger geworden. So können heutzutage dünne bakterielle Schichten, ganze Gewebeabschnitte, Pflanzenmaterial und sogar Polymere untersucht werden. Bei dieser Methode werden die Proteine und Peptide des zu untersuchenden Organismus ionisiert und abhängig vom Masse/Ladungs-Verhältnis (m/c) aufgetrennt. Das Vorhandensein der zu untersuchenden Moleküle ist abhängig von den Wachstumsbedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Kupfer bzw. die Toleranz gegenüber massivem Kupfer zu Unterschieden in den Proteinspektren der verschiedenen Stämme führt. Für *E. coli* und seiner Mutante (Abbildung 18), sowie für MRSA und seine Mutante (Abbildung 19) wurden alle Protein-Muster mehrfach zwischen 2.000 bis 20.000 m/c bestimmt und analysiert. Dabei wurde je eine Messung exemplarisch dargestellt.

Die massenspektrometrische Analyse von *E. coli* und seiner Mutante ergab einige kleine Unterschiede in den Spektralanalysen (Abbildung 18). So waren einige Stressproteine bei der Mutante leicht erhöht. Zu den stärker synthetisierten Proteinen zählten: EcnA, HupB und AriR. Diese Proteine gehören zur Stressantwort der Zelle. So wird EcnA als Antwort für toxische Substanzen gebildet [Bishop *et al.* 1998], AriR reguliert die Expression von Genen, welche in die Bildung von Biofilmen oder Säure-Resistenzen involviert ist [Johnson *et al.* 2005]. HupB stabilisiert die DNA zum Schutz vor Denaturierung oder extremen Umweltbedingungen [Hayashi *et al.* 2001].

Die massenspektrometrischen Analysen von MRSA sowie seiner Mutante ergaben keine spezifischen Unterschiede innerhalb der zu charakterisierenden Phänotypen (Abbildung 19). Selbst bei höheren Auflösungen der gemessenen Spektren konnten keine Kupfer-spezifischen Abweichungen gegenüber dem Wildtyp gemessen werden (Abbildung 19 B).

Somit können zwar die MALDI-TOF MS Analysen zur Differenzierung von Mikroben genutzt werden, jedoch nicht, um durch massives Kupfer bzw. durch Kupfer-Toleranz verursachte Veränderungen zu typisieren und charakterisieren.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

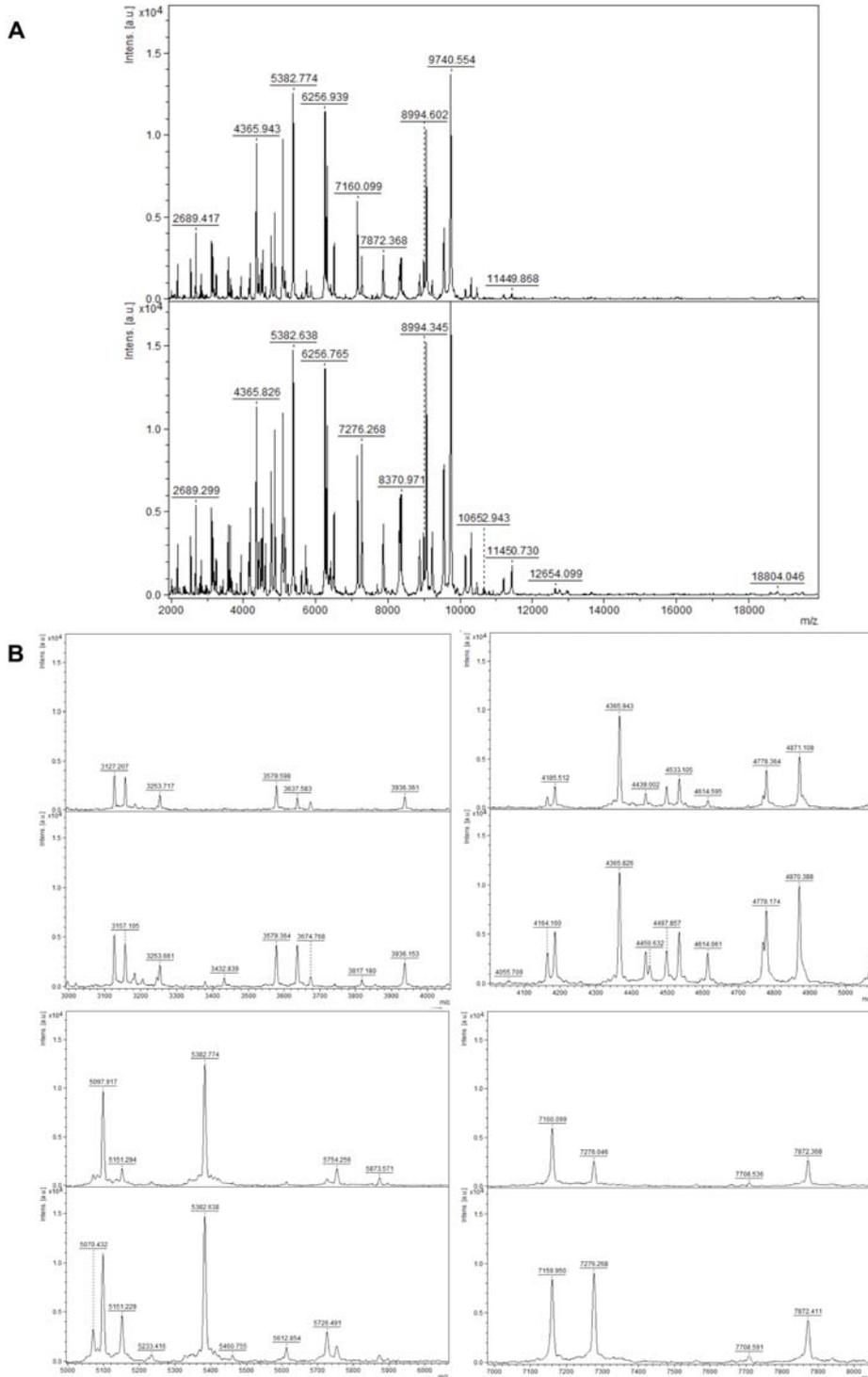


Abbildung 18: MALDI-TOF MS Analysen von *E. coli* Wildtyp und *mCu60* zeigen keinen Unterschied in den gemessenen Spektren.

Die zu untersuchenden Keime wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine 1 µL Impose wurde abgenommen und mittels hochreinem EtOH gereinigt, in Ameisensäure resuspendiert und mittels Acetonitril homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit der Matrix versetzt und mittels MALDI-TOF MS gemessen. A zeigt die gesamte Spektralanalyse, während in B einzelne Bereiche vergrößert dargestellt sind. Die oberen Spektren sind immer Wildtypspektren während die unteren Spektren die *mCu60* Mutantenspektren sind.

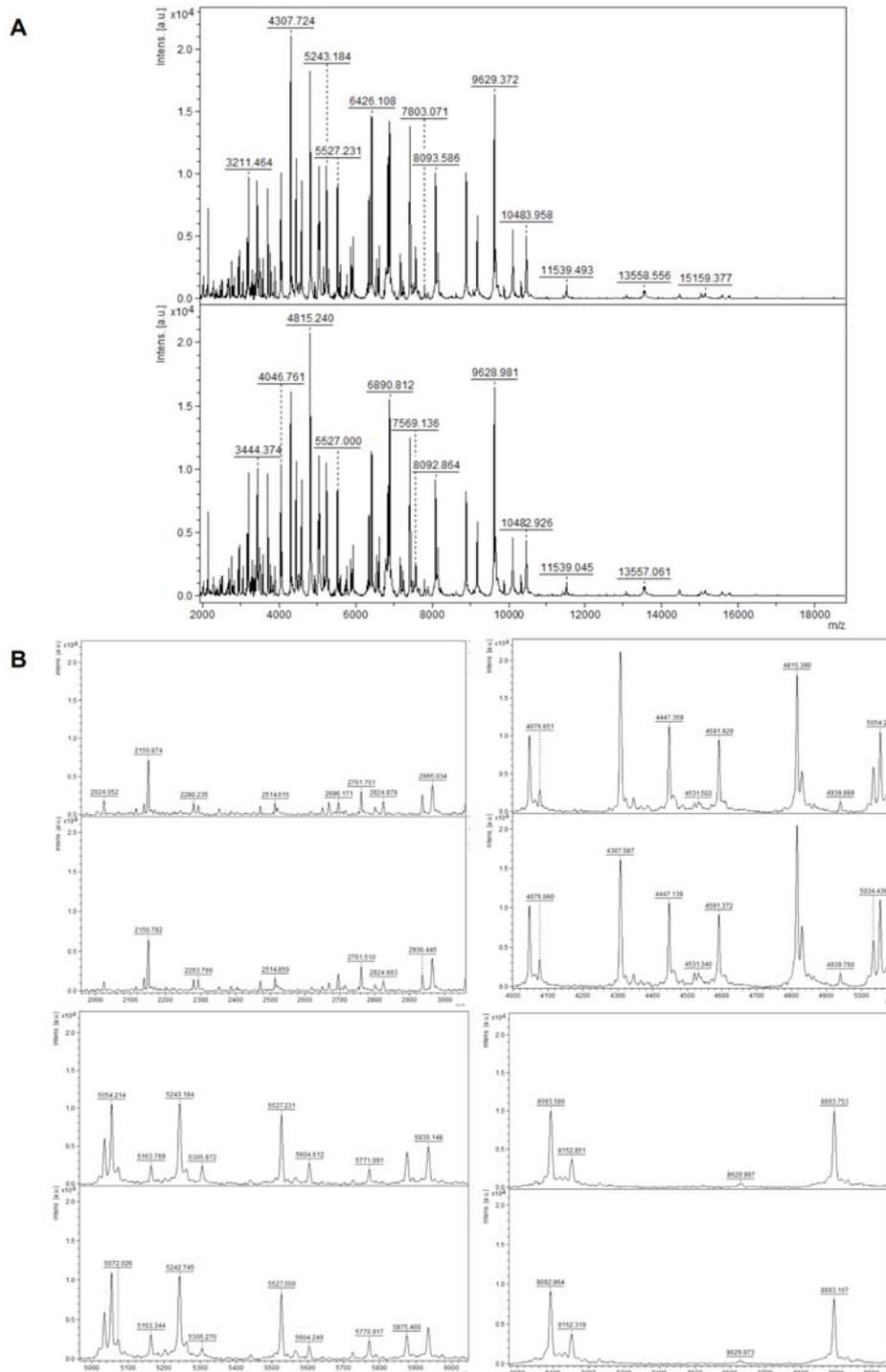


Abbildung 19 : MALDI-TOF MS Analysen von MRSA Wildtyp und *mCu60* zeigen keinen Unterschied in den gemessenen Spektren.

Die zu untersuchenden Keime wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine 1 µL Impöse wurde abgenommen und mittels hochreinem EtOH gereinigt, in Ameisensäure resuspendiert und mittels Acetonitril homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit der Matrix versetzt und mittels MALDI-TOF MS gemessen. A zeigt die gesamte Spektralanalyse, während in B einzelne Bereiche vergrößert dargestellt sind. Die oberen Spektren sind immer Wildtypspektren während die unteren Spektren die *mCu60* Mutantenspektren sind.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

3.2.6.2 Fettsäureanalysen

Frühere Studien zeigen, dass durch die Inkubation auf massivem Kupfer in *E. coli* die Oxidierung und damit die Schädigung der Membranphospholipide einhergeht [Hong *et al.* 2012]. Diese Schädigung führt in *E. coli* zum Verlust der Membranintegrität und zum Zelltod. Durch die LIVE/DEAD Analysen der mCu60 Mutanten wurde nachgewiesen, dass die Zellmembran selbst nach langer Kupfer-Inkubation noch intakt ist (Abbildung 22). Daraus konnte geschlossen werden, dass die adaptierten Mutanten dem Einfluss des Kupfers auf die Membran standhalten.

Die Fettsäure-Methyl-Ester (fatty-acid-methyl-ester, FAME) Analysen sollen mögliche Unterschiede in den Membran-Fettsäuren (FS) zwischen den Wildtyp-Bakterien und den Mutanten nachweisen. *E. coli* mCu60 zeigte einen signifikant erhöhten Anteil an den FS 13:0, 15:0, 17:0 und einen geringeren Anteil an den FS 19:0 cyclo w8c und 17:0 cyclo w7c (Abbildung 20, A). Diese Unterschiede innerhalb der prozentualen Verteilung der FS deuteten auf einen Abfall der reaktiveren, langkettigen Cyclopropan FS und die Präferenz für gesättigte, kurzkettige FS.

In der MRSA mCu60 Mutante waren die kürzeren FS a15:0, a17:0 und i16:0 statistisch häufiger vertreten. Während die langkettigen FS 18:0 (linear) und a19:0 seltener auftraten (Abbildung 20, B). Der Anteil an FS mit weniger als 18 C-Atomen war bei MRSA mCu60 um 2,17 % höher als beim Wildtyp. Die Menge an verzweigten gesättigten FS war in beiden Stämmen ähnlich (Iso FS mCu60 18,85 % wt 15,53 %, ante-iso mC60 78,17 % und wt 77,27 %).

Die Menge an ungesättigten FS war in den Mutanten (-3,08 %) geringer als in den Wildtyp-Bakterien, was möglicherweise die höhere Toleranz gegenüber Kupfer verursacht. Die durch Kupfer ausgelöste Lipid-Peroxidation greift zumeist ungesättigte FS an. Durch die Veränderungen in den FS-Zusammensetzungen könnten die Mutanten daher toleranter gegenüber diesen Vorgängen sein. Ungesättigte FS sind Vorstufen für Cyclopropan FS. Diese FS sind reaktiver, da diese chemisch instabil und somit anfälliger für Peroxidation sind. Folglich kann möglicherweise die Peroxidation durch das Fehlen dieser FS reduziert werden.

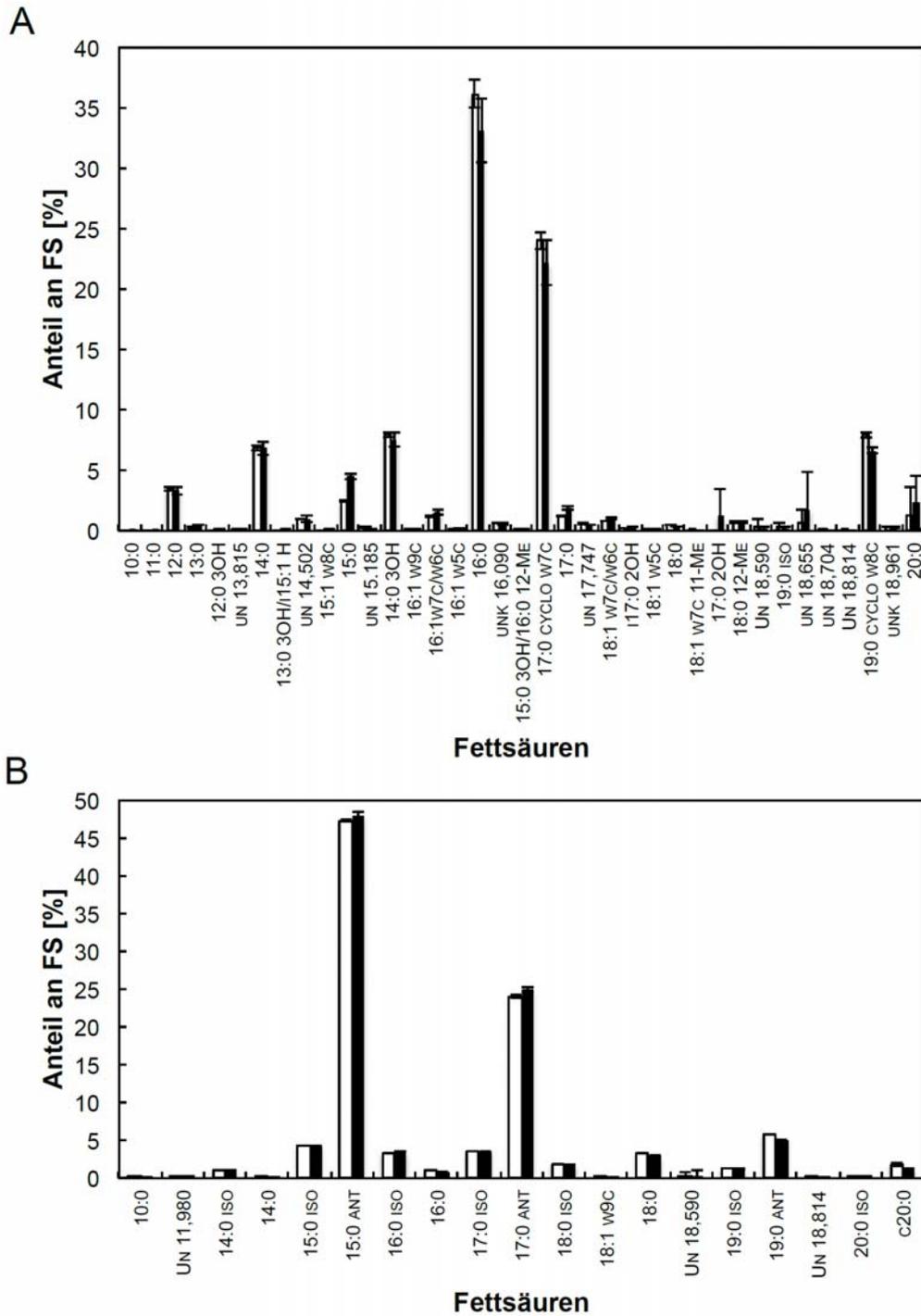


Abbildung 20: Fettsäuremuster der evolvierten Mutanten und der Wildtyp-Zellen.

E. coli (A) Wildtyp (weiße Säulen) und Mutante (schwarze Säulen), sowie MRSA (B) Wildtyp und Mutante wurden mittels Gaschromatographen gemessen und bestimmt. Die Nomenklatur ergibt sich wie folgt: X (Anzahl der Kohlenstoffe) : Y (Anzahl der Doppelbindungen) Z (Position der ersten Doppelbindung). i steht für iso- bzw. a für ante-iso-Verzweigung. 10Me steht für die Position der Methyl-Verzweigung, beginnend am Carboxyl-Ende. cy steht für das Auftreten eines Cyclopropan-Ringes. c oder t stehen für die cis-bzw. trans-Konfiguration. Die Nummer vor OH steht für die Position der Hydroxyl-Gruppe relativ zum Carboxyl-Ende.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

3.2.6.3 ICP-MS Analysen der *E. coli* Mutante und des Wildtyps

Es wurde gezeigt, dass Bakterien wie *E. coli* und *S. haemolyticus* innerhalb kürzester Zeit nach trockener Kupfer-Exposition massiv Kupfer in die Zelle aufnehmen [Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b]. Werden die Erreger mittels nasser Methode inkubiert, ist die Akkumulation von Kupfer in der Zelle weitaus geringer [Espirito Santo *et al.* 2011]. Möglicherweise ist in der mCu60 Mutante die Metall-, insbesondere die Kupfer-Aufnahme verändert. Um diese Frage zu klären, wurde die Aufnahme verschiedener Metall-Ionen, insbesondere von Kupfer, in den Kupfer-toleranten Erregern beispielhaft mit *E. coli* und *E. coli* mCu60 charakterisiert (die erzielten Ergebnisse zu Magnesium, Eisen, Mangan und Zink sind im Anhang aufgezeigt). Dafür wurden beide Stämme mittels der trockenen Methode vorbehandelt und die ICP-MS Analysen direkt im Anschluss durchgeführt.

Die Toleranz der mCu60 Mutanten gegen massives Kupfer lies darauf schließen, dass die Aufnahme von Kupfer in die Zellen verändert sein könnte. Daher wurden die ICP-MS Analysen durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Zellen auf Edelstahl inkubiert, der Anteil an Kupfer innerhalb der Zelle blieb hier über die Zeit beim Wildtyp als auch bei der Mutante konstant. Die Menge an Kupfer betrug im Wildtyp $9,1 \pm 3,3 \times 10^3$ Kupfer-Atome / Zelle und bei der Mutante $6,8 \pm 1,9 \times 10^3$ Kupfer-Atome / Zelle, somit wurde eine ähnliche Konzentration von $6,5 \pm 1,6 \mu\text{M}$ Kupfer in der Zelle erreicht. Diese Angaben blieben trotz unterschiedlicher Inkubationszeiten konstant (Abbildung 21 A). Im Gegensatz war die Akkumulation von Kupfer im Wildtyp und Mutante nach Kupfer-Exposition sehr hoch. So wurden $5,4 \pm 1,3 \times 10^6$ Kupfer-Atome / Zelle (intrazelluläre Konzentration $4,5 \pm 0,5 \text{ mM}$ Kupfer) innerhalb der ersten 30 Sekunden aufgenommen (Abbildung 21 A, erster Zeitpunkt). Nach 5 Minuten erhöhte sich die Menge auf $1,0 \pm 0,1 \times 10^7$ Kupfer-Atome / Zelle. Danach wurde der Wildtyp bereits vollständig durch metallisches Kupfer inaktiviert (Abbildung 13 A). Dennoch stieg die Menge an Kupfer in den Wildtyp-Zellen innerhalb der ersten 15 Minuten auf $5,1 \pm 0,4 \times 10^7$ Kupfer-Atome / Zelle an, was ein 10.000-fach höherer Wert war, als bei Zellen ohne Kupfer-Kontakt (Abbildung 21 A). Vermutlich kam es zu einer Schädigung der Permeabilitäts-Barrieren, wodurch Kupfer bis zur maximalen Binde-Kapazität einströmen

konnte. Nach dem Erreichen dieses Maximums fiel die Kupfer-Konzentration in den Wildtyp-Zellen rapide ab. Die Konzentration erreichte einen ähnlichen Wert wie bei den Mutanten, jedoch waren die Mutanten zu diesem Zeitpunkt noch lebensfähig (Abbildung 15 A). Die Menge an Kupfer in den Mutanten stieg innerhalb der ersten 5 Minuten auf $1,0 \pm 0,4 \times 10^7$ Kupfer-Atome / Zelle und erreichte nach 60 Minuten Inkubation auf metallischem Kupfer einen Wert von $5,3 \pm 2,9 \times 10^6$ Kupfer-Atomen / Zelle. Somit konnte gezeigt werden, dass die evolvierten Kupfer-toleranten Bakterien physiologische Adaptionen entwickelt haben, die zur einer verminderten Kupferaufnahme bei Kupfer-Stress führen.

Weiter sollte untersucht werden, ob Kupfer vorwiegend in der löslichen zytoplasmatischen Fraktion der Zellen oder in der Membran akkumuliert. In unbehandelten Zellen wurden beim Wildtyp wie auch bei der Mutante in der löslichen Fraktion $5 \pm 1,5$ Kupfer-Atome / mg Protein nachgewiesen (Abbildung 21 B). Während der Expositionen auf massivem Kupfer erhöhte sich die Konzentration beider Stämme auf 3277 ± 462 Kupfer-Atome / mg Protein und sank bei beiden Stämmen bis zur Inkubationszeit von 60 Minuten leicht ab. Im Gegensatz zur löslichen, zytoplasmatischen Fraktion unterschieden sich die Menge an gebundenen Kupfer-Atomen in der Membran-Fraktion stark innerhalb der Phänotypen. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante wiesen zu Beginn $10,5 \pm 0,7$ Kupfer-Atome / mg Protein auf (Abbildung 21 C). Die Wildtyp-Zellen wiesen nach 15 Minuten einen maximalen Wert von 5038 ± 1055 Kupfer-Atome / mg Protein auf und erreichten damit eine Erhöhung um das 150-fache im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen und eine 2,5-fache Steigerung im Vergleich zu den Mutantenzellen (5038 zu 2000 Kupfer-Atome / mg Protein) nach 15 Minuten Inkubation auf Kupfer. Die Menge an Kupfer in der Membran-Fraktion erreichte in den Wildtyp-Zellen (3534 ± 800 Kupfer-Atome / mg Protein) als auch den mCu60 Zellen (3458 ± 1756 Kupfer-Atome / mg Protein) ähnliche Werte.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl der Wildtyp als auch die mCu60 Mutante große Mengen an Kupfer als Antwort auf den massiven Kupferstress akkumulieren. Da beide Phänotypen innerhalb der ersten 10 Minuten in ähnlicher Weise Kupfer aufnehmen, die Mutante aber mindestens

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

60 Minuten auf Kupfer überlebt, kann diese Aufnahme nicht der Grund für die Abtötung der Erreger durch Kupfer sein.

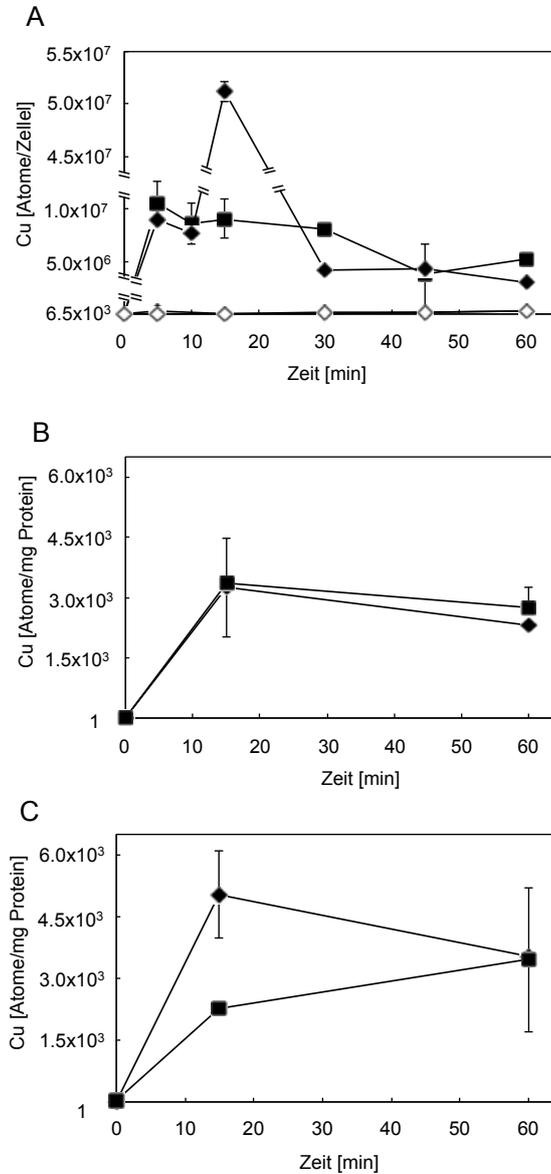


Abbildung 21: ICP-MS Analysen zur Bestimmung der Kupfer Konzentration in verschiedenen Zellkompartimenten in Wildtyp- und Mutanten-Zellen.

Kupfer-tolerante *E. coli* mCu60 (Quadrat), sowie der Wildtyp-Stamm (Diamant) wurden für unterschiedliche Zeitpunkte auf massiven Kupfer- (schwarz) oder Edelstahl- (offene) Oberflächen inkubiert, abgenommen und gewaschen, um lose-gebundenes Kupfer zu entfernen. Der Kupfer-Gehalt (A) der Zellen wurde von mineralisierten Proben durch ICP-MS in Kupfer-Atomen/Zelle gemessen. Um den Kupfer-Anteil in den Zellfraktionen zu messen, wurden die Zellen durch Ultraschall lysiert, Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt und die Bestandteile der löslichen, zytoplasmatischen Fraktion (B) von der Membranfraktion (C) getrennt. Nachdem die Proben mittels ICP-MS gemessen wurden, konnten die Kupfer Atome / mg Protein bestimmt werden.

3.2.7 Bestimmung der Zellintegrität der Wildtyp- als auch Mutanten-Zellen

Kupferflächen-sensitive Bakterien wie *E. coli* [Espirito Santo *et al.* 2008] oder *Y. pestis* EV76 wurden nach einer Inkubationszeit von mindestens 15 Minuten auf Kupferoberflächen vollständig lysiert (Abbildung 12 A). Ebenso konnte durch die vorangegangenen ICP-MS Analysen nachgewiesen werden, dass der Kupfergehalt mit der verlängerten Inkubationszeit in Wildtyp-Zellen zunächst stark ansteigt und anschließend auf ein nicht mehr nachweisbares Level zurückfällt (Abbildung 21). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass der Kupferverlust auf strukturelle Schädigungen durch Kupfer zurückzuführen sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden sowohl die Wildtyp-Zellen als auch die mCu60 Mutanten von *E. coli* und MRSA für bis zu 60 Minuten auf massiven Kupferoberflächen und Stahlplättchen als Kontrolle inkubiert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen und mittels LIVE/DEAD Färbung die zelluläre Integrität überprüft.

Wurden die Bakterien auf Edelstahl bis zu 60 Minuten inkubiert, fluoreszierten der größte Anteil an Zellen grün und nur wenige Zellen rot. Somit konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der Zellen eine intakte Zellmembran (grün) und nur wenige eine geschädigte Membran (rot = geschädigte oder tote Zellen) aufwiesen. Die wenigen geschädigten Zellen können durch den allgemeinen Stress des Experiments, wie z.B. durch das Ausstreichen oder durch die lange Austrocknungsphase auf den Oberflächen, erklärt werden (Abbildung 22 und Abbildung 23, 1. und 2. Reihe). Im Gegensatz dazu wurden *E. coli* und MRSA Wildtyp-Zellen nach 1 bzw. 5 Minuten auf Kupferflächen vollständig inaktiviert (Abbildung 13) und die Membran so geschädigt, dass sie rot fluoreszierten (Daten nicht gezeigt). Jedoch wurde die zelluläre Struktur selbst nach 15 Minuten Inkubation auf massivem Kupfer aufrecht erhalten (Abbildung 22, 3. Reihe 2. Spalte). Diese Ergebnisse stimmen mit den ICP-MS Analysen, bei denen zu diesem Zeitpunkt die maximale Kupfer Anreicherung innerhalb der Membranfraktion in *E. coli* mCu60 Zellen nachgewiesen werden konnte überein (Abbildung 21 C). Längere Inkubationszeiten der Wildtyp-Zellen führten zu massiven zellulären

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Zerstörungen, so konnten nach 30 bzw. 60 Minuten lediglich Zelltrümmer nachgewiesen werden (Abbildung 22 und Abbildung 23, 3. Reihe von Oben). Die zelluläre Struktur der evolvierten mCu60 Mutanten beider Spezies hingegen blieb nach einer Inkubationszeit von bis zu 60 Minuten intakt (Abbildung 22, Abbildung 23, letzte Reihe).

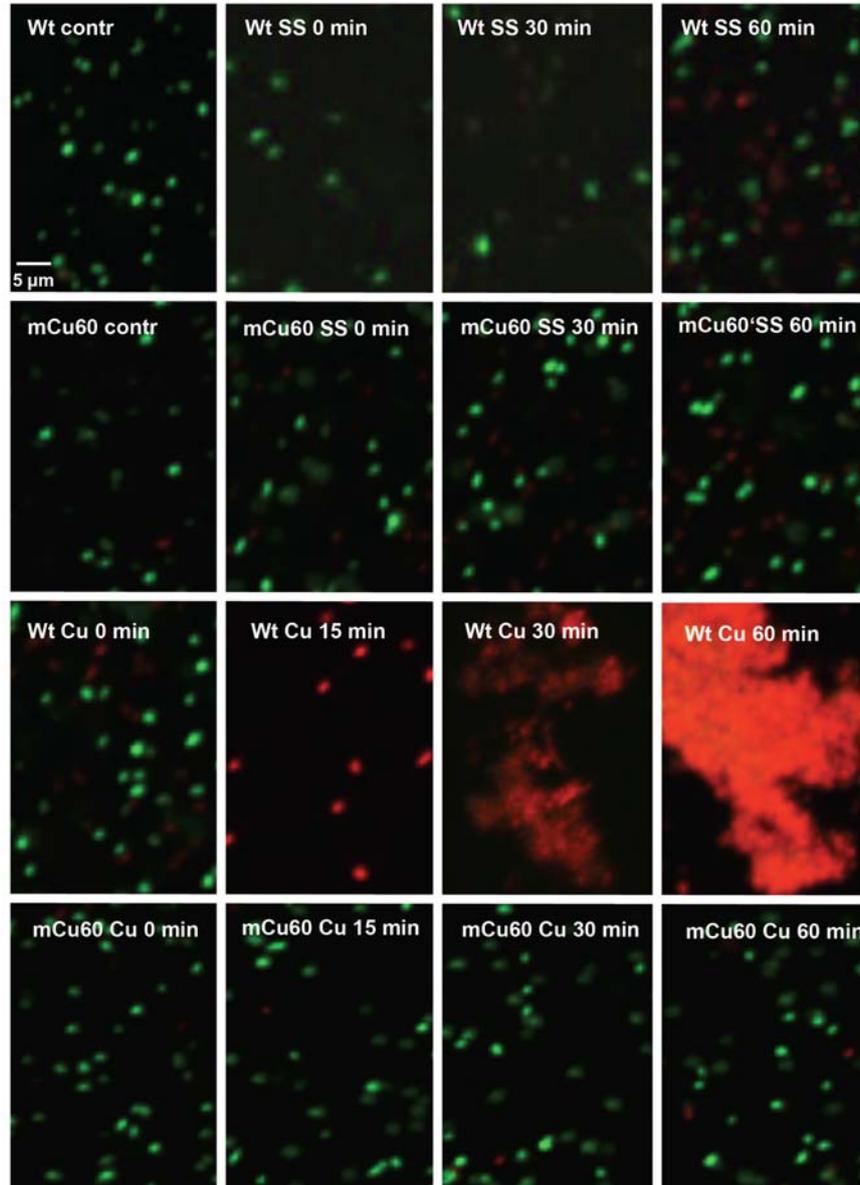


Abbildung 22: Kupfer-tolerante *E. coli* erhalten ihre Membranintegrität selbst nach langer Inkubation auf Kupferflächen.

Die Bakterien wurden massiven Kupfer- oder Edelstahloberflächen für unterschiedlich lange Zeitpunkte ausgesetzt, abgenommen, gewaschen und mittels LIVE/DEAD gefärbt. Zellen mit Membranschäden fluoreszieren rot, intakte Zellen grün. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Mutante (mCu60) und des Wildyps (Wt) von *E. coli*. Die unterschiedlichen Zelldichten sind auf Verluste durch die notwendigen Wachschritte zurückzuführen.

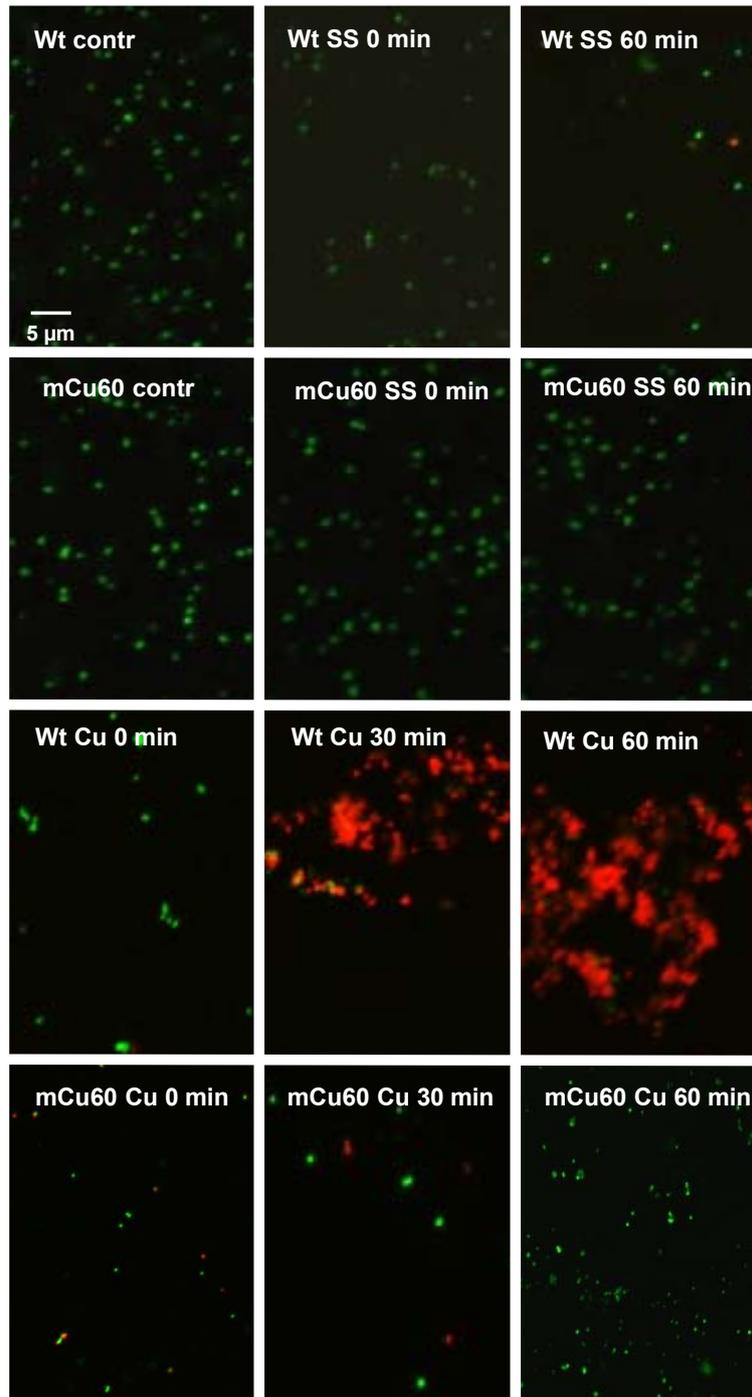


Abbildung 23: Kupfer-toleranten MRSA erhalten ihre Membranintegrität selbst nach langer Inkubation auf Kupferflächen.

Die Bakterien wurden massiven Kupfer- oder Edelstahloberflächen für unterschiedlich lange Zeitpunkte ausgesetzt, abgenommen, gewaschen und mittels LIVE/DEAD gefärbt. Zellen mit Membranschäden fluoreszieren rot, intakte Zellen grün. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Mutante (mCu60) und des Wildyps (Wt) von MRSA. Die unterschiedlichen Zelldichten sind auf Verluste durch die notwendigen Wachschrte zurückzuführen.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Obwohl die Menge des aufgenommenen Kupfers innerhalb der ersten 10 Minuten bei den evolvierten mCu60 Mutanten und den Wildtypen ähnlich war, wiesen die mCu60 Mutanten keinen Verlust der zellulären Struktur über 60 Minuten auf. Folglich ist die massive intrazelluläre Akkumulation von Kupfer nicht der Grund für das *Contact Killing*. Die verminderte Bindung von Kupfer an der Membran bzw. an Membran-bindenden Proteinen in den mCu60 Mutanten (Abbildung 21 C) führt somit zum Schutz der Membran und zum Erhalt der Zellintegrität.

3.2.8 Kupfer-Toleranz und Kupferionen-Empfindlichkeit

In den bisherigen Studien konnten bereits lebende Bakterien auf verschiedenen Kupfermünzen nachgewiesen werden [de Carvalho *et al.* 2014; Espirito Santo *et al.* 2010; Kalita *et al.* 2013]. Einige der Erreger wiesen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber dem *Contact Killing* durch massive Kupferoberflächen auf, jedoch nicht gegenüber Kupferionen [Espirito Santo *et al.* 2010].

Deshalb sollte nun im Folgenden getestet werden, ob *E. coli* und MRSA, bei denen eine erhöhte Toleranz gegenüber Kupfer bzw. dem *Contact Killing* entwickelt wurde, keine Resistenz bzw. Toleranz gegenüber Kupferionenstress entwickelt haben. Dazu wurden die evolvierten mCu60 Mutanten von *E. coli* und MRSA sowie die elterlichen Wildtyp-Zellen in *Dose-response* Wachstumsexperimenten gegenüber CuSO_4 untersucht. Die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) gegenüber Kupferionen unterschied sich nicht zwischen den evolvierten *E. coli* mCu60 Mutanten und dem Wildtypen. Bei beiden wurde eine MHK von 3 mM CuSO_4 gemessen (Tabelle 13). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei beiden MRSA Phänotypen nachgewiesen, hier wurde jedoch eine MHK von 1 mM CuSO_4 für Wildtyp- und Mutanten-Zellen gemessen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Kupfer-tolerante Mutanten weisen keine Resistenz gegenüber ionischem Kupfer-Stress auf.

Stamm	MHK [mM CuSO ₄]
<i>E. coli</i> Wildtyp	3.0 ± 0
<i>E. coli</i> mCu60	3.0 ± 0
MRSA Wildtyp	1.0 ± 0
MRSA mCu60	1.0 ± 0

Logarithmisch wachsende Bakterienkulturen wurden auf LB Agar mit unterschiedlichen CuSO₄ Konzentrationen aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und 37°C wurde die MHK bestimmt.

Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass die Wirkungsweisen auf Zellen verursacht durch Kupferionen-Stress sich von denen verursacht durch metallisches Kupfer stark unterscheiden.

3.2.9 Kupfer-Toleranz und Antibiotika-Empfindlichkeit

Die Co-Selektion von Antibiotika- und Kupfer-Toleranz ist in der modernen Viehzucht ein häufig auftretendes Problem. Tiere, v.a. Schweine, werden mit Wachstums-Stimulations-Zusätzen wie (ionischen) Kupfer-Bestandteilen gefüttert. Dabei entwickeln z.B. Enterokokken im des Verdauungssystems dieser Tiere häufig Resistenzen gegenüber Kupferionen als auch schwächere Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenster Antibiotika [Aarestrup *et al.* 2002; Hasman *et al.* 2002; 2005]. In einer aktuellen Studie wurde eine Verbindung zwischen Kupferionen- und Antibiotika-Resistenz nachgewiesen [Agga *et al.* 2014]. Jedoch wurde nie untersucht, ob eine Verbindung zwischen der Toleranz gegenüber massivem Kupfer und Antibiotikaresistenz besteht. Diese mögliche Wechselwirkung der Kupfer-Toleranz wurde mit einer Reihe verschiedener Antibiotika untersucht. Hierbei wurden die MHKs für *E. coli* und seine Mutante mit relevanten Antibiotika für Gram negative Erreger und für

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

MRSA und seine Mutante mit solchen für Gram positive Bakterien bestimmt (Tabelle 14).

Für *E. coli* wurden 12 verschiedene Antibiotika untersucht, dabei wurde kein relevanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt. Es wurde lediglich ein leicht niedriger Wert innerhalb der Mutante gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure nachgewiesen. Jedoch liegt dieser Wert innerhalb der tolerierbaren Schwankungen (Tabelle 14 A).

Für MRSA wurden ebenfalls 12 verschiedene Antibiotika untersucht. Auch hier wurden lediglich medizinisch nicht-relevante Abweichungen nachgewiesen. So ist die mCu60 Mutante gegenüber seinem Wildtypen eine Konzentrationsstufe sensitiver für Imipenem, aber eine Konzentrationsstufe resistenter gegenüber Doxycyclin und Linezolid. Der größte Unterschied wurde bei der Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol nachgewiesen. Hierbei wurde ein vierfach höherer Wert bei der Mutante nachgewiesen (Tabelle 14 B). Um dieses Ergebnisse zu bestätigen, wurde zusätzlich ein Agar-Diffusionstest durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden hierdurch bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol ist zwar erniedrigt, jedoch ist diese Erhöhung klinisch nicht relevant, da der kritische Wert, der Resistenz definiert wurde, für die MHK für Chloramphenicol bei Gram positiven Erreger nicht durchbrochen wird (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>).

Tabelle 14: Die Kupfer-toleranten Mutanten weisen eine leicht veränderte Antibiotika-Empfindlichkeit auf.

A			B		
AB	E. coli		AB	MRSA	
	Wildtyp	mCu60		Wildtyp	mCu60
AMC	4/2	2/1	PEN	>2	>2
CAZ	<0,5	<0,5	VAN	<0,5	<0,5
IMP	<0,25	<0,25	CLI	>8	>8
RAM	8	8	IMP	2	1
CMP	4	4	CIP	0,5	0,5
T/S	<0,25 /4,75	<0,25 /4,75	LEV	0,25	0,25
STR	4	4	GEN	<0,25	<0,25
GEN	<0,25	<0,25	TGC	0,25	0,25
DOX	2	2	DOX	0,125	0,25
TGC	0,25	0,25	RAM	<0,063	<0,063
CIP	<0,031	<0,031	CMP	2	8
LEV	<0,063	<0,063	LIZ	1	2

Die MHKs gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika für Gram-negative (A) und Gram-positive (B) Erreger wurde mittels Mikro-Dilutionstest (in µg / mL) nachgewiesen. Dargestellt sind die Ergebnisse von je 3 unabhängigen Experimenten mit gleichen Resultaten. Die Antibiotika für *E. coli* (A) waren: Amoxicillin-Clavulansäure (AMC), Ceftazidim (CAZ), Imipenem (IMP), Rifampin (RIF), Chloramphenicol (CMP), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (T/S), Streptomycin (STR), Gentamicin (GEN), Doxycycline (DOX), Tigecycline (TGC), Ciprofloxacin (CIP) und Levofloxacin (LEV). Für MRSA (B) wurden folgende Antibiotika untersucht: Penicillin (PEN), Vancomycin (VAN), Clindamycin (CLI), Imipenem (IMP), Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LEV), Gentamicin (GEN), Tigecycline (TGC), Doxycyclin (DOX), Rifampin (RAM), Chloramphenicol (CMP) und Linezolid (LIZ).

3.2.10 Ganzgenomsequenzierung der mCu60 Mutanten

Mittels ICP-MS konnte eine veränderte Kupferionenaufnahme zwischen dem *E. coli* Wildtypen und der mCu60 Mutante nachgewiesen werden (3.2.6.3). Ebenso konnte mittels LIVE/DEAD Färbung gezeigt werden, dass die Kupfer-toleranten Mutanten *E. coli* mCu60 und MRSA mCu60 eine veränderte Zellmembranstruktur haben und selbst verlängerte Inkubation auf massivem Kupfer zu keiner Zerstörung der Membran führt (3.2.7).

Um mögliche Mutationen im Genom nachweisen zu können, die spezifisch für eine Kupfer-Resistenz sein könnten, wurden *E. coli* W3310 sowie seine mCu60 Mutante, als auch MRSA N315 und seine mCu60 Mutante mittels Illumina MiSeq sequenziert. Die sequenzierten *E. coli* Genome wurden mit dem Referenzgenom *E. coli* W3110 (NC_007779.1) und die MRSA Genome mit MRSA N315 (NC_002745.2) mittels des Alignment Programms SARUMAN verglichen [Blom *et al.* 2011]. Insgesamt wurden für *E. coli* 468680, für *E. coli* mCu60 5252652, für MRSA 4749404 und für MRSA mCu60 4825760 Einzel-Sequenzierungen (*reads*) erhalten. Dabei konnte eine genomische Abdeckung von 99,68% bis 100,00% erreicht werden. Alle vier Genome wurden mit einer Sequenziertiefe von 202 bis 310 sequenziert.

3.2.10.1 Vergleichende genomische Analysen von *E. coli* Wildtyp und mCu60

Im Genom der *E. coli* mCu60 Mutante wurden 57 SNPS, 3 Deletionen und 7 Insertionen im Vergleich zum Referenzgenom (*E. coli* W3110: NC_007779.1) nachgewiesen. Evolutionsbedingt durchlaufen Erreger eine ständige genomische Veränderung, die sich in SNPS, Insertionen oder Deletionen manifestieren kann [Fong *et al.* 2005]. Da beide Genotypen eine Vielzahl von gleichen genetischen Veränderungen aufwiesen, kann hierbei eine parallele, adaptive Evolution, die durch gleiche Kulturbedingungen begünstigt wird, angenommen werden. Folglich waren für die Kupfer-bedingte Veränderung im *E. coli* mCu60 Genom nur diejenigen genetischen Merkmale von Relevanz, die

sich nicht nur zum Referenzgenom unterschieden, sondern auch zum Ursprungsstamm *E. coli* W3110.

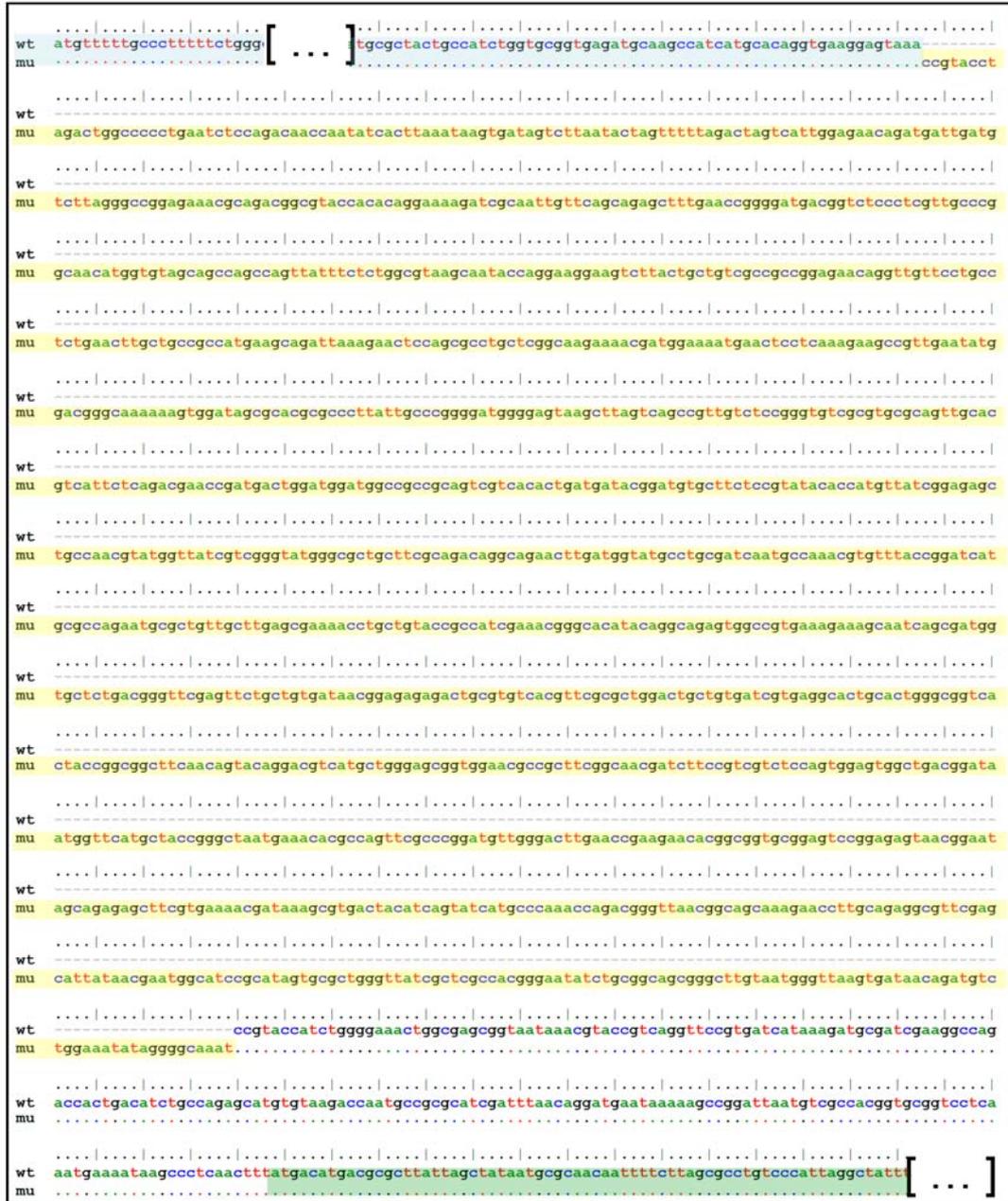


Abbildung 24: Sequenzanalyse des IS2- Transposons und seine Lokalisation im *E. coli* Wildtyp- und mCu60-Genom.

Dargestellt ist die Lokalisation des IS2-Elementes (gelb), *ycbX* (blau) und *ycbX* (grün) innerhalb des Wildtyp-Genoms (wt) und der mCu60 Mutante (mu). Nicht farblich markiert ist der nicht-kodierende Bereich. Beide Genome wurden mittels MiSeq sequenziert, analysiert und *de novo* assembliert.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Lediglich 4 SNPs wurden im mCu60 Genom, nicht aber im parentalen Genom gefunden. Die detektierten SNPs sind allesamt stille Mutationen, jedoch konnten drei SNPs einem IS2-Element zugeordnet werden. Durch diese Häufung der Mutationen in einem bestimmten Bereich lag die Vermutung nahe, dass das betroffene IS2-Element durch Transposition gesprungen war. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden beide Genome (Wildtyp und Mutante) *de novo* assembliert.

Durch die Assemblierung konnte festgestellt werden, dass innerhalb des *ycbX* Gens (Y75_p0919) eine Insertion des IS2-Elements stattgefunden hat (Abbildung 24). IS2-Elemente kommen mit einer Kopienzahl von 0-12 im *E. coli* Genom vor. Das Einbauen dieser Elemente kann zu einer Aktivierung oder Unterdrückung von Genen führen, wie z. Bsp. zur Generierung von neuen Promotoren [Besemer *et al.* 1977; Saedler *et al.* 1973; Saedler *et al.* 1974]. Die Insertion dieses Elementes verursachte durch Transposition in das *ycbX* Gen den Funktionsverlust des Ycbx Proteins. Das *ycbX* Gen kodiert für ein 2Fe-2S-Cluster Protein unbekannter Funktion, jedoch wird es auch mit der Resistenz gegenüber toxischen Substanzen wie 6-N-Hydroxylaminopurine (HAPs) in Verbindung gebracht [Kozmin *et al.* 2008].

3.2.10.2 Die *ΔycbX* Mutante überlebt den *Contact Killing* nicht

Eine Vielzahl von Deletions- (*Knockout*)-Mutanten wurden für nicht-essentielle *E. coli* Gene charakterisiert und sind für Forschungszwecke aus einer Stammsammlung verfügbar [Baba *et al.* 2006]. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass *ycbX* Deletions-Mutanten gegen HAPs hypersensitiv sind [Kozmin *et al.* 2008]. Ob diese Sensitivität gegen Basen-Analoga wie HAP zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber massivem Kupfer führt, wurde mit Hilfe der entsprechenden *ycbX* Knockout Mutante (JW5126-1) und seinem Elternstamm (K12 #7636) im Hinblick auf das *Contact Killing* in dieser Arbeit untersucht. Dabei konnte allerdings keine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber massivem Kupfer nachgewiesen werden. Beide Stämme wurden innerhalb von 1 min vollständig durch massives Kupfer inaktiviert (Abbildung 25, A;

Escherichia coli K12 7636, B; *Escherichia coli* K12 $\Delta ycbX$). Beide Keime überlebten auf Edelstahl-Kontrolloberflächen.

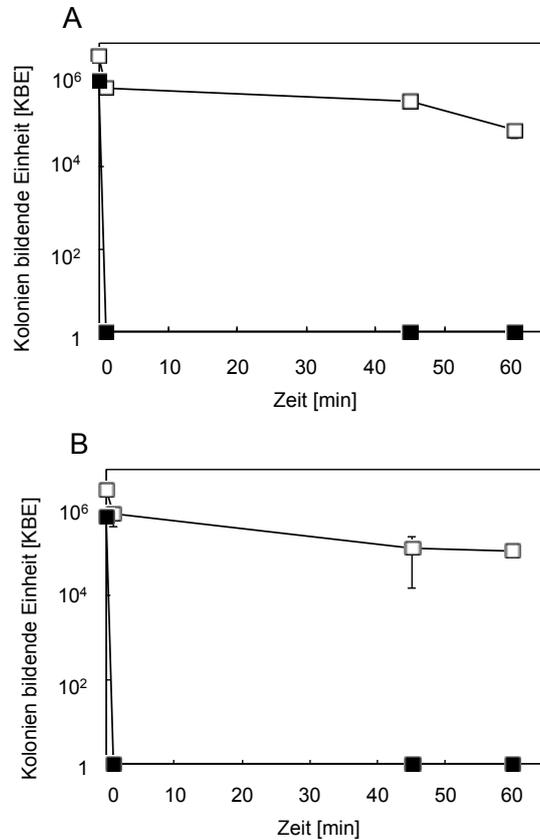


Abbildung 25: Inaktivierung von *E. coli* 7636 und JW5126-1 durch metallische Kupferoberflächen.

Die Erreger wurden auf massive Kupferplättchen (schwarze Symbole) oder Edelstahl aufgetragen (offene Symbole), für unterschiedliche Zeiten inkubiert, von den Oberflächen abgenommen und auf feste Nährmedien ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und überlebende Zellen als Kolonienbildende Einheiten gezählt. Abbildung A zeigt *Escherichia coli* K12 #7636 und Abbildung B *Escherichia coli* K12 $\Delta ycbX$.

3.2.10.3 Vergleichende genomische Analysen von MRSA und MRSA mCu60

Da die Sequenzierung der *E. coli* Genome keinen Aufschluss über die Ursache der Toleranz gegenüber massivem Kupfer erbringen konnte, wurde MRSA und seine Kupfer-tolerante Mutante sequenziert. Die gewonnenen Daten wurden mit

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

dem Referenzstamm MRSA N315 (NC_002745.2) verglichen und analysiert. Es wurden lediglich 2 SNPs in der mCu60 Mutante, nicht aber im Wildtypen gefunden. Der erste SNP war erneut eine stille Mutation, während die zweite Mutation zu einem Aminosäureaustausch im SA1388 Gen führte. Dieses Gen kodiert für ein hypothetisches Protein. Um die Funktion dieses Gens eingrenzen zu können, wurden die Daten mit der Conserved Domain Database [Marchler-Bauer *et al.* 2013] abgeglichen. SA1388 gehört zur YbgL Proteinfamilie. Charakteristisch für diese Proteinfamilie sind di-nukleare Metall-Zentren mit bisher unbekannt Funktionen in MRSA.

Folglich konnte auch hier keine charakteristische Veränderung im MRSA mC60 Genom für die Toleranz gegenüber massivem Kupfer bestimmt werden.

3.2.11 Vergleichende Transkriptionsanalysen der mCu60 Mutanten

Ganzgenom-Sequenzierungen beantworten nicht immer phänotypische Beobachtungen. So wurden mit dieser Methode keine eindeutigen genomischen Ursachen für die Toleranz der beiden Mutanten gegenüber massivem Kupfer gefunden. Da unterschiedliche Genexpressionen bei genetisch gleichen Stämmen zu verschiedenen Phänotypen führen können, wurde nun der Frage nachgegangen, ob eine veränderte Genexpression innerhalb der Bakterien die Ursache für die Kupfer-Toleranz sein könnte. Um diese Möglichkeit für die evolvierten Stämme zu untersuchen, wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt. Die relative Gen-Expression wurde zwischen den jeweiligen Wildtypen und ihren Mutanten bestimmt und verglichen. Dabei wurden nur mCu60 Gene betrachtet, die ein mindestens 2-fach höhere oder niedrigere Expressionsrate gegenüber ihren Wildtyp-Stämmen aufwiesen.

3.2.11.1 Das *ycbY* Gen wird in *E. coli* mCu60 hoch-reguliert

Insgesamt wurde die Expressionsrate von 4305 Genen innerhalb des *E. coli* Wildtyp-Genoms und seiner Mutante bestimmt. Von diesen wurden lediglich 18 mCu60 Gene mit einer mindestens 2-fach erhöhten mRNA Konzentration im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Gleichzeitig wiesen 317 mCu60 Gene eine mindestens 2-fach niedrigere Expressionsrate auf (Abbildung 26).

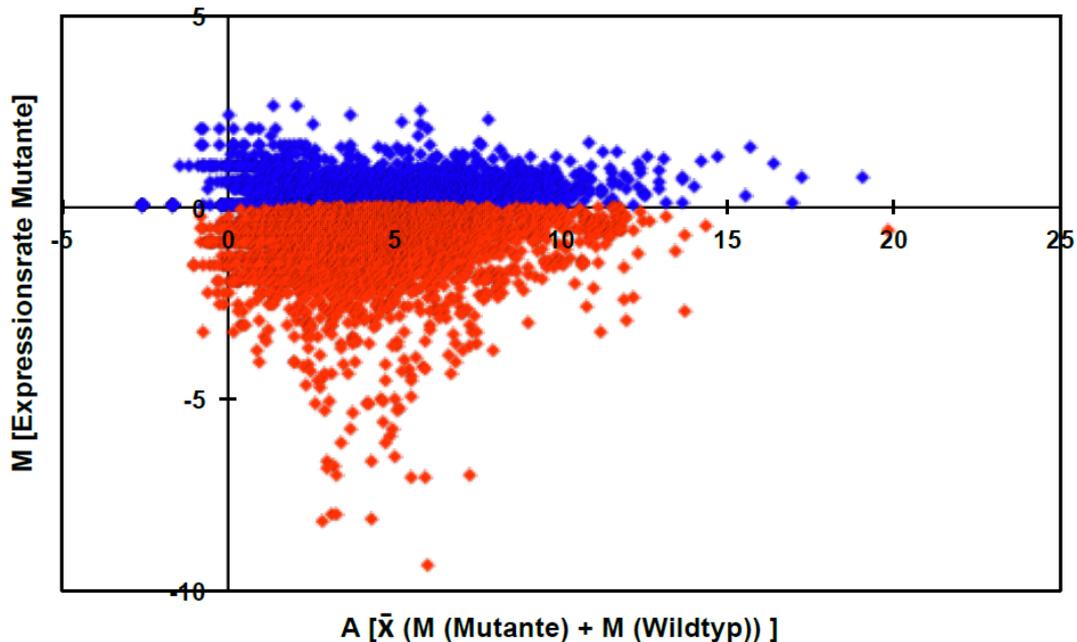


Abbildung 26: Transkriptionsvergleich der *E. coli* Wildtyp-Zellen und mCu60 Mutanten.

Dargestellt sind die Expressionsraten M der mCu60 Mutante im Vergleich zu den Durchschnittswerten der Expressionsraten der mCu60 Mutante und des Wildtyps.

Die durchschnittliche Expressionsrate im Wildtyp-Transkriptom betrug $4,79 \pm 2,85$, während die Expressionsrate in der mCu60 Mutante mit $4,31 \pm 2,95$ geringfügig reduziert war. Damit zeigt sich ein deutlicher Trend zur Reduktion der Stoffwechselaktivitäten innerhalb des mCu60 Transkriptoms.

Das *yxbX* Gen wurde durch ein IS2-Element (Abbildung 24) inaktiviert, und führte zu einer stark reduzierten Transkription von *yxbX* (-4,70). Dieser Funktionsverlust führte zu der Überexpression der Methyltransferase YcbY (2,04) (Abbildung 27). Die beiden Gene liegen in direkter genomischer Nachbarschaft zueinander (Abbildung 24). Die Überexpression dieser RNA-

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

modifizierenden Methyltransferase im *E. coli* mCu60 Genom könnte mit ein Grund für die beobachteten Veränderungen im Transkriptom sein.

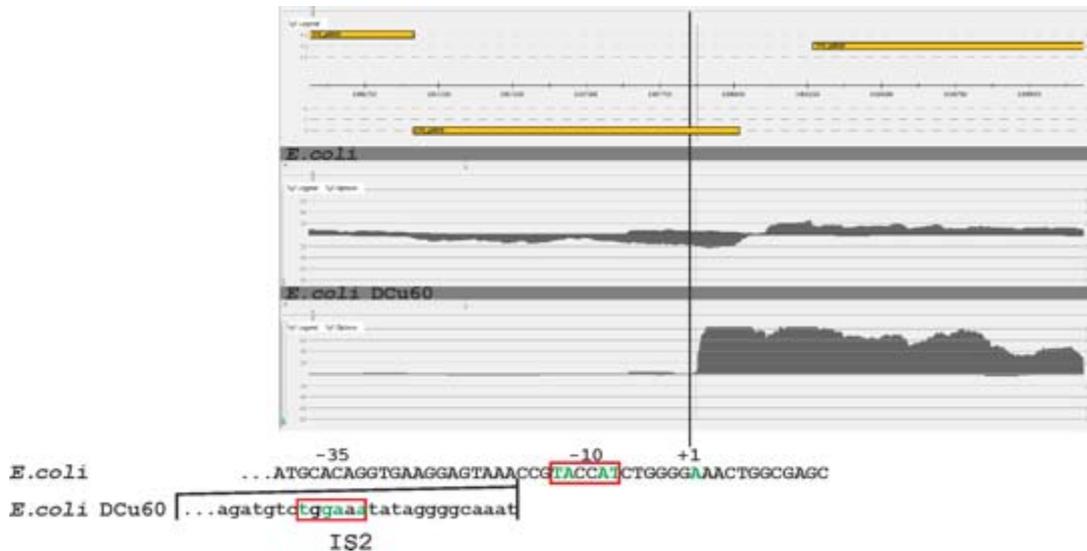


Abbildung 27: Veränderung der DNA Sequenz und der Transkription in *E. coli* mCu60 nach der Insertion eines IS-Elements ins *ycbX* Gen

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem *E. coli* Genom mit Fokussierung auf die Region mit den Genen *ycbX* und *ycbY*. Die X-Achse repräsentiert hierbei die genomische Position. Im unteren Teil der Abbildung ist die Expressionsrate von *E. coli* (oben) und *E. coli* mCu60 (unten) zu sehen. Dabei zeigt sich, dass durch die Insertion des IS2-Elements (nur das 3'-Ende ist aufgeführt) die Expression des *ycbY* Gens stark veränderte. Die mutmaßlichen -35 und -10 Regionen des $\sigma 70$ Promotors sind rot und die Consensus-Basenpositionen von $\sigma 70$ Faktoren grün markiert.

3.2.11.2 Unterschiede in den Transkriptionsraten zwischen MRSA und MRSA mCu60

Der MRSA Stamm N315 ist bisher nur wenig charakterisiert, was zu der geringen Anzahl gut annotierter Gene führte. Dies ist auch der Grund, warum etwa 1700 Gene weniger bestimmt wurden, als bei *E. coli* W3110.

Es konnten die Expressionsraten von 2598 Genen bestimmt werden. Basierend auf einer mindestens 2-fach höheren bzw. niedrigeren Expressionsrate wurden für MRSA 5 hochregulierte bzw. 37 runterregulierte Gene gefunden (Abbildung 28). Wie bei *E. coli* war die durchschnittliche

Expressionrate bei der MRSA mCu60 Mutante mit $6,82 \pm 2,76$ gegenüber $7,00 \pm 2,66$ beim Wild-Typ Elter geringfügig niedriger.

Auch hier lässt sich auf eine Reduktion des Transkriptoms, verursacht durch die Kupfer-Toleranz, schließen.

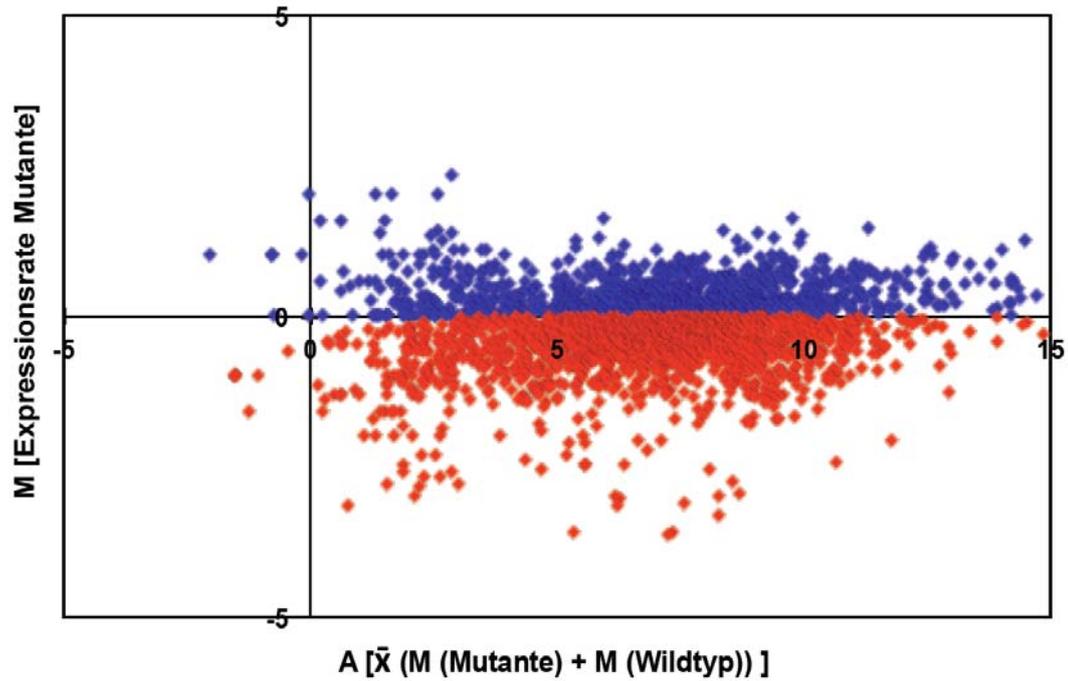


Abbildung 28: Transkriptionsvergleich der MRSA Wildtyp-Zellen und mCu60 Mutanten

Dargestellt sind die Expressionsraten M der mCu60 Mutante im Vergleich zu den Durchschnittswerten der Expressionsraten der mCu60 Mutante und des Wildtyps.

4 Diskussion

4.1 Hochpathogene Erreger werden durch metallische Kupferoberflächen abgetötet

Entsprechend der Biostoffverordnung werden unter der Risikogruppe 3 solche Erreger zusammengefasst, welche eine schwere Krankheit beim Menschen hervorrufen können, die Gefahr der Verbreitung in der Bevölkerung besteht, aber dennoch eine wirksame Behandlung bzw. Prophylaxe möglich ist (§3 BioStoffV). Zu dieser Gruppe gehören u. a. das Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis* oder *Yersinia pestis*. Ebenso finden sich eine Vielzahl von Viren in dieser Kategorie, inklusive Affenpocken, verschiedene Hepatitis- und Influenza- Viren.

In der Risikogruppe 4 werden nur Viren gelistet. Diese Viren rufen eine schwerwiegende, häufig tödliche und hochansteckende Erkrankung hervor. Eine Behandlung, so vorhanden, ist schwierig und die Gefahr der Verbreitung in der Bevölkerung ist groß (§3 BioStoffV). In diese Kategorie gehören Erreger vieler hämorrhagischer Fieber wie Ebola-, Marburg- oder Lassa-Fieber. Aber auch *Variola major* (echte Pocken) fällt in die Risikogruppe 4. Hier ist zu erwähnen, dass echte Pocken durch eine massive weltweite Impfkampagne seit 1977 als ausgerottet gelten. Lediglich am CDC in Atlanta [CDC, <http://www.cdc.gov/24-7/CDCFastFacts/laboratories.html>] sowie am VECTOR nahe Novosibirsk in Russland [VECTOR, <http://www.vector.nsc.ru>] werden Stämme in den dortigen Hochsicherheitslaboratorien gelagert. Heutzutage wird das Affenpocken-Virus (ähnliches klinisches Bild, jedoch wesentlich geringere Letalität als Variola, Risikogruppe 3 [Huhn *et al.* 2005]) oft als Modelorganismus für *Variola major* verwendet [Kugelman *et al.* 2014].

Außer dieser Klassifizierung gibt es noch eine weitere Eingruppierung, welche unabhängig von den Risikogruppen ist. Diese befasst sich mit

Biostoffen und ihrem Potential zum Missbrauch als Biologische Waffe bei bioterroristischen Anschlägen. Diese Agenzien stellen ein erhöhtes Risiko für die Bevölkerung dar und werden nach den Vorgaben des Center of Diseases Control and Prevention (CDC) in drei Klassen eingestuft (Tabelle 15): Bei Biostoffen der Kategorie A ist die Übertragung und Verbreitung einfach, die Letalität und die Gefahr für die Bevölkerung aber sehr hoch, Erreger der Kategorie B können leicht verbreitet, aber auch leicht behandelt und eingedämmt werden und weisen eine geringere Letalitätsrate als Erreger der Kategorie A auf, während Agenzien der Kategorie C Erreger beinhalten, die entweder eine sehr niedrige Letalitätsrate haben oder eine hohe Letalitätsrate aufweisen, aber nur sehr schwer auf den Menschen übertragbar sind [CDC, <http://www.cdc.gov/24-7/CDCFastFacts/laboratories.html>].

Tabelle 15: Potentielle Biologische Kampfstoffe und deren Klassifizierung.

Kategorie A	Kategorie B	Kategorie C
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Brucella sp.</i>	Hantavirus
<i>Clostridium botulinum</i> Toxin	<i>Burkholderia mallei</i>	
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	
<i>Francisella tularensis tularensis</i>	<i>Coxiella burnetii</i>	
Echte Pocken (<i>Variola major</i>)	<i>Rickettsia prowazekii</i>	
Filoviren	Toxine (Ricin, <i>Staphylococcus</i>)	
Arenaviren	Alphaviren	
	Affenpocken	

Aufgelistet sind die häufigsten Biostoffe, die als Biologische Waffen munitioniert und missbraucht werden können. Die Unterteilung erfolgt nach 3 Kategorien (A-C) des CDC. Fett sind alle Erreger markiert, die für *Contact Killing* Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet worden sind. (<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>).

4.1.1 Bakterielle Erreger

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit von Erregern durch Kupferoberflächen unter anderem durch die Auftragsart bestimmt wird. So werden Erreger, die

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

durch die trockene Methode [Espirito Santo *et al.* 2008] mit Kupfer in Berührung kommen, wesentlich schneller, als durch die sogenannte feuchte Methode [McLean *et al.* 1993], inaktiviert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Ausgewählte Kupfer-verursachte Inaktivierungen von Mikroorganismen.

Spezies	Methode	Inaktivierungs- geschwindigkeit	Referenz
<i>A. johnsonii</i>	trocken	einige Minuten	[Espirito Santo <i>et al.</i> 2010]
<i>B. conglomeratum</i>	trocken	einige Minuten	[Espirito Santo <i>et al.</i> 2010]
<i>C. albicans</i>	trocken	5 min	[Quaranta <i>et al.</i> 2011]
<i>E. coli</i> W3110	trocken	1 min	[Espirito Santo <i>et al.</i> 2008]
Norovirus	trocken	< 5 min	[Warnes <i>et al.</i> 2013]
<i>S. cerevisiae</i>	trocken	30 sec	[Quaranta <i>et al.</i> 2011]
<i>S. warnerii</i>	trocken	einige Minuten	[Espirito Santo <i>et al.</i> 2010]
<i>A. baumannii</i>	feucht	180 min	[Mehtar <i>et al.</i> 2008]
<i>A. niger</i>	feucht	>576 h	[Weaver <i>et al.</i> 2010a]
<i>C. albicans</i>	feucht	60 min	[Mehtar <i>et al.</i> 2008]
<i>E. coli</i> O157	feucht	65-75 min	[Noyce <i>et al.</i> 2006b; Wilks <i>et al.</i> 2005]
<i>E. hirae</i>	feucht	90 min	[Molteni <i>et al.</i> 2010]
Influenza A virus	feucht	6 std, 4 log Reduktion	[Noyce <i>et al.</i> 2007]
MRSA	feucht	45 min	[Noyce <i>et al.</i> 2006a]
Norovirus	feucht	30 min	[Warnes <i>et al.</i> 2014]
<i>P. aeruginosa</i>	feucht	180 min	[Mehtar <i>et al.</i> 2008]
<i>S. enterica</i>	feucht	4 h	[Faundez <i>et al.</i> 2004]

Beide Methoden stellen Modelle für verschiedene Situationen im Klinikalltag dar. Die feuchte Methode imitiert dabei die Kontamination einer Oberfläche mit größeren Flüssigkeitsmengen, wie z.B. durch niesen oder andere

Körperflüssigkeiten. Die trockene Methode hingegen imitiert die tägliche Berührung von Gegenständen mit den Handflächen, wie z.B. Türgriffe oder Lichtschalter. Betrachtet man die beiden möglichen Methoden bezüglich der Interaktion der Mikroben mit den Oberflächen, so sind die Erreger durch die trockene Methode im direkten Kontakt mit der Oberflächen, da eine Vielzahl an Erreger in einem kleinen Volumen auf den Oberflächen verteilt wird und die Flüssigkeit binnen Sekunden evaporiert. Erreger, die mit der nassen Methode untersucht werden, sind in einer Lösung (wenige Erreger in einer großen Flüssigkeitsmenge), die wohlmöglich schützende Eigenschaften aufweist. Der Vergleich der in der Literatur beschriebenen Inaktivierungsgeschwindigkeiten bestätigt, dass die Inaktivierung bei der trockenen Methode wesentlich schneller ist als bei der feuchten Methode (Tabelle 16). Dabei werden die meisten Erreger mit der trockenen Methode innerhalb von 5 Minuten inaktiviert, während Erreger mit der feuchten Methode, je nach Studie und/oder Organismus zwischen 30 min (Norovirus) und 15 Tagen (*Mycobacterium tuberculosis*) [Mehtar *et al.* 2008; Warnes *et al.* 2014] benötigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mit der trockenen Methode durchgeführt. Untersucht wurde eine Vielzahl an Gram-negativen hochpathogenen Bakterien, das Gram-positive Bakterium *B. anthracis* sowie verschiedene Orthopocken- Spezies. Die hier untersuchten hochpathogenen Erreger erlagen durch metallisches Kupfer innerhalb weniger Minuten dem *Contact Killing* (Abbildung 8). Die einzige Ausnahme war *B. anthracis*, das sich als widerstandsfähig gegenüber den Einflüssen des *Contact Killings* erwies (Abbildung 9). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sporenbildende Bakterien, wie *Clostridium difficile*, als auch Sporen humanpathogener Pilze, wie *Candida albicans* oder *Aspergillus niger*, wesentlich länger benötigen, als vegetative Zellen, um inaktiviert zu werden [Weaver *et al.* 2008; 2010a]. Es gibt zwei Publikationen mit verschiedenen Ergebnissen zur Inaktivierung von *C. difficile*. Beide Ansätze zeigen keine Reduktion der überlebenden Zellzahl auf Edelstahl, aber eine Reduktion um 2 log₁₀ Stufen auf massivem Kupfer innerhalb der ersten 3 Stunden nach Auftragung. Danach unterscheiden sich die erzielten Ergebnisse. Wheeldon resümierte aus seiner Studie, dass die

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

vegetativen Zellen, nicht aber die Sporen absterben. Diese Schlussfolgerung beruht auf der Reduktion der Zellzahl innerhalb der ersten 100 Minuten, während im Anschluss die Zellzahl konstant bleibt [Wheeldon *et al.* 2008]. Weaver hingegen konnte eine stetige Reduzierung der Zellzahlen nachweisen, die mit der vollständigen Inaktivierung von *C. difficile* nach 24 Stunden endete. Diese widersprüchlichen Ergebnisse können auf unterschiedliche Sporenmengen in den Suspensionen oder auf verschiedene experimentelle Ansätze zurückgeführt werden. Unabhängig davon wurden beide Studien mit der feuchten Methode durchgeführt. Aber auch die effizientere trockene Methode konnte *B. anthracis* Sporen nicht abtöten, und ist folglich für Sporenbildende Bakterien ungeeignet.

Es zeigte sich ein deutlicher Trend hinsichtlich der Zellmorphologie der hier untersuchten Bakterien und ihrer Inaktivierungsgeschwindigkeit. So zeigten kokkoide Bakterien wie *B. melitensis*, *F. tularensis* oder MRSA ein verlangsamtes Absterben auf massivem Kupfer. *F. tularensis* und MRSA überlebten 5 Minuten (Abbildung 8, Abbildung 13), *B. melitensis* hingegen 3 Minuten auf Kupfer (Abbildung 8). Die stäbchenförmigen Bakterien *B. pseudmallei* und *B. mallei* waren bereits nach 30 Sekunden auf Kupfer inaktiviert (Abbildung 8). Ähnlich schnell wurden die stäbchenförmigen Bakterien *Y. pestis* und *E. coli* durch Kupfer inaktiviert (Abbildung 8, Abbildung 13). Diese Ergebnisse sind durch die Aufbringung zu erklären, die einer Kontamination durch Berührung entspricht und bei der die Erreger in direkten Kontakt mit der Oberfläche gebracht wurden. Bakterien die eine stäbchenförmige Zellmorphologie besitzen, haben eine größere Kontakt- und damit Angriffsfläche für Kupfer, das aus dem massiven Metall gelöst wird. Kokkoide Bakterien hingegen haben eine kleinere Angriffsfläche beim Kontakt mit massivem Kupfer und können somit länger auf der Oberfläche überleben. Aber auch hier unterlagen die Erreger insgesamt nach wenigen Minuten dem *Contact Killing* durch Kupfer. Eine zusätzliche Erklärung für das längere Überleben von MRSA könnte neben der kokkoide Zellform auch die gegenüber den Gram-negativen Bakterien wesentlich dickere Zellwand der Gram-positiven Erreger sein (Abbildung 34), die hier als Diffusionsschutz dient [Noyce *et al.* 2006a].

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass nach der Membranperforation durch massives Kupfer, die Degradierung der Nukleinsäuren eine der Auswirkungen des *Contact Killings* ist [Espirito Santo *et al.* 2011; Warnes *et al.* 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine grobe Korrelation zwischen den Genomgrößen der Erreger und der Inaktivierungszeit beobachtet. Bakterien mit größeren Genomen erlagen dem *Contact Killing* schneller als solche mit kleineren, was für die DNA als zusätzlichen Angriffspunkt innerhalb der Zelle spricht: *B. pseudomallei* (7,0 MBp [Sahl *et al.* 2013], 30 Sekunden), *B. mallei* (5,8 MBp [Nierman *et al.* 2004], 30 Sekunden), *Y. pestis* (7,7 MBp [Parkhill *et al.* 2001], 1 Minute), *E. coli* (4,7 MBp [Hayashi *et al.* 2006], 1 Minute), *B. melitensis* (3,3 MBp [DeIvecchio *et al.* 2002], 3 Minuten), MRSA (2,8 MBp [Kuroda *et al.* 2001], 5 Minuten) und *F. tularensis* (1,9 MBp [Larsson *et al.* 2005], 5 Minuten). Dennoch sind für den primären Angriff andere Faktoren ebenso wichtig. Dazu zählt die Dicke der Peptidoglykanschicht, aber auch die Zellmorphologie wie Größe und Form. Denn auch Bakterien mit einem raschen und effizienten DNA Reparatursystem, wie *D. radiodurans* (3,3 MBp [Cox *et al.* 2010]), wurden innerhalb von einer Minute durch Kupfer inaktiviert [Espirito Santo *et al.* 2011]. So ist es wahrscheinlich, dass der primäre Angriffspunkt von Kupfer die Zellmembran ist [Espirito Santo *et al.* 2012b; Hong *et al.* 2012] und erst sekundär die DNA angegriffen wird. Auch weitere Studien belegen die Vermutung, dass die DNA nicht der primäre Angriffspunkt ist. Während innerhalb der ersten Sekunden die intrazelluläre Konzentration an Kupfer innerhalb der Zelle massiv zunimmt [Espirito Santo *et al.* 2012b], führt dies nicht im gleichen Maße zur Zunahme der Schädigung intrazellulärer DNA [Macomber *et al.* 2007].

4.1.2 Virale Erreger

Der Schutz vor Infektionen durch virale Erreger wird häufig wenig beachtet. Grund hierfür ist die zumeist ausgeprägte Sensivität gegenüber Desinfektionsmitteln (www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Desinfektionsmittel). Darüber hinaus finden Infektionen und Verbreitungen

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

mit gefährlichen viralen Erregern vor allem bei größeren Menschenmengen und schlechten hygienischen Standards statt. Dies wurde 2013 in West-Afrika deutlich, wo die Übertragung des Ebola-Virus' ein massives Problem darstellt [Chowell *et al.* 2015]. So infizierte sich die Bevölkerung nicht nur durch den engen Kontakt untereinander, sondern ebenso durch die mangelnden Hygiene-Standards. Massives Kupfer als zusätzliche Barriere kann hier schützen. Aber um Kupfer effektiv als zusätzliche Infektionsbarriere zu nutzen, müssen die zellulären und molekularen Mechanismen genauer verstanden werden. Im Bereich der bakteriellen Inaktivierung durch Kupferoberflächen gibt es bereits eine Vielzahl von Studien und Untersuchungen. Aber nur wenige Studien zeigten bisher, ob die Inaktivierung von Viren durch massives Kupfer ebenso erfolgreich verläuft wie bei Bakterien und Pilzen [Noyce *et al.* 2007; Sagripanti *et al.* 1997; Warnes *et al.* 2013]. Die trockene Methode wurde sogar nur für Noroviren getestet, welche für einen Großteil viraler Gastroenteritiden ursächlich verantwortlich sind. Das nicht-behüllte ssRNA Virus wurde auf trockenem reinen, massiven Kupfer innerhalb von 5 Minuten inaktiviert [Warnes *et al.* 2013] (Tabelle 16).

Orthopockenviren spielen in der Geschichte der modernen Virologie eine bedeutende Rolle. Vaccinia-Virus wurde während des weltweiten Impfprogramms zur Impfung gegen *Variola major* (echte Pocken) und dessen Ausrottung 1977 verwendet [Henderson 1999; Henderson *et al.* 1999]. Noch heute erkranken Menschen, zumeist in Afrika, an dem Affenpockenvirus, einer Zoonose, die durch Nager auf den Menschen (und Affen) übertragen werden kann. Diese Erkrankung ähnelt stark dem Erkrankungsbild der echten Pocken, jedoch mit einer wesentlich geringeren Mortalität [Essbauer *et al.* 2010]. Das Erscheinen dieser Erkrankung verdeutlicht, wie gefährlich solche Orthopockenviruserkrankungen sein können. Daher wurden in dieser Studie Vaccinia- und Affenpockenviren als Modellorganismen für *Variola major* untersucht und erstmalig für diese Organismengruppe eine Inaktivierungszeit von 10 Minuten auf massivem Kupfer bestimmt (Abbildung 10). Der Unterschied in der Inaktivierungszeit zwischen Orthopockenviren (10 min) und Noroviren (5 min) ist vermutlich auf die morphologischen Eigenschaften zurückzuführen. So ist das untersuchte Norovirus ein nicht-behülltes ssRNA

Virus, während Orthopocken behüllte DNA Viren sind. Das Vorhandensein einer schützenden Hülle verlängert die Inaktivierungszeit von Orthopockenviren, während das Fehlen zu einer schnelleren Inaktivierung führt [Warnes *et al.* 2014]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Bakteriophagen mit einem RNA-Genom schneller durch Kupfer inaktiviert werden als Bakteriophagen mit einem DNA –Genom [Li *et al.* 2011] was mit den hier erzielten Inaktivierungsgeschwindigkeiten belegt werden konnte.

4.2 Metallisches Kupfer begünstigt nicht den VBNC-Status

Viele Bakterien können in den sogenannten lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand (*viable but non culturable*, VBNC) eintreten. In diesem Zustand können die Erreger nicht mehr wachsen und kultiviert werden [Oliver 1995; Xu *et al.* 1982]. Dieser Zustand wird durch Stress, wie z.B. durch Nährstoffmangel, Antibiotika und Desinfektionsmittel, ungünstige Temperaturen, osmotischen Druck, Schwermetalle, oder auch ionisches Kupfer induziert [Asakura *et al.* 2008; Besnard *et al.* 2002; Cook *et al.* 2007; Ghezzi *et al.* 1999; Grey *et al.* 2001]. Der Status geht mit der Reduktion der metabolischen Aktivität einher, die allerdings reversibel ist, so dass die Erreger innerhalb kürzester Zeit wieder in ihren voll-infektiösen, metabolisch aktiven Zustand übergehen können. Der lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zustand ist relativ gut untersucht, aber unvollständig verstanden. Eine Vielzahl von pathogenen Bakterien wie *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori* oder *Mycobacterium tuberculosis* [Oliver 2010] und Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* [Salma *et al.* 2013] können unter verschiedenen Stressbedingungen in den VBNC-Status eintreten [Asakura *et al.* 2008; Besnard *et al.* 2002; Cook *et al.* 2007; Ghezzi *et al.* 1999; Grey *et al.* 2001]. Zusätzlich wurde in diesen Studien der Austritt aus diesem Zustand beschrieben, indem durch Umkehr der Stressbedingungen die Erreger wiederbelebt werden und wieder zurück in den metabolisch aktiven Zustand übergehen können (Resuszipitation). Problematisch ist beim VBNC-Status die Tatsache, dass die Erreger zwar nicht mehr auf Laborkultivierungsmedien vermehrungsfähig sind, aber ihre

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Infektiösität erhalten bleiben kann. Es konnte z. B. in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass *Listeria monocytogenes*, welches in den VBNC-Status eingetreten war, dennoch virulent blieb [Cappelier *et al.* 2007].

In früheren Publikationen starben durch ionischen Kupfer-Stress bis zu 90% der getesteten Bakterienzellen in einer Flüssigkultur ab, jedoch traten die übrigen 10% in den VBNC-Status über und konnten nach 7 bis 25 Tagen wieder aus diesem „scheintoten“ Zustand austreten [Alexander *et al.* 1999; Grey *et al.* 2001]. In der vorliegenden Arbeit war zu klären, ob Bakterien, die durch metallisches Kupfer unter extremen Stress gesetzt werden, ebenso in diesen Status übertreten und sich dem *Contact Killing* entziehen können. *E. coli* und *Y. pestis* EV76 (als Modellorganismen) zeigten keine VBNC-Aktivität nach Kontakt zu massivem Kupfer (Abbildung 14); über Wochen hinweg kam es zu keinerlei Resus-zitation. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen definitiv tot und nicht in den VBNC-Status übergetreten waren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hochpathogene Bakterien und Viren auf massivem Kupfer definitiv absterben. Die rasche und effektive Inaktivierung auf beschichtungsfreien Voll-Metall-Kupferwerkstoffen verhindert das mögliche Eintreten der Bakterien in den VBNC-Status.

4.3 Kupfertolerante Erreger

4.3.1 Zur Wirkungsweise von Kupfer und der Bildung von Resistenz-Mechanismen

Kupfer ist als Bestandteil verschiedener Redoxreaktionen (u. a. als Cofaktor in der aeroben Atmungskette) unersetzlich und kommt in Lebewesen in zwei Oxidationsstufen vor (Cu(II) = oxidiert, Cu(I) = reduziert) [Karlin 1993]. Die hohe Redoxreaktivität stellt aber auch eine Herausforderung dar, da freie Kupferionen leicht zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen und diese Reaktionen entscheidend zur Toxizität von Kupfer unter aeroben Bedingungen beitragen. Diese Radikale entstehen über die Haber-Weiss bzw. Fenton-artige Reaktionen [Liochev *et al.* 2002] und können Membranen

[Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b; Hong *et al.* 2012], Proteine und DNA durch Oxidation angreifen [Warnes *et al.* 2010] (Abbildung 29). Innerhalb der Zelle kommt es nur in geringem Maße zu der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Superoxid (Abbildung 29, Gleichung 1). Wenn Cu(II)-Ionen hinzukommen, findet aber vermehrt die Reaktion von Superoxid mit Cu(II) statt. Dadurch wird Cu (II) zu Cu (I) reduziert und Superoxid zu molekularem Sauerstoff oxidiert (Abbildung 29, Gleichung 2). Anschließend reagiert Cu(I) mit Wasserstoffperoxid wieder zu Cu(II). Weiter entstehen Sauerstoff, Hydroxidionen und Hydroxyl-Radikale (Abbildung 29, Gleichung 3). Ist diese Reaktion einmal gestartet, bilden sich bei jedem Zyklus der Kettenreaktion mehr Radikale, die zu Zellschäden führen.

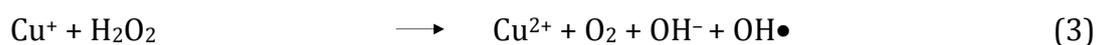
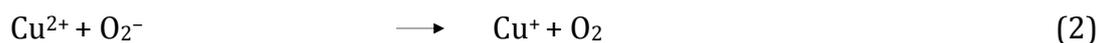
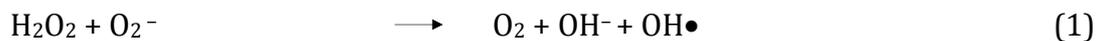


Abbildung 29: Haber-Weiss / Kupfer-vermittelte Fenton-artige Reaktionen, die zur Bildung von ROS führen.

In Membranen führen diese Radikale zu Lipidperoxidationen (Abbildung 30) und damit zur veränderten Permeabilität oder zur vollständigen Zerstörung der Membrane [Hong *et al.* 2012]. Fettsäuren (L-H) reagieren mit den Hydroxyl-Radikalen zu Wasser und Fettsäure-Radikalen (Abbildung 30, Gleichung 1). Ist diese Startreaktion angelaufen, so entstehen aus den Fettsäure-Radikalen mit Peroxid Fettsäure-Peroxyradikale wiederum Fettsäure-Hydroperoxid und Fettsäure-Radikalen (Abbildung 30, Gleichung 5) [Halliwell *et al.* 1984]. Diese Kettenreaktion kann üblicherweise 200 bis 300 mal ablaufen [Cosgrove *et al.* 1987] und kann nur dann unterbrochen werden, wenn entweder alle ungesättigten Fettsäuren verbraucht sind, zwei Radikale eine stabiles Nicht-Radikal bilden (Abbildung 30, Gleichung 6) oder Antioxidantien alle Radikale abfangen [Tadolini *et al.* 1989].

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

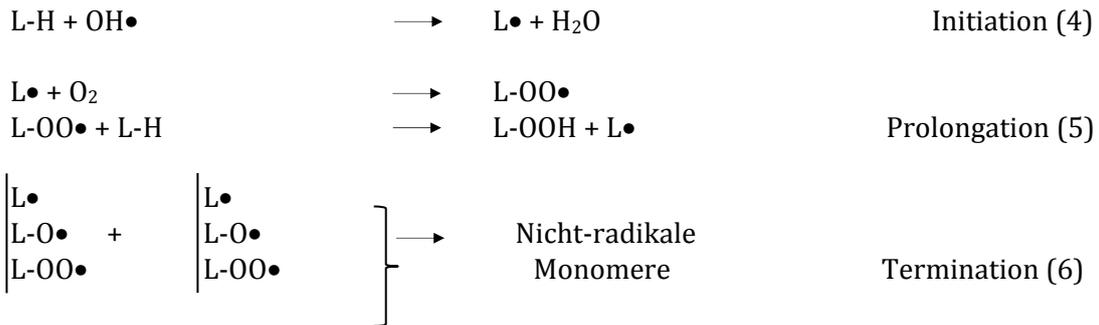


Abbildung 30: Lipidperoxidation.

Die Oxidation verläuft in drei Schritten: Initiation, Prolongation und Termination.

Lipidperoxidation ist keine spontane Reaktion und muss durch Katalysatoren wie Kupfer gestartet werden. Oxidiertes Kupfer kann durch die Entfernung eines Elektrons oder durch Wasserstoffabspaltung diese Reaktion katalysieren (Abbildung 31, Gleichung 7, 8 und 9).

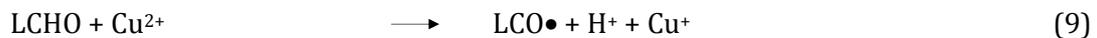
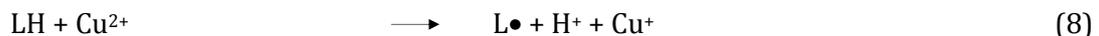
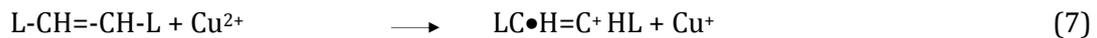


Abbildung 31: Verschiedenen Reaktionmöglichkeiten von reduziertem Kupfer die zur Lipidperoxidation führen können.

Für die direkte Initiation der Lipidperoxidation kann ebenfalls Cu(I) als Katalysator fungieren. Da Cu(I) große Sauerstoffkomplexe bilden kann, ist hierfür die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff essentiell. Dieser Komplex kann wiederum Lipide angreifen und zu Radikalen umwandeln (Abbildung 32, Gleichung 10 und 11).

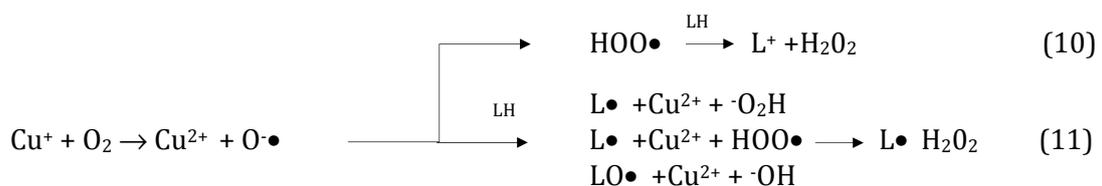


Abbildung 32: Verschiedene Initialisierungen der Lipidperoxidation durch oxidiertes Kupfer.

Cu(I) und Cu(II) fördern durch die direkte Interaktion mit Lipiden die Bildung von Lipid-Radikalen und somit die Prolongation der Kettenreaktion (Abbildung 33, Gleichung 12 und 13).



Abbildung 33: Prolongation der Lipidperoxidation durch reduziertes oder oxidiertes Kupfer.

Im Detail sind diese Mechanismen gut für *Escherichia coli* als Gram-negatives Bakterium und bei *Lactococcus lactis* und *Enterococcus hirae* als Vertreter Gram-positiver Erreger erforscht. Der Transport von Kupfer in die Zelle ist bei den meisten Gram-negativen Bakterien noch nicht oder nur teilweise entschlüsselt. Es wird vermutet, dass Kupfer durch Diffusion, über Porine oder durch andere passive bzw. aktive Transporter in die Zelle gelangt. Die Vorgänge der Kupfertranslokation aus dem Zytoplasma und Periplasma sind recht gut verstanden (Abbildung 34).

CueR, ein zytoplasmatischer Repressor der MerR-Familie reguliert Cu(I)-abhängig die Expression von *cueO* und *copA* [Stoyanov *et al.* 2001]. Des Weiteren wird CusR durch periplasmatisches Cu(I) aktiviert, so dass das *cusCFBA* Operon exprimiert wird. Zytoplasmatisches Cu(I) wird durch CopA, unter ATP Hydrolyse in das Periplasma transportiert [Rensing *et al.* 2000; Stoyanov *et al.* 2001]. Dort wird Cu(I) durch die Kupfer-Oxidase CueO [Grass *et al.* 2001] zu dem weniger toxischen Cu(II) oxidiert [Roberts *et al.* 2002; Singh *et al.* 2004] und in *Salmonella enterica* durch ein Kupfer-bindendes Protein (CueP) gebunden [Osman *et al.* 2010]. Die Schnelligkeit und Wichtigkeit der Ausschleusung von Cu(I) durch CopA aus dem Zytoplasma konnte durch Tieme 2008 nachgewiesen werden. Dafür wurde *E. coli* einem massivem Kupfer Schock ausgesetzt und die *copA*-spezifische mRNA Kopienzahl stieg innerhalb von 2 Minuten auf 350 Kopien/Zelle an [Thieme *et al.* 2008]. Ebenso wird das periplasmatische Cu(I) durch die Efflux-Pumpe CusCFBA ausgeschleust. Dabei

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

wird Cu(I) vom Kupfer-Chaperon Cus(F) gebunden und zum CusCBA Komplex transportiert und ausgeschleust [Franke *et al.* 2003].

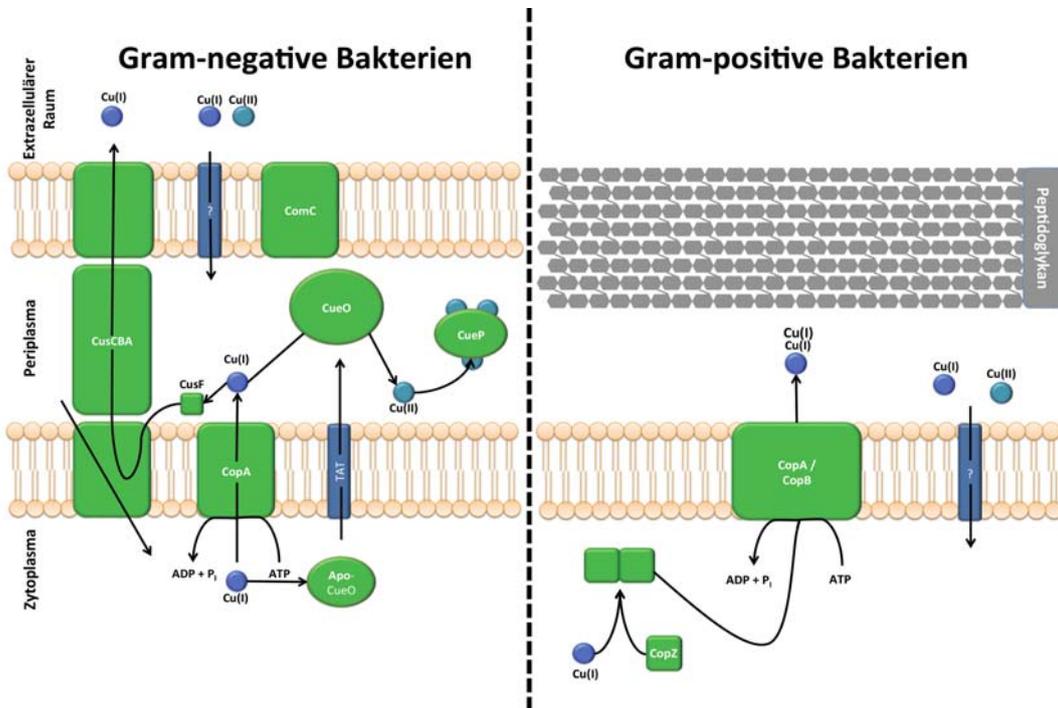


Abbildung 34: Kupfer-Resistenz-Mechanismen in Bakterien.

Bei vielen Gram-negativen Bakterien wird Cu(I) über CopA-artige P-Typ-ATPasen aus dem Zytoplasma in das Periplasma transportiert. Dort kann es entweder über CusF und den CusCBA-Protonen-Cu-Antiporter-Komplex in den extrazellulären Raum transportiert oder durch die Oxidase CueO in das weniger toxische Cu(II) oxidiert und durch das Chaperon CueP gebunden werden. Typisch für Gram-positive Erreger ist, dass zytoplasmatisches Cu(I) durch CopZ gebunden und mittels der P-Typ-ATPasen CopB bzw. CopA ausgeschleust wird (Modifiziert nach Espirito Santo [Espirito Santo *et al.* 2014]).

Bei Gram-positiven Erregern dient *E. hirae* als Modelorganismus für Untersuchungen zu Kupfer-Resistenzmechanismen [Solioz *et al.* 2003]. Als Antwort auf Kupferstress wird in *E. hirae* das *copYZAB*-Operon induziert (Abbildung 34). Extrazelluläres Cu(I) wird durch CopA zu CopY transportiert. Zytoplasmatisches Cu(I) bindet das CopY welches dadurch vom Promotor gelöst und somit die Expression der *cop* Gene startet. So wird CopY, das Chaperon CopZ und die ATPase CopA und CopB, die vermutlich als Efflux Systeme fungieren [Raimunda *et al.* 2011; Solioz *et al.* 1995], als Antwort auf Kupfer im Zytoplasma produziert.

4.3.1.1 Kupfer-Toleranz und Antibiotika-Resistenzen treten nicht gleichzeitig auf

Nachdem im Jahre 1928 Alexander Fleming Penicillin entdeckt hatte, wurden Antibiotika innerhalb der nächsten Jahre massenhaft hergestellt und verwendet. Bereits in den frühen 1940ern wurden die ersten Penicillin-resistenten *S. aureus* Stämme beschrieben. Kirby schloss daraus, dass die Resistenz von *S. aureus* gegenüber Penicillin der massenhaften Verordnung dieser Antibiotika während des zweiten Weltkrieges zuzuschreiben ist [Kirby 1944]. Heutzutage sind zwischen 90 und 95% aller klinisch relevanten *S. aureus* Stämme gegen Penicillin resistent [Sakoulas *et al.* 2008].

Das die Verwendung von Oberflächen aus Kupfer-Legierungen in Hygiene empfindlichen Bereichen wie Kliniken oder Arztpraxen die Keimbelastung drastisch reduziert kann, wurde mit verschiedenen klinischen Studien nachgewiesen [Casey *et al.* 2010; Mikolay *et al.* 2010; Salgado *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2012]. Aber nicht nur die Keimbelastung wird reduziert, auch die Infektionsrate kann reduziert werden [Salgado *et al.* 2013]. Kupferoberflächen inaktivieren Krankenhauskeime ähnlich effizient wie andere antimikrobielle Substanzen [Casey *et al.* 2010; Salgado *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2012]. Daher stellte sich die Frage, ob Erreger, die immer wieder in Kontakt mit Kupferoberflächen kommen, wie bei Antibiotika bereits beobachtet, Resistenzen entwickeln können. Es ist bekannt, dass es bereits Kupfer-resistente bzw. -tolerante Bakterien gibt. Diese konnten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Gefunden wurde eine Reihe von Kupfer-toleranter Erregern auf Euro-Münzen aus Polen, Portugal, Marokko und Deutschland [de Carvalho *et al.* 2014; Espirito Santo *et al.* 2010; Kalita *et al.* 2013]. Trotz der sehr geringen Keimbelastung auf diesen Münzen (6 KBE heterotrophe aerobe Bakterien [Espirito Santo *et al.* 2010]), waren die gefundenen Erreger gegenüber metallischem Kupfer im Vergleich zu den Kontrollstämmen (Wildtyp-Stämmen) resistenter.

Die in dieser Arbeit generierten Bakterien, die die Fähigkeit evolviert haben, metallischem Kupfer zu widerstehen, sind nach Fridmanns Definition Kupfer-tolerant, aber nicht resistent [Fridman *et al.* 2014]. Diese Definition beruht auf den Unterschieden zwischen Antibiotika-Resistenz bzw. Toleranz. Die

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Resistenz wird mit der Steigerung der minimalen Hemmkonzentration für das untersuchte Antibiotikum nachgewiesen. Die Toleranz entsteht bei der Verwendung von massivem Kupfer, also bei gleichbleibender Konzentration, somit sind die generierten Organismen nicht gegenüber einer bestimmten Kupferkonzentration resistent, sondern nur eine gewisse Zeit tolerant, bevor diese absterben. So konnte in dieser Arbeit in Zwischenversuchen gezeigt werden, dass *E. coli*, welches 10 Minuten auf massivem Kupfer überlebt, nicht 15 Minuten und mehr auf Kupferoberflächen überlebt.

Unter der Verwendung von Silber-Nanopartikeln (AgNP) im Wachstumsmedium konnte Larimer *et al.* *Mycobacterium smegmatis* Bakterien isolieren, die bis zu einer Konzentration von 430 μM AgNP resistent waren (Ag^r-1 Mutanten). *M. smegmatis* mc² 155 Wildtyp-Zellen wurden bereits bei einer Konzentration von 8 μM AgNP inaktiviert. Diese Resistenz macht sie jedoch empfindlicher gegenüber CuSO₄, CaCl₂ und ZnSO₄. Der Wildtyp überlebte selbst 300 μM CuSO₄, während die Mutante bereits bei ca. 160 μM abgetötet wurde [Larimer *et al.* 2014]. Unklar ist, warum eine Mutante, die toleranter gegenüber Silberpartikel war, empfindlicher gegenüber Cu-Ionen war.

In einigen Studien wurde das gleichzeitige Auftreten von Antibiotika- und Metallresistenzen untersucht und führte zu der Aussage, dass die Resistenz gegenüber Metallionen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika führen kann [Ruiz *et al.* 2003; Silver 1996]. Larimer *et al.* konnte in seiner Studie nachweisen, dass *M. smegmatis* Ag^r-1 durch das gängige Tuberkulose-Antibiotikum Isoniazid bei einer Konzentration von 73 μM und der Wildtyp-Stamm bereits bei 20 μM Isoniazid inaktiviert wurde [Larimer *et al.* 2014]. Folglich konnte hier gezeigt werden, dass die Resistenz gegenüber AgNP zu einer erhöhten Antibiotika-Resistenz führen kann. Frühere Studien zeigten bereits, dass unter Laborbedingungen generierte Silberionen-resistente *E. coli*, eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika der Klasse Cephalosporin wie Cephalothin, Cefepim und Cefpirom aufweisen [Li *et al.* 1997].

Das gleichzeitige Auftreten von Kupfer- und Antibiotika-Resistenz unterliegt, wie auch das *Contact Killing*, ebenfalls dem Unterschied zwischen

Kupferionen und metallischem Kupfer. Aus vielen verschiedenen Anwendungen ist bekannt, dass die Toleranz gegenüber Kupferionen durch die Zugaben von Nahrungsergänzungsmitteln, die Kupfer-Salze beinhalten, gesteigert wird und damit auch die Toleranzgrenze gegenüber verschiedener Antibiotika steigt [Aarestrup *et al.* 2002; Hasman *et al.* 2002; 2005; Resende *et al.* 2012; Ruiz *et al.* 2003; Silver 1996]. Wurde jedoch metallisches Kupfer zur Generierung toleranter Keime verwendet, fanden sich keine Antibiotika-Resistenzen (Tabelle 14). Dennoch konnten einige kleinere Unterschiede in den MHKs gegen antimikrobiell wirksame Substanzen bei den untersuchten Stämmen gemessen werden. So wies *E. coli* mCu60 eine etwas reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure auf, einem β -Lactam-Antibiotikum mit β -Lactamase-Inhibitor. Jedoch ist dieser geringe Unterschied innerhalb der Richtlinien für diesen Erreger des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>). MRSA mCu60 wies Veränderungen in der Resistenz gegenüber Imipenem und Chloramphenicol auf. Jedoch unterlagen auch hier die Unterschiede innerhalb der Richtlinien (<http://www.eucast.org>).

4.3.1.2 Metallische Kupfer-Toleranz und ionische Kupfer-Resistenz sind nicht gekoppelt

Erreger, die resistent gegen Kupferionen sind, also Mutationen bzw. Deletionen in Genen der Kupfer-Homöostase (Abbildung 34) haben, wurden innerhalb kürzester Zeit durch massiven Kupferoberflächen inaktiviert [Espirito Santo *et al.* 2008; Mathews *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2012]. Auch in dieser Arbeit wurden sowohl die Kupfer-toleranten als auch die Wildtyp-Bakterien ionischem Kupfer (CuSO_4) ausgesetzt. Es zeigte sich weder bei *E. coli* noch bei MRSA ein Unterschied in der Resistenz gegenüber CuSO_4 . Dies zeigt deutlich, dass die Resistenz gegenüber metallischem und ionischem Kupfer auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen muss.

4.3.2 Massenspektrometrische Analysen zeigen Unterschiede zwischen Wildtyp und mCu60 Mutanten

Mit massenspektrometrischen Analysen mittels MALDI-TOF können Proteinspektren innerhalb derselben Spezies, wie in dieser Arbeit der Unterschied zwischen Wildtyp-Bakterien und Kupfer-Mutanten, untersucht werden. Dabei konnte zwischen MRSA und MRSA mCu60 kein Unterschied entdeckt werden. Beim Vergleich der Profile von *E. coli* und *E. coli* mCu60 fielen hingegen einige Unterschiede auf. Die Unterschiede waren zwar nur minimal, jedoch war in der Mutante die Expression der Proteine EcnA, AriR und HupB, die für unterschiedliche umweltbedingte Stresssituationen relevant sind, erhöht. Das Membranprotein EcnA ist eine Antwort auf toxische Substanzen, zu denen auch Kupfer zu zählen ist [Bishop *et al.* 1998]. AriR wiederum reguliert weitere Gene, die an der Biofilm-Bildung sowie an der Säure-Resistenz beteiligt sind [Johnson *et al.* 2005]. HupB ist ein DNA-bindendes Protein, welches DNA stabilisieren und vor extremen Umweltbedingungen schützen kann [Hayashi *et al.* 2001]. Umweltbedingungen können Hitze oder Säure sein, aber auch der Angriff durch ROS, welche durch Kupfer gebildet werden können. Die Expression dieser Proteine ist selbst in der Ruhephase leicht erhöht, was ein Hinweis auf die dauerhafte Adaptation des Bakterien-Proteoms an den Stress ist, der durch Kupfer verursacht wurde.

Beim *Contact Killing* führt das gelöste Kupfer zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS führen zur Oxidation verschiedener zellulärer Strukturen, wie DNA oder Membran [Espirito Santo *et al.* 2011; Quaranta *et al.* 2011; Warnes *et al.* 2012]. Der Einsatz von Quenchern kann zwar ROS abfangen und das *Contact Killing* verlangsamen, aber nicht den damit verbundenen Zelltod aufhalten [Espirito Santo *et al.* 2011; Quaranta *et al.* 2011; Warnes *et al.* 2012]. Die bakteriellen Membranen bestehen aus verschiedenen Kompartimenten, wie Kohlenhydraten, Lipide und Proteine. Die Membran beinhaltet ca. 50 % Lipide, diese unterteilen sich in ungesättigten Fettsäuren (unsaturated fatty acids, UFA), zumeist 18:1 und 16:1 Fettsäuren (FS) [Pradenas *et al.* 2012], und gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acids, SFA). Ein Hauptangriffspunkt der ROS sind diese UFA (Abbildung 30 bis

Abbildung 33). Hong zeigte in einer Studie, dass *E. coli* Mutanten mit einer erhöhten UFA/SFA Ratio (1,77) mit der feuchten Methode innerhalb von 30 Minuten durch massives Kupfer inaktiviert wurden, während Mutanten mit einer niedrigeren Ratio (0,87) 45 Minuten zur vollständigen Inaktivierung benötigten [Hong *et al.* 2012]. Folglich könnte die Cu-abhängige Oxidation von UFA ein Hauptgrund für den bakteriellen Zelltod sein.

Zwischen den *E. coli* Wildtyp und den mCu60 Zellen fanden sich einige Unterschiede in der FS-Zusammensetzung. Der Anteil an UFA war in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich niedriger. UFA sind Vorstufen für chemisch instabile, reaktive zyklische FS. Über die generelle Aufgabe solcher langkettigen zyklischen FS ist nur wenig bekannt. Dennoch ist bekannt, dass der Verlust an zyklischen FS zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Peroxiden führen kann [Oyola *et al.* 2012] und somit eine mögliche Erklärung für die erhöhte Toleranz von mCu60 Mutanten gegen Redox-reaktive metallische Kupferoberflächen liefert.

Die MRSA mCu60 Mutante wies im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, eine Membranzusammensetzung mit einem prozentual höheren Anteil an kurzkettigen FS auf. Kurzkettige FS führen zu einer erhöhten Membranfluidität. Die Membranzusammensetzung deutet auf eine geringere Anzahl an möglichen Targets für Kupfer-Angriffe hin. So kann die erhöhte Membranfluidität der Membranversteifung, welche mit der Reaktion von gelöstem Kupfer und Phospholipiden einhergeht [Prudent *et al.* 2010], entgegenwirken und somit ein weiterer Mechanismus gegen die Kupfer-abhängige Inaktivierung sein. Zudem zeigten die mCu60 Mutante nach Kupferexposition eine geringere Menge an Membrangebundenem Kupfer im Vergleich zum Wildtypen, was die Annahme weiter bekräftigt, dass die Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung in der Membran bei den Mutanten zu einer geringeren Affinität zu Kupfer und damit zu reduzierten Membranschäden führt. Auch LIVE/DEAD Aufnahmen bestätigten, dass Wildtyp-Zellen innerhalb von 15 Minuten ruptieren, während mCu60 Mutanten ihre Zellintegrität erhalten können. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Veränderung der FS-Komposition in den mCu60 Mutante eine Antwort auf Kupfer-Stress ist.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Innerhalb der ersten Sekunden nach dem Kontakt mit metallischem Kupfer nimmt die Zelle massiv Kupfer-Ionen auf [Espirito Santo *et al.* 2011; Espirito Santo *et al.* 2012b; Quaranta *et al.* 2011]. Bisher wurden solche Untersuchungen nur für die Dauer der Inaktivierung durchgeführt. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass bei *E. coli* Wildtyp die Aufnahme von Kupfer mit dem Zelltod noch nicht beendet war (Abbildung 21), sondern weiter Kupfer akkumuliert und erst mit dem Verlust der Zellintegrität (Abbildung 22) gestoppt wird. Beide Phänotypen akkumulierten in der Zelle innerhalb der ersten 5 Minuten die gleiche Menge an Kupfer. Trotz der gleichen Menge an Kupfer in den Zellen war die Mutante im Vergleich zum Wildtyp noch lebensfähig. Folglich kann die Akkumulation von Kupfer in den ersten Minuten nicht der alleinige Grund für die Inaktivierung sein.

4.3.3 Genom- und Transkriptom-Analysen zur Kupfer-Toleranz

Die Mutationen in den *E. coli* Wildtyp und mCu60 Genomen deuteten nicht auf spezifische Mutationen hin, die direkt auf die Toleranz gegenüber massivem Kupfer schließen könnten. Die einzige Mutation war die Insertion des IS2-Elements in das *ycbX* Gen, was zu einem Funktionsverlust dieses Gens führte. Diese Mutation wurde im Hinblick auf das Überleben des *Contact Killings* mit Hilfe einer $\Delta ycbX$ Mutante untersucht (Abbildung 25). Es zeigte sich jedoch, dass die Mutation im Gen *ycbX* und damit der Funktionsverlust nicht der Grund für das Überleben der Bakterien auf metallischem Kupfer war. Um zu untersuchen, ob die Insertion des IS2-Elements zur Toleranz gegenüber metallischem Kupfer geführt haben könnte, wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass das Gen *ycbY* welches upstream von *ycbX* liegt, durch die Insertion von IS2 hochreguliert wurde (Tabelle 19). YcbY (Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K/L, RlmKL) in *E. coli* kodiert für eine Methyltransferase [Lesnyak *et al.* 2006] und ist vermutlich an der Methylierung von Guanin zu N2-Methylguanin (m2G) bzw. 7-Methylguanin (m7G) beteiligt [Sergiev *et al.* 2007; Wang *et al.* 2012]. Es ist zu vermuten, dass die Methyltransferase YcbY die DNA durch Methylierung vor Abbau schützen

oder zur Fehlerkorrektur bei der DNA-Synthese führen und somit zur Toleranz gegenüber Kupfer beitragen kann.

Zusätzlich zu der unzureichenden Annotierung und Funktionsbeschreibung der MRSA-Gene war die Interpretation der gewonnenen Daten nahezu ergebnislos. Lediglich eine Mutation im hypothetischen Gen SA1388 konnte bestimmt werden. Dieses Gen gehört laut Conserved Domain Database [Marchler-Bauer *et al.* 2013] zur *ybgL* Familie. Charakteristisch für die YbgL Proteinfamilie sind di-nukleare Metall-Zentren mit bisher unbekannt Funktionen in MRSA. Untersuchungen eines Vertreters aus *E. coli* zeigten, dass das Protein, möglicherweise mit DNA interagieren kann [Ladner *et al.* 2003]. Ob dies auch MRSA gilt, bleibt jedoch unbeantwortet.

Der Vergleich der genetischen Unterschiede in den Mutanten von *E. coli* und MRSA zeigten keine Veränderungen, die die Resistenz gegenüber ionischem Kupfer beeinflussen [Baker *et al.* 2011; Fan *et al.* 2001; Grass *et al.* 2001]. Dieses Ergebnis zeigt nochmals eindrucksvoll den enormen Unterschied zwischen der Toleranz gegenüber metallischem Kupfer und der Resistenz gegen Kupferionen.

4.4 Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lässt sich erkennen, dass zwar keine Mutationen im Genom zur Kupfer-Toleranz führen, es aber zu massiven Veränderungen in der Membran kommt. Um diese Veränderungen zu charakterisieren und zu typisieren, sollten weitere Untersuchungen zur Lipid- und Protein-Oxidation durchgeführt werden. Dabei sollte die Bestimmung der Haupt-Proteine und -Lipide, die durch metallisches Kupfer angegriffen werden, ein primäres Ziel sein.

Kupferionen-Resistenzen sind gut untersucht, wobei bereits verschiedene Mechanismen wie die Umwandlung des toxischeren Cu(I) zu Cu(II) und die Ausschleusung durch verschiedene Transportsysteme charakterisiert wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kupferionen-Resistenz nicht mit der Kupfer-Toleranz gleichzusetzen ist. Daher

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

sollte die Bestimmung und Charakterisierung der Kupfer-Toleranz-Mechanismen ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt sein.

Basierend auf den hier erzielten Ergebnissen zur Kupfer-Toleranz sollten Kupferoberflächen nicht „blind“ eingesetzt werden. Die Bildung von Toleranzen stellt ein mögliches Risiko in der Anwendung von metallischen Kupferoberflächen dar.

5 Zusammenfassung

Kupferoberflächen inaktivieren eine Vielzahl von Bakterien, Viren und Pilzen in einem Prozess, der als *Contact Killing* bezeichnet wird. Vor dieser Arbeit wurde noch nicht untersucht, ob massive metallische Kupferflächen ebenfalls gegen hochpathogene virale und bakterielle Erreger wirksam sind. Untersuchungen zur Effizienz und Wirkungsweise von Kupferoberflächen gegen solche Erreger war ein Ziel dieser Arbeit. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob Bakterien, ähnlich wie bei der Evolution von Antibiotikaresistenzen, auch bei wiederholtem subletalem Kontakt mit Kupferoberflächen Toleranz gegenüber dem *Contact Killing* entwickeln können. Daher wurde als zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit, die spezifischen Toleranz-Entwicklung gegenüber metallischen Kupferflächen in Modellbakterien durch Mutantencharakterisierung untersucht. Insgesamt konnten folgende Schlussfolgerungen erzielt werden:

1. Verschiedene hochpathogene Bakterien, nicht aber Endosporen von *B. anthracis*, werden innerhalb von 5 Minuten auf massiven Kupferoberflächen durch *Contact Killing* abgetötet.
2. Orthopockenviren werden innerhalb von 10 Minuten auf Kupferflächen vollständig inaktiviert.
3. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit ist abhängig von morphologischen Eigenschaften. Stäbchenförmige Bakterien bieten massiven Kupferoberflächen eine größere Angriffsfläche als kokkoide Bakterien und erliegen dem *Contact Killing* dadurch schneller. Durch die dickere Peptidoglykanschicht benötigen Gram-positive Bakterien länger zur vollständigen Inaktivierung.
4. Die Kupferflächen-vermittelte Inaktivierung führt nicht zu dem scheinbaren VBNC Status.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

5. Bakterien können eine Toleranz gegenüber metallischen Kupferoberflächen entwickeln. Kupferflächen-tolerante Erreger sind jedoch nicht gegen Kupferionen resistenter als der Wild-Typ.
6. Die Bindung von gelöstem Kupfer an die Membran führt in Wildtypzellen zu Membranschäden sowie zum Verlust der Zellintegrität. Die Zellmembranen Kupfer-toleranter Mutanten weisen eine leicht veränderte Fettsäurekomposition auf, die vermutlich Membranschäden verringert.
7. Kupfer-tolerante Mutanten akkumulieren weniger Kupfer in der Zelle als der Wild-Typ.
8. Die Toleranz von Bakterien gegenüber massiven Kupferoberflächen führt zu wenigen Änderungen im Genom, und die Expression stressinduzierter Gene in Kupfer-toleranten Mutanten steigt.

6 Referenzen

1. Aarestrup FM, Hasman H. (2004) Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary microbiology*.100(1-2):83-9.
2. Aarestrup FM, Hasman H, Jensen LB, Moreno M, Herrero IA, Dominguez L, Finn M, Franklin A. (2002) Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Applied and environmental microbiology*.68(8):4127-9.
3. Agga GE, Scott HM, Amachawadi RG, Nagaraja TG, Vinasco J, Bai J, Norby B, Renter DG, Dritz SS, Nelssen JL, Tokach MD. (2014) Effects of chlortetracycline and copper supplementation on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from weaned pigs. *Preventive veterinary medicine*.
4. Alexander E, Pham D, Steck TR. (1999) The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and environmental microbiology*.65(8):3754-6.
5. Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. (2008) Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in microbiology*.159(9-10):709-17.
6. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*.2:2006 0008.
7. Baker J, Sengupta M, Jayaswal RK, Morrissey JA. (2011) The *Staphylococcus aureus* CsoR regulates both chromosomal and plasmid-encoded copper resistance mechanisms. *Environmental microbiology*.13(9):2495-507.
8. Besemer J, Molzberger C. (1977) Transcription of insertion elements IS1 and IS2 in vitro. *Molecular & general genetics* : MGG.153(1):51-60.
9. Besnard V, Federighi M, Declerq E, Jugiau F, Cappelier JM. (2002) Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary research*.33(4):359-70.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

10. Bishop RE, Leskiw BK, Hodges RS, Kay CM, Weiner JH. (1998) The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *Journal of molecular biology*.280(4):583-96.
11. Blom J, Jakobi T, Doppmeier D, Jaenicke S, Kalinowski J, Stoye J, Goesmann A. (2011) Exact and complete short-read alignment to microbial genomes using Graphics Processing Unit programming. *Bioinformatics*.27(10):1351-8.
12. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.48(1):1-12.
13. Breasted JH. (1930) *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. The University of Chicago Press.
14. Cappelier JM, Besnard V, Roche SM, Velge P, Federighi M. (2007) Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Veterinary research*.38(4):573-83.
15. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry*.69(23):4751-60.
16. Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, Miruszenko L, Shillam R, Christian P, Elliott TS. (2010) Role of copper in reducing hospital environment contamination. *The Journal of hospital infection*.74(1):72-7.
17. CDC. <http://www.cdc.gov/24-7/CDCFastFacts/laboratories.html>.
18. Chowell G, Nishiura H. (2015) Characterizing the transmission dynamics and control of ebola virus disease. *PLoS biology*.13(1):e1002057.
19. Conrad TM, Joyce AR, Applebee MK, Barrett CL, Xie B, Gao Y, Palsson BO. (2009) Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations. *Genome biology*.10(10):R118.
20. Cook KL, Bolster CH. (2007) Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of applied microbiology*.103(3):573-83.

REFERENZEN

21. Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. (1987) The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*.22(5):299-304.
22. Cox MM, Keck JL, Battista JR. (2010) Rising from the Ashes: DNA Repair in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS genetics*.6(1):e1000815.
23. de Carvalho CC, Caramujo MJ. (2014) Bacterial diversity assessed by cultivation-based techniques shows predominance of *Staphylococcus* species on coins collected in Lisbon and Casablanca. *FEMS microbiology ecology*.88(1):26-37.
24. del Castillo I, Vizan JL, Rodriguez-Sainz MC, Moreno F. (1991) An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin A1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.88(19):8860-4.
25. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.99(1):443-8.
26. Dollwet HH, Sorenson JR. (1985) Historic uses of copper compounds in medicine. *trace Elem Med*.2:80-7.
27. Elguindi J, Moffitt S, Hasman H, Andrade C, Raghavan S, Rensing C. (2010) Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper ion-resistant bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*.89(6):1963-70.
28. Elguindi J, Wagner J, Rensing C. (2009) Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces. *Journal of applied microbiology*.106(5):1448-55.
29. Emmart EW. (1949) *The Badanius Manuscript (Codex Barberini, Latin 241)*. The Johns Hopkins Press, Baltimore.
30. EPA. <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm>.
31. Espirito Santo C, German N, Elguindi J, Grass G, Rensing C. Biocidal Mechanisms of Metallic Copper Surfaces. In: Borkow G, editor. *Use of Biocida Surfaces for Reduction of Healthcare Aquired Infections*2014. p. 103-36.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

32. Espirito Santo C, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. (2011) Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Applied and environmental microbiology*.77(3):794-802.
33. Espirito Santo C, Lin Y, Hao X, Wei G, Rensing C, Grass G. (2012a) Draft genome sequence of *Pseudomonas psychrotolerans* L19, isolated from copper alloy coins. *Journal of bacteriology*.194(6):1623-4.
34. Espirito Santo C, Morais PV, Grass G. (2010) Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Applied and environmental microbiology*.76(5):1341-8.
35. Espirito Santo C, Quaranta D, Grass G. (2012b) Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *MicrobiologyOpen*.1(1):46-52.
36. Espirito Santo C, Taudte N, Nies DH, Grass G. (2008) Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Applied and environmental microbiology*.74(4):977-86.
37. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. (2010) Zoonotic poxviruses. *Veterinary microbiology*.140(3-4):229-36.
38. Fan B, Grass G, Rensing C, Rosen BP. (2001) *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochemical and biophysical research communications*.286(2):414-8.
39. Faundez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. (2004) Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC microbiology*.4:19.
40. Fleming A. (1944) Penicillin in Venereal Diseases-1. *The British journal of venereal diseases*.20(4):133-6.
41. Fong SS, Joyce AR, Palsson BO. (2005) Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. *Genome research*.15(10):1365-72.
42. Foster TJ. (1983) Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiological reviews*.47(3):361-409.
43. Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. (2003) Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*.185(13):3804-12.
44. Fridman O, Goldberg A, Ronin I, Shores N, Balaban NQ. (2014) Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*.513:418-21.

REFERENZEN

45. Gastmeier P, Brunkhorst F, Schrappe M, Kern W, Geffers C. (2010) Wie viele nosokomiale Infektionen sind vermeidbar? [How many nosocomial infections are avoidable?]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*.135(3):91-3.
46. Ghezzi JI, Steck TR. (1999) Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris pv. campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS microbiology ecology*.30(3):203-8.
47. Ghosh A, Singh A, Ramteke PW, Singh VP. (2000) Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochemical and biophysical research communications*.272(1):6-11.
48. Grass G, Rensing C. (2001) CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*.286(5):902-8.
49. Grass G, Rensing C, Solioz M. (2011) Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and environmental microbiology*.77(5):1541-7.
50. Grey B, Steck TR. (2001) Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Applied and environmental microbiology*.67(11):5325-7.
51. Grosse C, Schleuder G, Schmole C, Nies DH. (2014) Survival of *Escherichia coli* cells on solid copper surfaces is increased by glutathione. *Applied and environmental microbiology*.80(22):7071-8.
52. Halliwell B, Gutteridge JM. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*.219(1):1-14.
53. Hasman H, Aarestrup FM. (2002) *TcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.46(5):1410-6.
54. Hasman H, Aarestrup FM. (2005) Relationship between copper, glycopeptide, and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.49(1):454-6.
55. Hasman H, Kempf I, Chidaine B, Cariolet R, Ersboll AK, Houe H, Bruun Hansen HC, Aarestrup FM. (2006) Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. *Applied and environmental microbiology*.72(9):5784-9.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

56. Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H, Horiuchi T. (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular systems biology*.2:2006 0007.
57. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*.8(1):11-22.
58. Henderson DA. (1999) Smallpox: clinical and epidemiologic features. *Emerging infectious diseases*.5(4):537-9.
59. Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Jahrling PB, Hauer J, Layton M, McDade J, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl T, Russell PK, Tonat K. (1999) Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA : the journal of the American Medical Association*.281(22):2127-37.
60. Herring CD, Raghunathan A, Honisch C, Patel T, Applebee MK, Joyce AR, Albert TJ, Blattner FR, van den Boom D, Cantor CR, Palsson BO. (2006) Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. *Nature genetics*.38(12):1406-12.
61. Hilker R, Stadermann KB, Doppmeier D, Kalinowski J, Stoye J, Straube J, Winnebald J, Goesmann A. (2014) ReadXplorer--visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinformatics*.30(16):2247-54.
62. Hong R, Kang TY, Michels CA, Gadura N. (2012) Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*.78(6):1776-84.
63. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. (1992) CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*.13(10):606-8.
64. Horie M, Ogawa H, Yoshida Y, Yamada K, Hara A, Ozawa K, Matsuda S, Mizota C, Tani M, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. (2008) Inactivation and morphological changes of avian influenza virus by copper ions. *Archives of virology*.153(8):1467-72.

REFERENZEN

65. Huhn GD, Bauer AM, Yorita K, Graham MB, Sejvar J, Likos A, Damon IK, Reynolds MG, Kuehnert MJ. (2005) Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.41(12):1742-51.
66. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. (2005) DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.49(11):4681-8.
67. Kalita M, Palusinska-Szys M, Turska-Szewczuk A, Wdowiak-Wrobel S, Urbanik-Sypniewska T. (2013) Isolation of cultivable microorganisms from Polish notes and coins. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists*.62(3):281-6.
68. Karlin KD. (1993) Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science*.261(5122):701-8.
69. Kim J, Lee S, Choi S. (2012) Copper resistance and its relationship to erythromycin resistance in *Enterococcus* isolates from bovine milk samples in Korea. *Journal of microbiology*.50(3):540-3.
70. Kirby WM. (1944) Extraction of a highly potent Penicillin inactivator from Penicillin resistant *Staphylococci*. *Science*.99(2579):452-3.
71. Kozmin SG, Leroy P, Pavlov YI, Schaaper RM. (2008) YcbX and yiiM, two novel determinants for resistance of *Escherichia coli* to N-hydroxylated base analogues. *Molecular microbiology*.68(1):51-65.
72. Kugelman JR, Johnston SC, Mulembakani PM, Kusalu N, Lee MS, Koroleva G, McCarthy SE, Gestole MC, Wolfe ND, Fair JN, Schneider BS, Wright LL, Huggins J, Whitehouse CA, Wemakoy EO, Muyembe-Tamfum JJ, Hensley LE, Palacios GF, Rimoin AW. (2014) Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerging infectious diseases*.20(2):232-9.
73. Kuhn PJ. (1983) Doornobs: a source of nosocomial infection? *Diagnostic Medicine*.62-3.
74. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*.357(9264):1225-40.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

75. Ladner JE, Obmolova G, Teplyakov A, Howard AJ, Khil PP, Camerini-Otero RD, Gilliland GL. (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* protein YbgL, a toroidal structure with a dinuclear metal site. *BMC structural biology*.3:7.
76. Larimer C, Islam MS, Ojha A, Nettleship I. (2014) Mutation of environmental mycobacteria to resist silver nanoparticles also confers resistance to a common antibiotic. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*.27(4):695-702.
77. Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, Garcia E, Halltorp G, Johansson D, Isherwood KE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Prior R, Malfatti S, Sjostedt A, Svensson K, Thompson N, Vergez L, Wagg JK, Wren BW, Lindler LE, Andersson SG, Forsman M, Titball RW. (2005) The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nature genetics*.37(2):153-9.
78. Lesnyak DV, Sergiev PV, Bogdanov AA, Dontsova OA. (2006) Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. the *ycbY* gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA. *Journal of molecular biology*.364(1):20-5.
79. Li J, Dennehy JJ. (2011) Differential bacteriophage mortality on exposure to copper. *Applied and environmental microbiology*.77(19):6878-83.
80. Li XZ, Nikaido H, Williams KE. (1997) Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *Journal of bacteriology*.179(19):6127-32.
81. Liochev SI, Fridovich I. (2002) Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂. *The Journal of biological chemistry*.277(38):34674-8.
82. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*.193(1):265-75.
83. Macomber L, Rensing C, Imlay JA. (2007) Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*.189(5):1616-26.
84. Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH. (2013) CDD:

REFERENZEN

- conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic acids research*.41(Database issue):D348-52.
85. Mathews S, Hans M, Mucklich F, Solioz M. (2013) Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions. *Applied and environmental microbiology*.79(8):2605-11.
 86. McFarland J. (1907) Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Am Med Ass*.14:1176-78.
 87. McLean RJ, Hussain AA, Sayer M, Vincent PJ, Hughes DJ, Smith TJ. (1993) Antibacterial activity of multilayer silver-copper surface films on catheter material. *Canadian journal of microbiology*.39(9):895-9.
 88. Mehtar S, Wiid I, Todorov SD. (2008) The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *The Journal of hospital infection*.68(1):45-51.
 89. Michels HT, Noyce JO, Keevil CW. (2009) Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Letters in applied microbiology*.49(2):191-5.
 90. Mikolay A, Huggett S, Tikana L, Grass G, Braun J, Nies DH. (2010) Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Applied microbiology and biotechnology*.87(5):1875-9.
 91. Molteni C, Abicht HK, Solioz M. (2010) Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. *Applied and environmental microbiology*.76(12):4099-101.
 92. Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT, Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L, Fraser CM. (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.101(39):14246-51.
 93. Novick RP, Roth C. (1968) Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*.95(4):1335-42.
 94. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. (2006a) Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

Staphylococcus aureus in the healthcare environment. The Journal of hospital infection.63(3):289-97.

95. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. (2006b) Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing. Applied and environmental microbiology.72(6):4239-44.
96. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. (2007) Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. Applied and environmental microbiology.73(8):2748-50.
97. Oliver JD. (1995) The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. FEMS microbiology letters.133(3):203-8.
98. Oliver JD. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS microbiology reviews.34(4):415-25.
99. Osman D, Waldron KJ, Denton H, Taylor CM, Grant AJ, Mastroeni P, Robinson NJ, Cavet JS. (2010) Copper homeostasis in Salmonella is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. The Journal of biological chemistry.285(33):25259-68.
100. Outten CE, O'Halloran TV. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. Science.292(5526):2488-92.
101. Oyola SO, Evans KJ, Smith TK, Smith BA, Hilley JD, Mottram JC, Kaye PM, Smith DF. (2012) Functional analysis of Leishmania cyclopropane fatty acid synthetase. PloS one.7(12):e51300.
102. Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeno-Tarraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature.413(6855):523-7.
103. Patel R. (2015) MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clinical chemistry.61(1):100-11.
104. Pradenas GA, Paillavil BA, Reyes-Cerpa S, Perez-Donoso JM, Vasquez CC. (2012) Reduction of the monounsaturated fatty acid content of *Escherichia coli* results in increased resistance to oxidative damage. Microbiology.158(Pt 5):1279-83.
105. Prudent M, Mendez MA, Jana DF, Corminboeuf C, Girault HH. (2010) Formation and study of single metal ion-phospholipid complexes in

- biphasic electrospray ionization mass spectrometry. *Metallomics : integrated biometal science*.2(6):400-6.
106. Quaranta D, Krans T, Espirito Santo C, Elowsky CG, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. (2011) Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Applied and environmental microbiology*.77(2):416-26.
 107. Raimunda D, Gonzalez-Guerrero M, Leeber BW, 3rd, Arguello JM. (2011) The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*.24(3):467-75.
 108. Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP. (2000) CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.97(2):652-6.
 109. Resende JA, Silva VL, Fontes CO, Souza-Filho JA, Rocha de Oliveira TL, Coelho CM, Cesar DE, Diniz CG. (2012) Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. *Microbes and environments / JSME*.27(4):449-55.
 110. Roberts SA, Weichsel A, Grass G, Thakali K, Hazzard JT, Tollin G, Rensing C, Montfort WR. (2002) Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.99(5):2766-71.
 111. Ruiz N, Montero T, Hernandez-Borrell J, Vinas M. (2003) The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. *Microbial drug resistance*.9(3):257-64.
 112. Saedler H, Heiss B. (1973) Multiple copies of the insertion-DNA sequences IS1 and IS2 in the chromosome of *E. coli* K-12. *Molecular & general genetics : MGG*.122(3):267-77.
 113. Saedler H, Reif HJ, Hu S, Davidson N. (1974) IS2, a genetic element for turn-off and turn-on of gene activity in *E. coli*. *Molecular & general genetics : MGG*.132(4):265-89.
 114. Sagripanti JL, Routson LB, Bonifacino AC, Lytle CD. (1997) Mechanism of copper-mediated inactivation of herpes simplex virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.41(4):812-7.
 115. Sahl JW, Stone JK, Gelhaus HC, Warren RL, Cruttwell CJ, Funnell SG, Keim P, Tuanyok A. (2013) Genome Sequence of *Burkholderia pseudomallei* NCTC 13392. *Genome announcements*.1(3).

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

116. Sakoulas G, Moellering RC, Jr. (2008) Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.46 Suppl 5:S360-7.
117. Salgado CD, Sepkowitz KA, John JF, Cantey JR, Attaway HH, Freeman KD, Sharpe PA, Michels HT, Schmidt MG. (2013) Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*.34(5):479-86.
118. Salma M, Rousseaux S, Sequeira-Le Grand A, Divol B, Alexandre H. (2013) Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*.8(10):e77600.
119. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.74(12):5463-7.
120. Schmidt MG, Attaway HH, Sharpe PA, John J, Jr., Sepkowitz KA, Morgan A, Fairey SE, Singh S, Steed LL, Cantey JR, Freeman KD, Michels HT, Salgado CD. (2012) Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *Journal of clinical microbiology*.50(7):2217-23.
121. Sergiev PV, Bogdanov AA, Dontsova OA. (2007) Ribosomal RNA guanine-(N2)-methyltransferases and their targets. *Nucleic acids research*.35(7):2295-301.
122. Silver S. (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene*.179(1):9-19.
123. Singh SK, Grass G, Rensing C, Montfort WR. (2004) Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*.186(22):7815-7.
124. Solioz M, Odermatt A. (1995) Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *The Journal of biological chemistry*.270(16):9217-21.
125. Solioz M, Stoyanov JV. (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS microbiology reviews*.27(2-3):183-95.
126. Stoyanov JV, Hobman JL, Brown NL. (2001) CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular microbiology*.39(2):502-11.
127. Tadolini B, Fiorentini D, Landi L, Cabrini L. (1989) Lipid peroxidation. Definition of experimental conditions for selective study of the

- propagation and termination phases. Free radical research communications.5(4-5):245-52.
128. Thieme D, Neubauer P, Nies DH, Grass G. (2008) Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions. Applied and environmental microbiology.74(24):7463-70.
 129. Tikhomirov E. (1987) WHO programme for the control of hospital infections. Chemioterapia : international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy.6(3):148-51.
 130. VECTOR. <http://www.vector.nsc.ru>.
 131. Wang KT, Desmolaize B, Nan J, Zhang XW, Li LF, Douthwaite S, Su XD. (2012) Structure of the bifunctional methyltransferase YcbY (RlmKL) that adds the m7G2069 and m2G2445 modifications in *Escherichia coli* 23S rRNA. Nucleic acids research.40(11):5138-48.
 132. Warnes SL, Caves V, Keevil CW. (2012) Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. Environmental microbiology.14(7):1730-43.
 133. Warnes SL, Green SM, Michels HT, Keevil CW. (2010) Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs. Applied and environmental microbiology.76(16):5390-401.
 134. Warnes SL, Keevil CW. (2013) Inactivation of norovirus on dry copper alloy surfaces. PloS one.8(9):e75017.
 135. Warnes SL, Summersgill EN, Keevil CW. (2014) Inactivation of murine norovirus on a range of copper alloy surfaces is accompanied by loss of capsid integrity. Applied and environmental microbiology.81(3):1085-91.
 136. Weaver L, Michels HT, Keevil CW. (2008) Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. The Journal of hospital infection.68(2):145-51.
 137. Weaver L, Michels HT, Keevil CW. (2010a) Potential for preventing spread of fungi in air-conditioning systems constructed using copper instead of aluminium. Letters in applied microbiology.50(1):18-23.
 138. Weaver L, Noyce JO, Michels HT, Keevil CW. (2010b) Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of applied microbiology.109(6):2200-5.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

139. Wheeldon LJ, Worthington T, Lambert PA, Hilton AC, Lowden CJ, Elliott TS. (2008) Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. The Journal of antimicrobial chemotherapy.62(3):522-5.
140. Wilks SA, Michels H, Keevil CW. (2005) The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. International journal of food microbiology.105(3):445-54.
141. Wilks SA, Michels HT, Keevil CW. (2006) Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. International journal of food microbiology.111(2):93-8.
142. Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbial ecology.8(4):313-23.
143. Zhu L, Elguindi J, Rensing C, Ravishankar S. (2012) Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. Food microbiology.30(1):303-10.

I. Anhang

I.I Metallzusammensetzung in *E. coli* mCu60 und Wildtyp

Die Menge an gemessenem Magnesium betrug zum Zeitpunkt 0 im Wildtyp $7,4 \pm 0,9 \times 10^6$ Magnesium-Atome / Zelle (Abbildung 35 A) und in der mCu60 Mutante $8,3 \pm 1,2 \times 10^6$ Magnesium-Atome / Zelle (Abbildung 35 A). Die Menge an Magnesium nahm in beiden Phänotypen über die Zeit ab und erreichte ab 30 Minuten Inkubation die niedrigsten Werte (Wildtyp $5,2 \pm 4,0 \times 10^5$ Magnesium-Atome / Zelle und in der mCu60 Mutante $1,0 \pm 1,0 \times 10^6$ Magnesium-Atome / Zelle). Die Reduktion der Magnesium-Atome in den mCu60 Zellen reduzierte sich etwas langsamer als in den Wildtyp-Zellen. Wurde die Erreger nun auf massiven Kupferoberflächen inkubiert, reduzierte sich die Menge an Magnesium innerhalb der ersten 30 Sekunden (Wildtyp $1,6 \pm 0,4 \times 10^6$ Magnesium-Atome / Zelle und in der mCu60 Mutante $1,5 \pm 1,0 \times 10^6$ Magnesium-Atome / Zelle) bei beiden Phänotypen unter den Ausgangswert (Abbildung 35 B). Nach 30 Minuten Inkubation sank die Menge an Magnesium-Atomen in den Wildtyp-Zellen auf nahe 0 und in der Mutante auf $3,4 \pm 3,0 \times 10^5$ Magnesium-Atome / Zelle) (Abbildung 35 B).

Die Ausgangsmenge an Eisen betrug in den Wildtyp-Zellen $2,7 \pm 0,2 \times 10^5$ und bei den mCu60 Mutanten $2,8 \pm 0,1 \times 10^5$ Eisen-Atome / Zelle und blieb selbst nach 60 Minuten Inkubation auf Edelstahl ähnlich hoch (Abbildung 35 C). Die Ausnahme bildete der Messpunkt mCu60/SS 30 Sekunden, welcher mit $1,8 \pm 1,8 \times 10^6$ Eisen-Atome / Zelle zum einen sehr hoch war und zum anderen eine extreme Standardabweichung aufwies (Abbildung 35 C). Hier trat vermutlich ein Messfehler auf. Wurden die Zellen auf massivem Kupfer inkubiert, betrug die Menge an Eisen-Atomen über die Zeit in den Wildtyp- als auch Mutanten-Zellen ähnliche Werte. Die Werte waren bei dem Wildtyp $2,2 \pm 0,5 \times 10^5$ und bei der mCu60 Mutante $2,3 \pm 0,2 \times 10^5$ Eisen-Atome / Zelle (Abbildung 35 D).

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

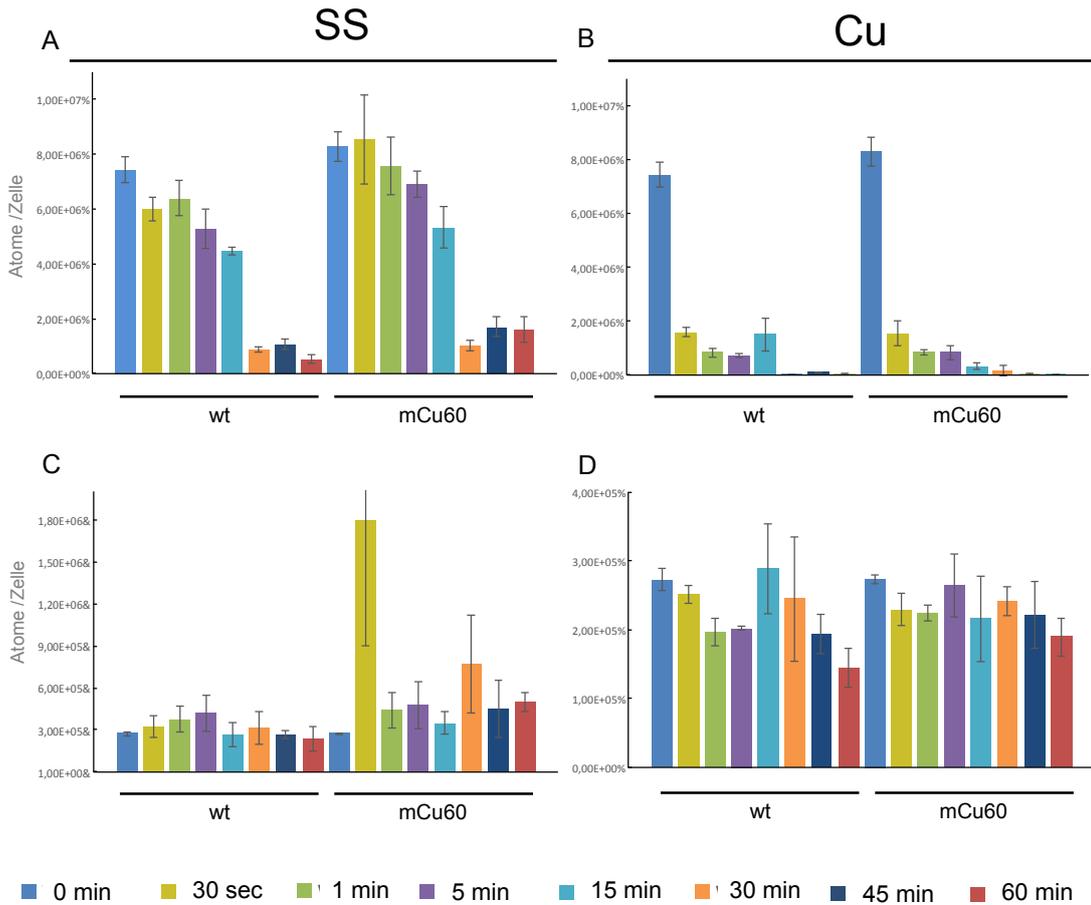


Abbildung 35: ICP-MS Analysen zur Magnesium- und Eisen- Konzentration in *E. coli* Wt und mCu60 Zellen.

Die Kupfer-tolerante *E. coli* mCu60 Mutante, sowie der Wildtyp-Stamm wurden für unterschiedliche Zeitpunkte auf massiven Kupfer- (Cu) oder Edelstahl- (SS)-Oberflächen inkubiert, abgespült und gewaschen. Der Metall-Gehalt der Zellen wurde aus mineralisierten Proben durch ICP-MS Analyse in Metall-Atomen/Zelle bestimmt. Dabei wurde die Menge an Magnesium (A und B) und Eisen (C und D) gemessen.

Zink ist, wie Magnesium und Eisen, ein essentielles Spurenelement und Bestandteil von verschiedenen Enzymen wie Proteasen, DNA- und RNA-Polymerasen oder DNA-bindenden Proteinen. Damit ist es für das Zellwachstum essentiell. Eine Veränderung der Zink-Aufnahme und -Verarbeitung in den Zellen, verursacht durch die Kupfer-Toleranz, wäre möglich und wurde deshalb im Folgenden untersucht.

Der Ausgangswert der zellulären Zinkkonzentration betrug in den Wildtyp-Zellen $8,8 \pm 0,5 \times 10^5$ und in denen der mCu60 Mutante $9,1 \pm 0,5 \times 10^5$ Zink-Atome / Zelle. Wurden die Bakterien auf Edelstahl inkubiert, so blieb die

Menge an Zink-Atomen in den mCu60 Zellen relativ konstant ($7,2 \times 10^5 \pm 7200$ Eisen-Atome / Zelle). Beim Wildtyp schwanken die Werte erst ab dem Zeitpunkt 30 Minuten auf Edelstahl. Der Wert fiel zunächst auf $4,1 \pm 1,6 \times 10^4$ Zink-Atome / Zelle, stieg dann auf einen ähnlichen Wert wie < 30 Minuten ($7,6 \pm 0,3 \times 10^4$ Zink-Atome / Zelle) und sank erneut bei 60 Minuten auf $3,0 \pm 0,3 \times 10^4$ Zink-Atome / Zelle (Abbildung 36 A). Durch Inkubation auf Kupfer wurde die Zink Menge in beiden Zelltypen konstant reduziert (Abbildung 36 B). Der Minimal-Wert beträgt nach 30 Minuten bei dem Wildtyp $6,9 \pm 1,9 \times 10^3$ und bei der Mutante $1,1 \times 10^4 \pm 2857$ Zink-Atome / Zelle. Dabei war auffallend, dass der Zink-Messwert in den mCu60 Zellen etwas höher als im Wildtyp lag.

Die Menge an Mangan in den untersuchten Zellen betrug beim Wildtypen $3,7 \pm 0,3 \times 10^4$ und bei der Mutante $3,9 \pm 0,5 \times 10^4$ Mangan-Atome / Zelle (Abbildung 36 C). Nach dem Auftragen auf Edelstahl blieb die Menge an Mangan-Atomen beim Wildtyp konstant ($3,5 \pm 0,1 \times 10^4$ Mangan-Atome / Zelle) und nahm nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten auf $1,9 \pm 0,7 \times 10^4$ Mangan-Atome / Zelle ab (Abbildung 36 D). Bei der mCu60 Mutante stieg die Menge an Mangan innerhalb der ersten 30 Sekunden auf $6,7 \pm 1,2 \times 10^4$ Mangan-Atome / Zelle an, sank jedoch innerhalb von 60 Minuten Inkubationszeit auf $2,4 \pm 0,2 \times 10^4$ Mangan-Atome / Zelle ab (Abbildung 36 C).

Sobald die Zellen auf Kupfer inkubiert worden waren, reduzierte sich die Menge an Mangan-Atomen in beiden Genotypen auf $< 2,0 \times 10^4$, und nach 30 Minuten sank in beiden Genotypen die Mangan-Menge auf $< 1,0 \times 10^4$ Mangan-Atome / Zelle (Abbildung 36 D).

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

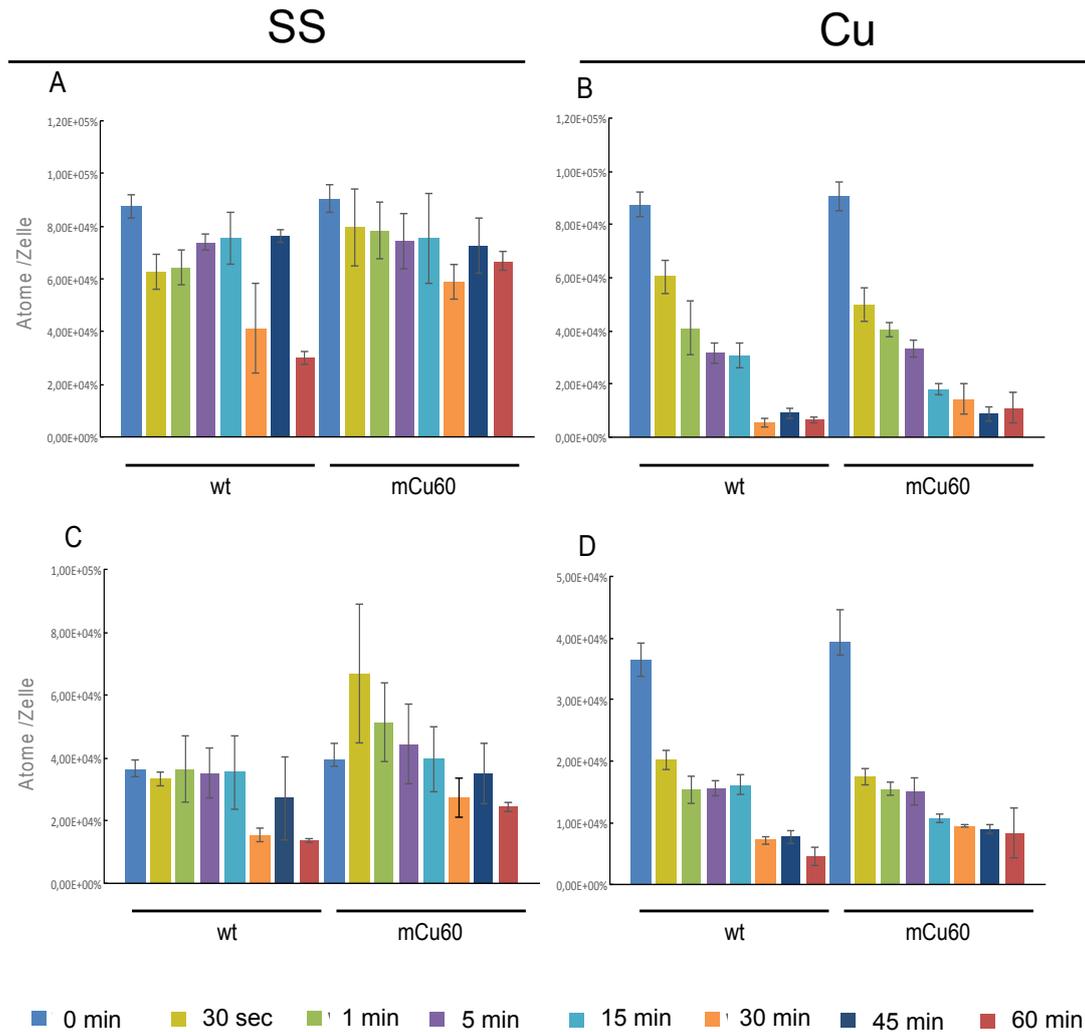


Abbildung 36: ICP-MS Analysen zur Zink- und Mangan- Konzentration in *E. coli* Wt und mCu60 Zellen.

Die Kupfer-tolerante *E. coli* mCu60 Mutante, sowie der Wildtyp-Stamm wurden für unterschiedliche Zeitpunkte auf massiven Kupfer- (Cu) oder Edelstahl- (SS)-Oberflächen inkubiert, abgespült und gewaschen. Der Metall-Gehalt der Zellen wurde aus mineralisierten Proben durch ICP-MS Analyse in Metall-Atomen/Zelle bestimmt. Dabei wurde die Menge an Zink (A und B) und Mangan (C und D) gemessen.

I.II Mutationsanalysen der mCu60 Mutanten und Wildtypen

I.II.I *E. coli*

Tabelle 17: Mutationen im *E. coli* W3110 und *E. coli* W3110 mCu60 Genom im Vergleich zum *E. coli* W3110 Referenzstamm NC_007779.1.

Position	Ref.	wt				mCu60				Gen
		Type	SNP	Freq	Cov	Type	SNP	Freq	Cov	
547694	A	SNP	G	98	196	SNP	G	98,6	221	<i>ylbE</i>
547832	G	Ins	G	89,3	214	Ins	G	91,4	256	-
556858	A	SNP	T	97,5	204	SNP	T	95,7	232	<i>folD</i>
655405	T	SNP	G	73,9	23	SNP	G	79,3	29	-
655406	C	SNP	T	85	20	SNP	T	89,3	28	-
655407	C	SNP	G	95,5	22	SNP	G	96,3	27	-
987574	G	SNP	T	100	150	SNP	T	100	144	-
1093686	T	SNP	C	100	200	SNP	C	99,4	175	<i>ycdT</i>
1197797	C	SNP	T	100	101	SNP	T	97,9	97	<i>icd</i>
1197809	C	SNP	T	97,8	90	SNP	T	100	89	<i>icd</i>
1197822	T	SNP	C	100	86	SNP	C	100	89	<i>icd</i>
1197824	A	SNP	G	100	86	SNP	G	100	89	<i>icd</i>
1197854	C	SNP	T	98,4	64	SNP	T	98,6	69	<i>icd</i>
1197857	G	SNP	C	96,7	61	SNP	C	100	66	<i>icd</i>
1197860	A	SNP	G	100	59	SNP	G	100	66	<i>icd</i>
1197869	C	SNP	T	98,1	53	SNP	T	98,4	62	<i>icd</i>
1197881	G	SNP	A	100	51	SNP	A	100	59	<i>icd</i>
1197893	T	SNP	A	100	49	SNP	A	100	57	<i>icd</i>
1197902i1 ¹	A	SNP	G	100	45	SNP	G	100	55	<i>icd</i>
1197929	C	SNP	A	100	28	SNP	A	100	44	<i>icd</i>
1197960	T	SNP	G	100	11	SNP	G	100	14	-
1212971	C	SNP	T	100	15	SNP	T	96,3	27	-
1212972	G	SNP	T	100	15	SNP	T	96,3	27	-
1212976	T	SNP	C	100	17	SNP	C	90	30	-
1212977	A	SNP	T	100	17	SNP	T	96,8	31	-
1212978	G	SNP	C	100	21	SNP	C	97	33	-
1212981	A	SNP	C	92,3	26	SNP	C	97,3	37	-
1212982	T	SNP	G	92,6	27	SNP	G	91,9	37	-
1212985i1 ¹	A	Ins	G	89,3	28	Ins	G	80	45	-
1212986	A	SNP	G	92,9	28	SNP	G	91,5	47	-
1212987	C	SNP	A	92,9	28	SNP	A	95,7	47	-
1212989	A	SNP	G	92,9	28	SNP	G	95,7	47	-
1302358	G	SNP	A	78,8	33	SNP	A	72,4	29	<i>insD</i>
1519222	G	SNP	T	99,1	214	SNP	T	100	210	<i>ycdX</i>
1669599	C	Del	GAP	97,7	171	Del	GAP	98,9	267	<i>dgsA</i>
1979957	G	SNP	T	100	169	SNP	T	100	233	-
2005401	C	SNP	T	99,5	186	SNP	T	98,7	234	<i>fliC</i>

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

Position	Ref.	wt				mCu60				Gen
		Type	SNP	Freq	Cov	Type	SNP	Freq	Cov	
2176983i2 ¹	G	Ins	A	91,7	36	Ins	A	67,4	43	-
2176983i1 ¹	G	Ins	C	91,7	36	Ins	C	67,4	43	-
2176983	G	SNP	T	91,7	36	SNP	T	69,8	43	-
2176987	G	SNP	T	75	36	SNP	T	80	35	-
2176989	T	SNP	G	69,7	33	SNP	G	75,7	37	-
2176990	G	SNP	C	69,7	33	SNP	C	75,7	37	-
2176992	G	SNP	T	69,7	33	SNP	T	75,7	37	-
2176993	A	SNP	C	86,2	29	SNP	C	77,8	36	-
2178176	C	SNP	A	69,6	23	SNP	A	83,3	30	-
2245455	A	SNP	G	96,7	213	SNP	G	96,3	268	<i>yeiB</i>
2322118	C	SNP³	T	80	15	none³	C	72,5	51	-
2322123	T	SNP³	A	80	15	none³	T	72	50	-
2322124	A	SNP³	G	86,7	15	none³	A	72	50	-
2866111	A	SNP	G	99	193	SNP	G	98,6	214	-
3268825	A	SNP	G	100	155	SNP	G	100	186	<i>yhaC</i>
3742939	T	SNP	C	75	24	SNP	C	73,9	23	-
3746914i1 ¹	A	Ins	C	80	15	Ins	C	75	4	-
3746915	G	SNP	C	75	16	SNP	C	60	5	-
3748103	T	SNP	A	67,9	28	SNP	A	76,7	30	-
3748104	C	SNP	A	95	20	SNP	A	89,7	29	-
3748105	C	SNP	G	95,8	24	SNP	G	89,7	29	-
3751777i1 ¹	G	Ins	A	78,3	60	Ins	A	60	50	-
3751780i1 ¹	C	Ins	C	86,4	59	Ins	C	66,7	48	-
3751784	C	SNP	T	100	51	SNP	T	94,9	39	-
3751785	C	SNP	A	98,1	53	SNP	A	94,9	39	-
3903271	A	SNP	C	63,4	41	SNP	C	79,1	43	<i>bax</i>
3903271i1 ¹	A	Ins	T	63,4	41	Ins	T	79,1	43	<i>bax</i>
3903273	G	SNP	A	63,4	41	SNP	A	79,5	44	<i>bax</i>
3958123	A	SNP	T	83,3	12	SNP	T	66,7	27	<i>dctA</i>
3958134	C	SNP	G	57,1	7	SNP	G	86,7	15	<i>dctA</i>
3958144i1 ¹	G	Ins	A	76,9	13	Ins	A	78,9	19	<i>dctA</i>
3958145	T	SNP	A	84,6	13	SNP	A	63,2	19	<i>dctA</i>
3958150	A	SNP	T	84,2	19	SNP	T	66,7	33	<i>dctA</i>
3958151	C	SNP	G	85	20	SNP	G	64,9	37	<i>dctA</i>
3958153	A	SNP	G	85	20	SNP	G	85,3	34	<i>dctA</i>
3958154	T	SNP	C	80	20	SNP	C	84,4	32	<i>dctA</i>
4005879	T	SNP	C	98,9	183	SNP	C	100	263	-
4069049	C	none³	C	100	169	SNP³	T	97,5	202	<i>glgB</i>
4310363i1 ¹	G	Ins	C	70,6	34	Ins	C	75	28	-
4310363i3 ¹	G	Ins	C	70,6	34	Ins	C	75	28	-
4310363	G	SNP	A	70,6	34	SNP	A	75	28	-
4310363i2 ¹	G	Ins	A	70,6	34	Ins	A	75	28	-
4311553	C	SNP	G	78,1	32	SNP	G	62,8	43	<i>alsK</i>
4311554	T	SNP	G	81,2	32	SNP	G	62,8	43	<i>alsK</i>
4311555	T	SNP	G	82,9	35	SNP	G	74,4	43	<i>alsK</i>
4311557	C	SNP	T	97	33	SNP	T	94,4	36	<i>alsK</i>

Position	Ref.	wt				mCu60				Gen
		Type	SNP	Freq	Cov	Type	SNP	Freq	Cov	
4371271	A	Del	GAP	87,4	127	Del	GAP	92	162	-
4371272	A	Del	GAP	87,4	127	Del	GAP	91,4	162	-
4540925	T	SNP	G	55,2	29	SNP	G	76,7	30	-

¹Positionen in den sequenzierten Genomen mit mindestens einem inseriertem Nukleotid

²Hypothetisches Gen

³genetische Veränderungen zwischen den sequenzierten Genomen

Auflistung von Deletionen (Del), Insertionen (Ins) und SNPs die im Wildtyp-Genom (wt) oder der Kupfer-Mutante (mCu60) im Vergleich zum Referenzgenom NC_007779.1.

I.II.II MRSA

Tabelle 18: Mutationen in dem MRSA N315 und MRSA N315 mCu60 Genom im Vergleich zum MRSA N315 Referenzstamm NC_002745.2.

Position	Ref	wt				mCu60				Gen
		Type	SNP	Freq	Cov	Type	SNP	Freq	Cov	
36145	G	SNP	T	100	224	SNP	T	99,6	278	-
37603	C	SNP	T	98,5	323	SNP	T	99,2	364	<i>repB</i>
37636	G	SNP	A	97,6	252	SNP	A	99,3	305	<i>repB</i>
41688	C	SNP	T	99,5	366	SNP	T	99,4	478	-
46963	G	SNP	T	99,2	264	SNP	T	100	329	<i>mecA</i>
80872i1 ¹	G	Ins	G	97,2	398	Ins	G	95,9	468	-
81247	T	Del	GAP	97,5	360	Del	GAP	98,8	422	<i>kdpC</i>
81253	A	Del	GAP	98	356	Del	GAP	98,8	419	-
81625i1 ¹	A	Ins	C	98,5	267	Ins	C	97,9	341	-
523575	G	none³	G	98,4	307	SNP³	T	83,6	377	-
1593558	G	none³	G	100	178	SNP³	A	99,5	209	SA1388 ²
2561821	C	SNP	T	95,8	240	SNP	T	94,2	328	-
2753061	T	SNP	C	98,8	407	SNP	C	98,7	456	SA2445 ²

¹Positionen in den sequenzierten Genomen mit mindestens einem inserierten Nukleotid

²Hypothetisches Gen

³genetische Veränderungen zwischen den sequenzierten Genomen

Auflistung von Deletionen (Del), Insertionen (Ins) und SNPs im Wildtyp-Genom (wt) oder der Kupfer-Mutante (mCu60) im Vergleich zum Referenzgenom NC_002745.2.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

I.III Expressionsraten der mCu60 Mutanten und der Wildtypen

I.III.I *E. coli*

Tabelle 19: Expressionraten von *E. coli* Wildtyp und *E. coli* mCu60 Genen.

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>sgcB</i>	PTS system transporter subunit IIB	0,76	3,41	2,65
<i>ybgO</i>	fimbrial-like adhesin protein	-1,18	1,22	2,39
<i>nhoA</i>	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase	2,47	4,87	2,39
<i>insB</i>	IS1 protein InsB	1,49	3,67	2,19
<i>tfaE</i>	tail fiber assembly protein	-0,36	1,71	2,07
<i>bglH</i>	carbohydrate-specific outer membrane porin, cryptic	-1,78	0,29	2,07
<i>agaS</i>	tagatose-6-phosphate ketose/aldose isomerase	-1,30	0,77	2,07
<i>insO</i>	partial transposase of insertion element IS911A, interrupted by insertion of IS30 element	-0,34	1,73	2,07
<i>ycbY</i>	methyltransferase	4,94	6,98	2,04
<i>hupA</i>	HU, DNA-binding transcriptional regulator subunit alpha	9,75	7,75	-2,00
<i>ygiS</i>	transporter subunit	4,94	2,94	-2,00
<i>maa</i>	maltose O-acetyltransferase	4,16	2,16	-2,00
<i>isrC</i>	IsrC small RNA	6,46	4,45	-2,01
<i>fruR</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator	6,92	4,90	-2,01
<i>flhC</i>	DNA-binding transcriptional regulator	5,79	3,77	-2,02
<i>nth</i>	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase	3,65	1,63	-2,02
<i>glpA</i>	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic), large subunit	2,29	0,28	-2,02
<i>yfcA</i>	inner membrane protein	5,22	3,19	-2,02
<i>fecE</i>	iron-dicitrate transporter subunit	4,20	2,17	-2,03
<i>ycdS</i>	outer membrane protein	2,54	0,51	-2,03
<i>talB</i>	transaldolase B	9,12	7,08	-2,03
<i>yhjQ</i>	Pseudogene: yhjQ	3,07	1,02	-2,05
<i>fsaB</i>	fructose-6-phosphate aldolase 2	3,21	1,16	-2,05
<i>dld</i>	D-lactate dehydrogenase, FAD-binding, NADH independent	6,60	4,54	-2,06
<i>fecD</i>	iron-dicitrate transporter subunit	4,10	2,04	-2,06
<i>yagU</i>	inner membrane protein	4,74	2,68	-2,06
<i>yjiL</i>	ATPase, activator of (R)-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase	3,75	1,68	-2,07
<i>hisD</i>	bifunctional histidinal dehydrogenase/histidinol dehydrogenase	5,37	3,30	-2,08
<i>hisH</i>	imidazole glycerol phosphate synthase, glutamine amidotransferase subunit	4,99	2,91	-2,08
<i>appA</i>	phosphoanhydride phosphorylase	5,50	3,41	-2,09
<i>dmsA</i>	dimethyl sulfoxide reductase, anaerobic, subunit A	4,03	1,94	-2,09
<i>dxs</i>	1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, thiamine-requiring, FAD-requiring	5,61	3,51	-2,10

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>ygfQ</i>	transporter	4,44	2,34	-2,10
<i>mdtJ</i>	multidrug efflux system transporter	3,53	1,43	-2,10
<i>yfiN</i>	diguanylate cyclase	3,37	1,27	-2,10
<i>rbbA</i>	fused ribosome-associated ATPases	3,95	1,85	-2,10
<i>metN</i>	DL-methionine transporter subunit	3,62	1,52	-2,10
<i>hisP</i>	histidine/lysine/arginine/ornithine transporter subunit	3,45	1,35	-2,10
<i>yehG</i>	predicted protein, N-terminal fragment	2,45	0,35	-2,10
<i>nac</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator	3,20	1,10	-2,10
<i>glyA</i>	serine hydroxymethyltransferase	8,03	5,93	-2,10
<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase,-specific for NADP+	9,17	7,06	-2,11
<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase	5,79	3,67	-2,12
<i>clpB</i>	protein disaggregation chaperone	12,07	9,95	-2,12
<i>glpF</i>	glycerol facilitator	6,25	4,13	-2,12
<i>rbsK</i>	ribokinase	5,02	2,89	-2,12
<i>mrcA</i>	fused penicillin-binding protein 1a murein transglycosylase and murein transpeptidase	3,84	1,72	-2,13
<i>uxaC</i>	uronate isomerase	3,62	1,48	-2,14
<i>pstS</i>	phosphate transporter subunit	6,62	4,48	-2,14
<i>nuoM</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit M	6,71	4,56	-2,15
<i>suhB</i>	inositol monophosphatase	5,36	3,20	-2,15
<i>ygeV</i>	DNA-binding transcriptional regulator	5,86	3,70	-2,16
<i>minD</i>	membrane ATPase of the MinC-MinD-MinE system	7,20	5,03	-2,16
<i>cspI</i>	cold shock protein	7,19	5,02	-2,17
<i>fecC</i>	iron-dicitrate transporter subunit	4,61	2,44	-2,17
<i>gatZ</i>	D-tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2, subunit	9,97	7,79	-2,17
<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase, FeS subunit	9,14	6,96	-2,18
<i>rsxG</i>	oxidoreductase	3,85	1,67	-2,18
<i>yjiW</i>	pyruvate formate lyase activating enzyme	3,37	1,19	-2,18
<i>fecB</i>	iron-dicitrate transporter subunit	6,22	4,04	-2,18
<i>yfbQ</i>	aminotransferase	5,66	3,45	-2,21
<i>dgsA</i>	DNA-binding transcriptional repressor	5,71	3,50	-2,21
<i>ebgR</i>	DNA-binding transcriptional repressor	4,22	2,00	-2,22
<i>cyoA</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	9,35	7,13	-2,22
<i>glpK</i>	glycerol kinase	5,95	3,71	-2,24
<i>glnA</i>	glutamine synthetase	8,87	6,62	-2,25
<i>ynbE</i>	lipoprotein	4,67	2,41	-2,25
<i>hha</i>	modulator of gene expression, with H-NS	6,60	4,35	-2,25
<i>nmpC</i>	outer membrane porin protein; locus of qsr prophage	4,97	2,71	-2,25
<i>metR</i>	DNA-binding transcriptional activator	2,89	0,63	-2,25
<i>ecnA</i>	entericidin A membrane lipoprotein, antidote entericidin B	6,23	3,98	-2,25
<i>apt</i>	adenine phosphoribosyltransferase	5,41	3,16	-2,25
<i>yjhE</i>	KpLE2 phage-like element; predicted membrane protein	3,24	0,99	-2,25

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>yidI</i>	inner membrane protein	2,39	0,13	-2,25
<i>yicG</i>	inner membrane protein	2,93	0,68	-2,25
<i>yehD</i>	fimbrial-like adhesin protein	2,12	-0,14	-2,25
<i>ydjX</i>	inner membrane protein	2,73	0,47	-2,25
<i>ycjM</i>	glucosyltransferase	0,48	-1,77	-2,25
<i>yccM</i>	4Fe-4S membrane protein	1,13	-1,12	-2,25
<i>ulaC</i>	PTS system L-ascorbate-specific transporter subunit IIA	3,34	1,09	-2,25
<i>sfmA</i>	fimbrial-like adhesin protein	2,12	-0,14	-2,25
<i>rsxE</i>	inner membrane NADH-quinone reductase	3,76	1,50	-2,25
<i>nrfB</i>	nitrite reductase, formate-dependent, penta-heme cytochrome c	2,05	-0,20	-2,25
<i>glpC</i>	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic), small subunit	0,98	-1,27	-2,25
<i>cusC</i>	copper/silver efflux system, outer membrane component	0,77	-1,48	-2,25
<i>ccmE</i>	periplasmic heme chaperone	3,29	1,04	-2,25
<i>ycbQ</i>	fimbrial-like adhesin protein	2,12	-0,13	-2,25
<i>xerC</i>	site-specific tyrosine recombinase	5,09	2,84	-2,25
<i>fliL</i>	flagellar biosynthesis protein	2,34	0,09	-2,25
<i>fliJ</i>	flagellar protein	2,41	0,15	-2,25
<i>caiF</i>	DNA-binding transcriptional activator	4,89	2,64	-2,25
<i>purH</i>	fused IMP cyclohydrolase and phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	4,17	1,90	-2,28
<i>atpD</i>	F1 sector of membrane-bound ATP synthase subunit beta	8,87	6,58	-2,29
<i>cyoB</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	8,70	6,40	-2,30
<i>nuoB</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain B	8,86	6,55	-2,31
<i>rstB</i>	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with RstA	5,16	2,85	-2,31
<i>yjgF</i>	ketoacid-binding protein	8,88	6,56	-2,32
<i>aspC</i>	aspartate aminotransferase, PLP-dependent	7,13	4,79	-2,33
<i>nuoC</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain C,D	8,05	5,71	-2,34
<i>paaE</i>	multicomponent oxygenase/reductase subunit for phenylacetic acid degradation	5,22	2,88	-2,34
<i>gltL</i>	glutamate and aspartate transporter subunit	5,37	3,03	-2,35
<i>pepE</i>	(alpha)-aspartyl dipeptidase	3,45	1,10	-2,35
<i>ynaE</i>	DNA-binding transcriptional regulator	4,82	2,47	-2,35
<i>ygjF</i>	NAD(P)-binding oxidoreductase with NAD(P)-binding Rossmann-fold domain	4,34	1,99	-2,35
<i>ydcW</i>	medium chain aldehyde dehydrogenase	6,17	3,83	-2,35
<i>glcF</i>	glycolate oxidase iron-sulfur subunit	7,38	5,03	-2,36
<i>sodB</i>	superoxide dismutase, Fe	9,29	6,93	-2,36
<i>livJ</i>	leucine/isoleucine/valine transporter subunit	3,52	1,16	-2,36
<i>nuoI</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain I	7,85	5,48	-2,37
<i>hyaA</i>	hydrogenase 1, small subunit	7,43	5,05	-2,38
<i>cspC</i>	stress protein, member of the CspA-family	13,08	10,70	-2,39
<i>cyoC</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	8,89	6,50	-2,39

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>kduI</i>	5-keto 4-deoxyuronate isomerase	2,63	0,24	-2,39
<i>hofQ</i>	fimbrial transporter	2,06	-0,33	-2,39
<i>paaD</i>	multicomponent oxygenase/reductase subunit for phenylacetic acid degradation	5,70	3,31	-2,39
<i>pyrL</i>	pyrBI operon leader peptide	7,98	5,58	-2,40
<i>rstA</i>	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with RstB	6,19	3,76	-2,43
<i>purM</i>	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	4,69	2,25	-2,44
<i>purL</i>	phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase	4,00	1,54	-2,45
<i>yhfK</i>	inner membrane protein	4,47	2,00	-2,47
<i>yfiB</i>	outer membrane lipoprotein	4,87	2,35	-2,52
<i>yihN</i>	transporter	1,16	-1,36	-2,52
<i>ycgR</i>	protein involved in flagellar function	1,94	-0,57	-2,52
<i>yael</i>	phosphatase	3,38	0,86	-2,52
<i>murE</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:meso-diaminopimelate ligase	5,97	3,45	-2,52
<i>lsrC</i>	AI2 transporter	4,45	1,94	-2,52
<i>ccmF</i>	heme lyase, CcmF subunit	2,54	0,02	-2,52
<i>ygiP</i>	DNA-binding transcriptional regulator	1,60	-0,92	-2,52
<i>yegU</i>	hydrolase	2,49	-0,03	-2,52
<i>napB</i>	nitrate reductase, small, cytochrome C550 subunit, periplasmic	2,65	0,13	-2,52
<i>hyfD</i>	hydrogenase 4, membrane subunit	0,97	-1,55	-2,52
<i>yjeT</i>	inner membrane protein	3,84	1,32	-2,52
<i>insA</i>	IS1 repressor protein Insa	5,68	3,16	-2,52
<i>putP</i>	proline:sodium symporter	6,12	3,60	-2,52
<i>atpI</i>	ATP synthase, membrane-bound accessory subunit	7,81	5,28	-2,53
<i>rbsA</i>	fused D-ribose transporter subunits and ATP-binding components ABC superfamily	5,18	2,64	-2,54
<i>hyaB</i>	hydrogenase 1, large subunit	6,96	4,40	-2,55
<i>ydgT</i>	regulator	6,08	3,52	-2,56
<i>betA</i>	choline dehydrogenase	6,05	3,49	-2,56
<i>cspB</i>	cold shock protein	8,29	5,72	-2,57
<i>yecG</i>	universal stress protein	4,78	2,20	-2,57
<i>blr</i>	beta-lactam resistance membrane protein	6,55	3,98	-2,57
<i>fepC</i>	iron-enterobactin transporter subunit	3,45	0,86	-2,59
<i>ansB</i>	periplasmic L-asparaginase II	5,91	3,31	-2,60
<i>ompC</i>	outer membrane porin protein C	12,09	9,47	-2,62
<i>yecl</i>	ferritin-like protein	5,76	3,14	-2,62
<i>hyaF</i>	protein involved in nickel incorporation into hydrogenase-1 proteins	6,78	4,16	-2,62
<i>paaC</i>	multicomponent oxygenase/reductase subunit for phenylacetic acid degradation	5,93	3,31	-2,62
<i>ftsI</i>	transpeptidase involved in septal peptidoglycan synthesis	7,50	4,87	-2,62
<i>ygaH</i>	inner membrane protein	4,19	1,56	-2,63

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>ykgA</i>	DNA-binding transcriptional regulator	3,15	0,52	-2,63
<i>rbsC</i>	D-ribose transporter subunit	6,13	3,49	-2,64
<i>gltK</i>	glutamate and aspartate transporter subunit	5,00	2,36	-2,65
<i>nuoF</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain F	7,58	4,92	-2,66
<i>purE</i>	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	4,21	1,54	-2,67
<i>ompW</i>	outer membrane protein W	5,11	2,44	-2,68
<i>prpB</i>	2-methylisocitrate lyase	8,53	5,85	-2,68
<i>pyrD</i>	dihydro-orotate oxidase, FMN-linked	3,65	0,97	-2,69
<i>hyaD</i>	protein involved in processing of HyaA and HyaB proteins	7,74	5,03	-2,71
<i>rihA</i>	ribonucleoside hydrolase 1	5,96	3,25	-2,71
<i>accB</i>	acetyl CoA carboxylase, BCCP subunit	7,88	5,16	-2,72
<i>hyaE</i>	protein involved in processing of HyaA and HyaB proteins	7,61	4,89	-2,72
<i>hyaC</i>	hydrogenase 1, b-type cytochrome subunit	7,41	4,69	-2,72
<i>minE</i>	cell division topological-specificity factor	7,70	4,98	-2,73
<i>upp</i>	uracil phosphoribosyltransferase	7,14	4,41	-2,73
<i>csrC</i>	regulator of CsrB and CsrC decay	15,06	12,33	-2,73
<i>ymcE</i>	cold shock gene	5,42	2,68	-2,74
<i>yjjM</i>	DNA-binding transcriptional regulator	1,85	-0,89	-2,74
<i>ygfS</i>	oxidoreductase, 4Fe-4S ferredoxin-type subunit	4,34	1,60	-2,74
<i>yibD</i>	glycosyl transferase	1,67	-1,07	-2,74
<i>ybfE</i>	LexA regulated protein	3,49	0,75	-2,74
<i>csgE</i>	transport protein	4,66	1,93	-2,74
<i>hsdR</i>	endonuclease R	4,48	1,73	-2,75
<i>evgS</i>	hybrid sensory histidine kinase in two-component regulatory system with EvgA	3,35	0,59	-2,76
<i>artJ</i>	arginine transporter subunit	4,53	1,75	-2,78
<i>nuoE</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain E	8,35	5,56	-2,79
<i>ydgG</i>	inner membrane protein	3,72	0,93	-2,79
<i>glnP</i>	glutamine transporter subunit	6,57	3,75	-2,82
<i>yghK</i>	glycolate transporter	4,64	1,81	-2,82
<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide:D-alanyl-D- alanine ligase	5,96	3,12	-2,84
<i>gnsA</i>	regulator of phosphatidylethanolamine synthesis	5,35	2,51	-2,84
<i>gltD</i>	glutamate synthase, 4Fe-4S protein, small subunit	5,23	2,38	-2,84
<i>malT</i>	DNA-binding transcriptional activator	7,76	4,87	-2,88
<i>mraY</i>	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase	5,76	2,87	-2,90
<i>hybB</i>	hydrogenase 2 cytochrome b type component	4,23	1,33	-2,90
<i>ypdH</i>	PTS system transporter subunit IIB	3,53	0,60	-2,93
<i>yjeE</i>	oligopeptide transporter subunit	3,87	0,94	-2,93
<i>trpE</i>	component I of anthranilate synthase	5,60	2,66	-2,94
<i>uraA</i>	uracil transporter	4,57	1,61	-2,95
<i>gcvB</i>	small regulatory RNA	13,42	10,44	-2,98
<i>ygfU</i>	transporter	3,77	0,77	-3,00

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>yjhQ</i>	acetyltransferase	3,87	0,86	-3,02
<i>oppA</i>	oligopeptide transporter subunit	10,50	7,47	-3,03
<i>ftn</i>	cytoplasmic ferritin iron storage protein	5,34	2,31	-3,03
<i>ydeV</i>	sugar kinase	5,16	2,12	-3,04
<i>pyrC</i>	dihydro-orotase	5,97	2,91	-3,06
<i>mglC</i>	methyl-galactoside transporter subunit	4,62	1,55	-3,07
<i>accC</i>	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	7,64	4,55	-3,09
<i>atpG</i>	F1 sector of membrane-bound ATP synthase subunit gamma	8,81	5,72	-3,10
<i>yeiT</i>	oxidoreductase	3,36	0,26	-3,10
<i>yahA</i>	DNA-binding transcriptional regulator	1,96	-1,14	-3,10
<i>insB</i>	IS1 transposase InsAB'	4,66	1,56	-3,10
<i>ycjQ</i>	oxidoreductase	2,01	-1,09	-3,10
<i>tdcB</i>	catabolic threonine dehydratase, PLP-dependent	2,10	-1,00	-3,10
<i>grxA</i>	glutaredoxin 1, redox coenzyme for ribonucleotide reductase (RNR1a)	4,04	0,94	-3,10
<i>cspG</i>	DNA-binding transcriptional regulator	5,95	2,80	-3,15
<i>glcB</i>	malate synthase G	7,64	4,45	-3,19
<i>yjhG</i>	dehydratase	2,79	-0,41	-3,20
<i>insL</i>	transposase	4,04	0,83	-3,22
<i>atpH</i>	F1 sector of membrane-bound ATP synthase subunit delta	8,95	5,72	-3,23
<i>ptsA</i>	fused PTS enzymes Hpr component, enzyme I component, and enzyme IIA component	0,91	-2,34	-3,25
<i>mcrB</i>	5-methylcytosine-specific restriction enzyme McrBC, subunit McrB	1,77	-1,48	-3,25
<i>ffs</i>	4.5S RNA component of the signal recognition particle (SRP)	12,83	9,58	-3,25
<i>dctA</i>	C4-dicarboxylic acid, orotate and citrate transporter	9,09	5,83	-3,27
<i>pck</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	6,95	3,67	-3,27
<i>proW</i>	glycine betaine transporter subunit	4,80	1,47	-3,32
<i>tsx</i>	nucleoside channel, receptor of phage T6 and colicin K	8,40	5,06	-3,34
<i>ygfT</i>	fused oxidoreductase Fe-S subunit and nucleotide-binding subunit	3,99	0,62	-3,37
<i>ygfO</i>	transporter	4,21	0,82	-3,39
<i>yeiA</i>	oxidoreductase	3,65	0,26	-3,39
<i>lsrD</i>	AI2 transporter	4,38	0,99	-3,39
<i>lacZ</i>	beta-D-galactosidase	2,75	-0,64	-3,39
<i>gltB</i>	glutamate synthase, large subunit	5,48	2,08	-3,40
<i>yedE</i>	inner membrane protein	5,49	2,03	-3,45
<i>proX</i>	glycine betaine transporter subunit	5,49	1,99	-3,50
<i>fimA</i>	major type 1 subunit fimbrin	7,67	4,17	-3,50
<i>yjhP</i>	methyltransferase	2,92	-0,60	-3,52
<i>malG</i>	maltose transporter subunit	5,66	2,15	-3,52
<i>atpB</i>	F0 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit a	8,62	5,08	-3,54
<i>atpF</i>	F0 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit b	9,25	5,71	-3,54

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>lsrF</i>	aldolase	5,53	1,98	-3,55
<i>ydeW</i>	DNA-binding transcriptional regulator	5,19	1,63	-3,55
<i>flu</i>	antigen 43 (Ag43) phase-variable biofilm formation autotransporter	6,04	2,47	-3,57
<i>nupC</i>	nucleoside (except guanosine) transporter	6,90	3,30	-3,60
<i>glnQ</i>	glutamine transporter subunit	6,77	3,15	-3,62
<i>atpA</i>	F1 sector of membrane-bound ATP synthase subunit alpha	9,06	5,43	-3,63
<i>lsrB</i>	AI2 transporter	5,22	1,53	-3,69
<i>guaD</i>	guanine deaminase	4,27	0,58	-3,69
<i>atpE</i>	F0 sector of membrane-bound ATP synthase, subunit c	9,79	6,09	-3,71
<i>yihM</i>	sugar phosphate isomerase	2,75	-0,99	-3,74
<i>oppF</i>	oligopeptide transporter subunit	8,95	5,18	-3,77
<i>fimI</i>	fimbrial protein involved in type 1 pilus biosynthesis	4,71	0,87	-3,84
<i>oppC</i>	oligopeptide transporter subunit	8,53	4,67	-3,86
<i>oppB</i>	oligopeptide transporter subunit	7,62	3,68	-3,94
<i>glcD</i>	glycolate oxidase subunit, FAD-linked	7,30	3,30	-3,99
<i>ego</i>	fused AI2 transporter subunits and ATP-binding components of ABC superfamily	3,96	-0,05	-4,02
<i>napF</i>	ferredoxin-type protein	4,01	0,00	-4,02
<i>galS</i>	DNA-binding transcriptional repressor	2,94	-1,08	-4,02
<i>aphA</i>	acid phosphatase/phosphotransferase, class B, non-specific	5,84	1,79	-4,05
<i>gcvH</i>	glycine cleavage complex lipoylprotein	8,86	4,80	-4,06
<i>gatA</i>	galactitol-specific enzyme IIA component of PTS	6,81	2,72	-4,10
<i>mglA</i>	methyl-galactoside ABC transporter ATP-binding protein	4,50	0,38	-4,12
<i>xdhA</i>	xanthine dehydrogenase, molybdenum binding subunit	5,52	1,39	-4,13
<i>gcvT</i>	glycine cleavage complex aminomethyltransferase	7,95	3,80	-4,15
<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	4,33	0,15	-4,18
<i>gcvP</i>	glycine decarboxylase, PLP-dependent, subunit (protein P) of glycine cleavage complex	7,52	3,29	-4,23
<i>ompF</i>	outer membrane porin 1a (Ia;b;F)	8,05	3,81	-4,24
<i>dppB</i>	dipeptide transporter	7,37	3,12	-4,25
<i>proV</i>	glycine betaine transporter subunit	4,60	0,30	-4,30
<i>malF</i>	maltose transporter subunit	5,25	0,94	-4,31
<i>hybO</i>	hydrogenase 2, small subunit	5,76	1,40	-4,36
<i>oppD</i>	oligopeptide transporter subunit	8,91	4,55	-4,36
<i>xdhB</i>	xanthine dehydrogenase, FAD-binding subunit	5,12	0,75	-4,37
<i>prpC</i>	2-methylcitrate synthase	7,73	3,34	-4,39
<i>ompT</i>	outer membrane protease VII	5,07	0,63	-4,43
<i>ygcM</i>	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase	4,95	0,43	-4,52
<i>mglB</i>	methyl-galactoside transporter subunit	6,96	2,44	-4,52
<i>spr</i>	peptidase, outer membrane lipoprotein	7,79	3,26	-4,53
<i>hybA</i>	hydrogenase 2 4Fe-4S ferredoxin-type component	4,66	0,00	-4,66
<i>ycbX</i>	2Fe-2S cluster-containing protein	5,12	0,42	-4,70

Gen	Produkt	Log WT	Log Mu	M
<i>dppD</i>	dipeptide transporter	7,93	3,00	-4,93
<i>putA</i>	fused DNA-binding transcriptional regulator, proline dehydrogenase, and pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	7,52	2,55	-4,98
<i>glcE</i>	glycolate oxidase FAD binding subunit	7,09	2,08	-5,02
<i>prpE</i>	propionyl-CoA synthetase with ATPase domain	7,20	2,15	-5,05
<i>hyuA</i>	D-stereospecific phenylhydantoinase	5,58	0,51	-5,07
<i>xdhC</i>	xanthine dehydrogenase, Fe-S binding subunit	5,14	0,04	-5,10
<i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	6,73	1,61	-5,12
<i>treB</i>	PTS system fused trehalose(maltose)-specific transporter subunit IIBC	6,77	1,64	-5,13
<i>dppF</i>	dipeptide transporter	7,79	2,56	-5,23
<i>dppC</i>	dipeptide transporter	7,72	2,45	-5,27
<i>treC</i>	trehalose-6-P hydrolase	5,56	0,25	-5,31
<i>xdhD</i>	fused xanthine/hypoxanthine oxidase, molybdopterin-binding subunit and Fe-S binding subunit	6,39	1,04	-5,35
<i>lamB</i>	maltose outer membrane porin	7,46	1,88	-5,58
<i>carA</i>	carbamoyl phosphate synthetase small subunit, glutamine amidotransferase	6,54	0,78	-5,76
<i>prpD</i>	2-methylcitrate dehydratase	7,83	2,03	-5,81
<i>gatD</i>	galactitol-1-phosphate dehydrogenase, Zn-dependent and NAD(P)-binding	7,87	1,92	-5,95
<i>pyrI</i>	aspartate carbamoyltransferase, regulatory subunit	7,81	1,68	-6,13
<i>ygfM</i>	oxidoreductase	6,49	0,34	-6,15
<i>malE</i>	maltose transporter subunit	8,25	1,73	-6,52
<i>ygeY</i>	peptidase	7,63	1,03	-6,61
<i>ygfK</i>	oxidoreductase, Fe-S subunit	6,31	-0,33	-6,64
<i>malK</i>	bifunctional maltose ABC transporter ATP-binding protein /regulatory protein	6,57	-0,18	-6,74
<i>ssnA</i>	chlorohydrolase/aminohydrolase	6,35	-0,43	-6,78
<i>tnaC</i>	tryptophanase leader peptide	10,74	3,74	-7,00
<i>ygeX</i>	2,3-diaminopropionate ammonia-lyase	6,72	-0,28	-7,00
<i>gatC</i>	PTS system galactitol-specific transporter subunit IIC	9,03	2,00	-7,03
<i>gatB</i>	PTS system galactitol-specific transporter subunit IIB	9,43	2,38	-7,05
<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit	7,09	-0,92	-8,01
<i>tnaB</i>	tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase, PLP-dependent	7,30	-0,73	-8,03
<i>tnaA</i>	tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase, PLP-dependent	10,65	1,29	-9,36

Auflistung aller Gene mit einer Expressionrate $\log_{10} < 2$ bzw. $\log_{10} < -2$ (ohne hypothetische Gene), das Produkt, sowie die Expressionraten und die Differenz (M) zwischen Wildtyp (WT) und mCu60 Mutante (Mu). Fett sind Bestandteile von Insertions-Elementen bzw. Transposasen.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

I.III.II MRSA

Tabelle 20: Expressionraten von MRSA Wildtyp und MRSA mCu60 Genen.

Gen	Produkt	Log WT	Log Mut	A	M
argG	argininosuccinate synthase	9,08	5,44	7,26	-3,64
phoB	alkaline phosphatase	9,14	5,54	7,34	-3,59
trpG	anthranilate synthase component II	2,36	-0,79	0,78	-3,15
argH	argininosuccinate lyase	7,67	4,67	6,17	-3,00
pstB	phosphate transporter ATP-binding protein	9,77	6,80	8,28	-2,97
kdpA	potassium-transporting ATPase subunit A	3,65	0,81	2,23	-2,83
truncat ed-SA	transposase	2,93	0,14	1,54	-2,79
kdpB	potassium-transporting ATPase subunit B	3,60	0,96	2,28	-2,65
seo	enterotoxin SeO	3,97	1,33	2,65	-2,65
pyrF	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	6,82	4,34	5,58	-2,48
pyrE	orotate phosphoribosyltransferase	7,58	5,12	6,35	-2,46
pyrAA	carbamoyl phosphate synthase small subunit	6,80	4,36	5,58	-2,44
yent2	enterotoxin YENT2	3,12	0,67	1,89	-2,44
SA1221	thioredoxine reductase	11,84	9,43	10,64	-2,41
scrA	PTS system sucrose-specific transporter subunit IIBC	5,54	3,14	4,34	-2,39
pyrB	aspartate carbamoyltransferase	6,37	4,06	5,22	-2,31
carB	carbamoyl phosphate synthase large subunit	6,61	4,52	5,57	-2,09
pyrC	dihydroorotase	6,27	4,19	5,23	-2,09
SA1674	glutamate ABC transporter ATP-binding protein	8,15	6,07	7,11	-2,08
ureB	urease subunit beta	0,66	2,67	1,66	2,02

Auflistung aller Gene mit einer Expressionrate $\log_{10} < 2$ bzw. $\log_{10} < -2$ (ohne hypothetische Gene), das Produkt, sowie die Expressionraten und die Differenz (M) zwischen Wildtyp (WT) und mCu60 Mutante (Mu). Fett sind Bestandteile von Insertions-Elementen bzw. Transposasen.

II. Abkürzungsverzeichnis

ALE	Adaptive Laboratory Evolution
AMC	Amoxicillin-Clavulansäure
AgNPs	Silber-Nanopartikel
BSL	Biosicherheitsstufe
CAZ	Ceftazidim
CDC	Center for Diseases Control and Prevention
CIP	Ciprofloxacin
CLI	Clindamycin
CMP	Chloramphenicol
Cu	Kupfer
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DOX	Doxycycline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EM	Erhaltungsmedium
EPA	Enviromental Protection Agency
FAME	fatty acid methyl ester, Fettsäuremethylester
FS	Fettsäure
GEN	Gentamicin
HAP	6-N-Hydroxylaminopurin
HCCA	α -Zyano-4 Hydroxymzimtsäure
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IMP	Imipenem
IS	Insertions-Element
KBE	Kolonienbildene Einheit
LB	Luria-Bertani
LEV	Levofloxacin
LIZ	Linezolid
MAE	Mutation Accumulation Experiment

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN**

MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry
mCu60	Kupfer-tolerante Mutante
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MM	Minimalmedium
MPXV	Monkeypoxvirus (Affenpocken-Virus)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	Optische Dichte
PBE	Plaquebildene Einheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEN	Penicillin
POL	Polymyxin
RIF	Rifampin
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SS	Edelstahl
STR	Streptomycin
T/S	Trimethoprim-Sulfamethoxazol
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGC	Tigecyclin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
VACV	Vacciniapoxvirus (Vaccinia)
VAN	Vancomycin
VBNC-Status	Viable But Not Culturable-Status
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WGS	Whole Genome Sequence
WM	Wachstumsmedium
wt	Wildtyp

III. Danksagung

Ich danke dem Leiter des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr, Prof. Dr. Lothar Zöller, sowie meinem Abteilungsleiter Prof. Dr. Hermann Meyer für die Möglichkeit am Institut zu promovieren.

Ich danke meinem Betreuer PD Dr. Gregor Grass für die grenzenlose Unterstützung meiner Promotion. Für die Möglichkeiten die er mir trotz Finanzierungsschwierigkeiten geboten hat. Zudem danke ihm für die menschliche Unterstützung während der ganzen Zeit.

Ich danke Prof. Dr. Dietrich Nies für die externe Betreuung meiner Dissertation und für seine beiden Doktoranten Lucy Bauer und Martin Herzberg. Beide haben mich nicht nur bei den ICP-MS Untersuchungen unterstützt, sondern die ein oder andere Tagung zum Erlebnis gemacht.

Ich danke Prof. Dr. Paula Morais und Dr. Romeu Francisco für die Unterstützung bei den Fettsäureanalysen. Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Paula Morais für die Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes in Coimbra danken. In diesem Zuge möchte ich auch Dr. Christophe Espirito Santo danken. Er hat mich nicht nur in dieses Forschungsgebiet eingearbeitet und mich während meines Forschungsaufenthaltes unterstützt, sondern ist mir immer auch ein guter Freund gewesen.

Prof. Dr. Jörn Kalinowski und Dr. Christian Rückert danke ich für die Unterstützungen in den Sequenzierungen.

Ich danke Dr. Klaus Ockenfeld und dem Deutschen Kupferinstitut für das Aufzeigen neuer Möglichkeiten und die anregenden Gespräche.

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Ich danke aus ganzem Herzen Dr. Matthias Hanczaruk und Dr. Markus Antwerpen für die unermüdliche Unterstützung bei vielen Fragestellungen aber auch für jeden Keks und jede Tasse Kaffee.

Ich danke ganz herzlich allen Mitarbeitern der „alten TE040“, ihr habt mich immer unterstützt und meine Macken tapfer ertragen. Ein herzlichen Dank gilt auch meinen L3-Buddies Daniela Horenkamp und Jutta Brohl, ohne die ich die L3-Arbeiten hätte nicht durchführen können. Auch allen meinen Büro-Nachbarn, ob Praktikant, Masterant oder Doktorant, ob fachliche Diskussionen, Schimpftiraden auf die Computer oder Mittagspausen ihr habt die Zeit zu etwas besonderem gemacht.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder, seiner Frau und meiner Nichte für die langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Ich danke euch, dass ihr nie an mir gezweifelt habt.

IV. Lebenslauf

Pauline Bleichert

17.Mai 1986

aus Kattowitz

Akademischer Werdegang

**08/2011 –
09/2014**

Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
„Untersuchungen zur Wirkungsweise antimikrobieller Kupferoberflächen“

Betreut durch:

Prof. Dr. Nies (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg)

PD Dr. Geger Grass (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr)

**04 / 2009 –
01 / 2011**

Master of Science in Biology, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Studienschwerpunkt: Mikrobiologie und Immunologie

Masterarbeit (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr): „Molekulare Typisierung des Q-Fieber Erregers *Coxiella burnetii* mittels Multispacer –Sequence - Typing (MST) und IS1111 Verteilung“

**10 / 2005 –
09 / 2008**

Bachelor of Science in Biology, Universität zu Köln

Studienschwerpunkte: Immunologie und Genomics

Bachelorarbeit (Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Unikliniken Köln):

„Characterisation of the function of the U-box containing protein UIP5 during the immune response of mice acutally infected with the LCV“

**08 / 1996 –
06 / 2005**

Abitur, Peter Ustinov Schule Monheim

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE
ANTIMIKTOBIELLER KUPFEROBERFLÄCHEN

Beruflicher Werdegang

07/ 2013 – 06/ 2014	Stipendium Deutsches Kupfer Institut (DKI), Düsseldorf
04 – 05 / 2012	Forschungsaufenthalt Universität Coimbra (Portugal)
02 – 07 / 2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Projekt: “Vector-borne Infectious Diseases in Climate Change Investigations” (VICCI)
01 – 03 / 2009	Studienpraktika Leibniz Institut für Umweltmedizin, Düsseldorf
02 – 03 / 2008	Institut für Humangenetik der Universität Münster
08 – 09 / 2007	Max Planck Institut für Pflanzenzüchtung, Köln

V. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Promotions-Niederschrift

**„Untersuchungen zur Wirkungsweise antimikrobieller
Kupferoberflächen“**

eigenhändig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Promotion wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Datum)

(Vor- und Zuname)