



Vrije Universiteit Brussel

Faculteit Geneeskunde en Farmacie  
Laarbeeklaan 103, B-1090 Brussel

**EFFECT VAN GESIMULEERDE MICROGRAVITEIT  
OP HET GEDRAG VAN DE BACTERIE  
*CUPRIAVIDUS METALLIDURANS* CH34**



**Aurélie Crabbé**

Eindwerk voorgelegd tot het behalen van de graad van  
Licentiaat in de Biomedische Wetenschappen

Juni 2005  
Academiejaar 2004 – 2005

Promotor: Prof. Dr. Frank Deconinck  
Begeleider: Dr. Ir. Patrick De Boever

SCK•CEN Departement Radioprotectie  
Laboratorium voor Microbiologie en Radiobiologie  
Boeretang 200  
B-2400 Mol



SAMENVATTING.....	1
ABSTRACT.....	2
DEEL I: INLEIDING.....	3
1 Micro-organismen in de ruimte.....	3
1.1 Microbiële contaminatie van het ruimtevaartuig.....	3
1.2 Potentiële gevolgen van microbiële aanwezigheid in de ruimte .....	3
1.2.1 Voor de mens .....	4
1.2.2 Voor het ruimtevehikel .....	6
1.2.3 Gebruik van micro-organismen voor recyclage.....	7
1.3 Effect van micrograviteit op micro-organismen.....	8
1.3.1 Overzicht testorganismen.....	8
1.3.2 Begrip micrograviteit .....	9
1.3.3 Groeikinetiek.....	9
1.3.4 Productie van antibiotica als secundaire metaboliet .....	11
1.3.5 Resistentie aan antibiotica.....	12
1.3.6 Infectiviteit.....	13
1.4 Microbial Experiment in the Space Station about Gene Expression (MESSAGE) .....	13
2 Simulatie van micrograviteit .....	14
2.1 Beperkingen van experimenten in de ruimte .....	14
2.2 Micrograviteit op aarde .....	14
2.2.1 "Drop towers" en parabolische vluchten.....	14
2.2.2 Simulatie van micrograviteit a.d.h.v. de Rotating Wall Vessel.....	15
2.2.3 Rotatiesnelheid van de RWV .....	17
2.2.4 Oriëntatie van de bioreactor.....	18
2.3 Effect van gesimuleerde micrograviteit op bacteriën.....	18
2.3.1 Productie van antibiotica als secundaire metaboliet .....	18
2.3.2 Resistentie aan stress.....	19
2.3.3 Groeikinetiek.....	20
2.3.4 Virulentie .....	20
2.3.5 Genexpressie: het Low Shear Modeled Micro Gravity regulon .....	21
2.3.6 Overzicht van de LSMMG-geïnduceerde effecten .....	21
2.4 De RWV als menselijk lichaam.....	22
3 Doelstelling .....	23
DEEL II: EXPERIMENTEEL GEDEELTE.....	24
4 Materiaal en methoden .....	24
4.1 <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34 .....	24
4.1.1 Algemene eigenschappen <i>R. metallidurans</i> CH34 .....	24
4.1.2 Keuze van <i>R. metallidurans</i> als testorganisme .....	24
4.2 Gebruikte media en groeiomstandigheden .....	25
4.3 Staalname en verwerking.....	26
4.4 Analyse .....	27
4.4.1 Metabolisme.....	27
4.4.2 Genexpressie: Kwantitatieve PCR.....	28
4.4.3 Proteïne-expressie: Twee dimensionele gelelektroforese.....	33

5	Resultaten en bespreking.....	38
5.1	Metabolisme .....	38
5.1.1	Groei .....	38
5.1.2	Gluconaatmeting.....	39
5.1.3	Ammoniumbepaling .....	40
5.2	Analyse van differentiële genexpressie met Kwantitatieve PCR.....	40
5.2.1	Genselectie voor Kwantitatieve PCR (Q-PCR).....	40
5.2.2	Ontwerp van primers voor Q-PCR .....	41
5.2.3	Standaard DNA.....	43
5.2.4	Testen van de primers .....	43
5.2.5	Vorbereiding stalen voor Q-PCR.....	44
5.2.6	Bepaling van het meest stabiele normalisatiegen .....	44
5.2.7	PCR-efficiëntie bepalingen.....	45
5.2.8	Analyse resultaten.....	46
5.3	Proteïne-expressie: 2D gelelektroforese.....	50
5.3.1	Bereiding stalen voor proteomics .....	50
5.3.2	Proteïnegels.....	50
5.3.3	Vergelijkende analyse.....	51
6	Discussie.....	54
	AFKORTINGEN.....	58
	REFERENTIES.....	59
	DANKWOORD.....	64

Gedurende de voorbije decennia werd herhaaldelijk aangetoond dat micrograviteit een belangrijk regulatorisch signaal is. Ruimtevaart experimenten uitgevoerd met verschillende types bacteriën wijzen op een verhoogde resistentie aan antibiotica, een betere groei, een toegenomen conjugatie frequentie, gestegen virulentie e.d.. Vermits micro-organismen in belangrijke mate aanwezig zijn in ruimtevaartuigen en ruimtestations kunnen wijzigingen in het microbiële gedrag gevolgen impliceren voor de bemanning en de integriteit van het ruimtevehikel. Daarom is het van groot belang om deze potentiële gevolgen in te schatten en de risico's te minimaliseren om lange ruimtevluchten en verblijf op planetaire basissen zoals de maan en Mars mogelijk te maken. Ruimtevaart experimenten worden gekenmerkt door talrijke beperkingen zoals de beschikbare ruimte en gewicht, de financiële kosten, gespecialiseerd materiaal e.d.. Hiervoor ontwikkelde NASA een roterende bioreactor (Rotating Wall Vessel (RWV)). Deze bioreactor creëert een omgeving met een lage wrijving die vergelijkbaar is aan de micrograviteit ondervonden tijdens ruimtevlucht.

De effecten van gesimuleerde micrograviteit werden bestudeerd voor het modelorganisme *Cupriavidus metallidurans* CH34 (voorheen *Ralstonia metallidurans*, ATCC 43123) met de RWV. Drie testcondities werden in deze studie onderzocht: gesimuleerde micrograviteit (SMG), de RWV in een controle positie (1 x g) en een klassieke schudcultuur. Er werd gezocht naar mogelijke wijzigingen in microbiële gedrag op niveau van groei, substraatverbruik, genexpressie (kwantitatieve PCR) en proteïne-expressie (2D-gelelektroforese). Vergeleken met klassieke schudculturen vertoonden cellen gekweekt in de RWV (zowel in SMG als 1 x g controle condities) een tragere groeisnelheid evenals een langzamere afsterving. Verder werd de koolstofbron gluconaat efficiënter verbruikt in gesimuleerde micrograviteit. Voor de Kwantitatieve PCR werden een aantal genen geselecteerd die een differentiële expressie kenden in de ruimtevaart experimenten MESSAGE 1&2 (*acxC*, *dpsA* en *grpE*) en genen die vermoedelijk betrokken zijn bij mechanische stress (*msrA*, *msrA1*, *msrA2*, *mscL*, *rseB*, *cutA* en *kefA*). Opmerkelijk was dat er voor de 3 MESSAGE-genen een overexpressie werd waargenomen in gesimuleerde micrograviteit. *GrpE* en *acxC* werden hier tot overexpressie gebracht op het maximum van de groeicurve ( $p < 0,05$ ). Het *dpsA*-gen vertoonde een driemaal hogere expressie ( $p > 0,05$ ) tijdens de exponentiële fase in SMG. 2D-gelelektroforese patronen zijn verschillend in de drie testcondities en voorlopig vertoonden 8 proteïnen een opvallende wijziging in expressie bij het vergelijken van SMG en 1 x g controlecondities. De identificatie van deze proteïnen met massaspectrometrie vindt momenteel plaats.

Deze studie toonde aan dat *R. metallidurans* een gewijzigd gedrag vertoont in gesimuleerde micrograviteit. Betreffende de genexpressie werden gelijkaardige resultaten bekomen met ruimtevaart experimenten hetgeen kan wijzen op de toepasbaarheid van de bioreactor als een adequate simulator van micrograviteit. Eenmaal de oorzakelijke mechanismen ontrafeld, kan het onderzoek uitgebreid worden naar micro-organismen die worden teruggevonden in ruimtevaartuigen en ruimtestations (bv. *Staphylococcus* sp. en *Bacillus* sp.). Dit zal toelaten de risico's van microbiële aanwezigheid in te schatten voor ruimtevaart.

Several studies have demonstrated a key role for microgravity and low fluid shear dynamics as an important regulatory signal in bacteria. Improved resistance to antibiotics, enhanced growth rate and yield, higher virulence, increased inter-bacterial conjugation frequency has been observed during space flight experiments. Because spacecrafts and space habitats supporting human space exploration contain a diverse population of microorganisms, these changes may have consequences for survival of the crew and the integrity of the space shuttle. The experiments that can be performed during space flight are limited and subject to many experimental constraints. Therefore, NASA has developed the Rotating Wall Vessel (RWV). This bioreactor generates a low-shear environment that is assumed to be comparable with the microgravity that is experienced during space flight.

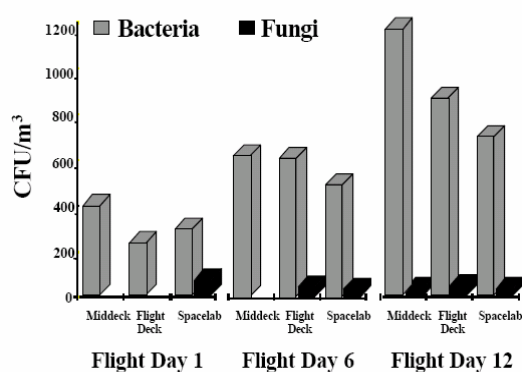
In this study, the RWV has been used to investigate the response of the model organism *Cupriavidus metallidurans* CH34 (formerly *Ralstonia metallidurans*, ATCC 43123) to simulated microgravity and a low-shear environment. We tested three culture conditions *i.e.* simulated microgravity (SMG), the RWV in control position (1 x g) and a classical shake flask culture. The behaviour of the strain is examined using a suite of methodologies *i.e.* classical microbiology, gene expression analysis (Quantitative PCR) and protein expression analysis (2D gel electrophoresis). Compared to classical shake flask cultures, cells cultured in the reactor had a lower growth rate and were subject to less die-off during the stationary phase. Furthermore, the carbon source gluconate was used more efficiently in SMG than in shake flask cultures and the control RWV. Quantitative PCR targeted a set of genes that were differentially expressed in space experiments (MESSAGE 1&2) (*acxC*, *grpE*, *dpsA*) and genes that are envisioned to be involved in mechanical stress (*msrA*, *msrA1*, *msrA2*, *mscL*, *rseB* and *kefA*). The three MESSAGE genes demonstrated an overexpression in simulated microgravity. *GrpE* and *acxC* were overexpressed at the maximum of the growth curve ( $p < 0,05$ ) while *dpsA* showed a three-fold overexpression during exponential growth in SMG compared to the 1 x g control ( $p > 0,05$ ). 2D gel electrophoresis patterns indicate clear differences in protein profiles. At this time, 8 proteins showed a differential expression profile in SMG compared to the control. Currently, these proteins are being identified by mass spectrometry using MALDI-TOF.

This study reported a different behaviour of the testorganism *R. metallidurans* in simulated microgravity compared to control conditions and classical shake cultures. Regarding gene expression, similar observations have been described for simulated microgravity and space conditions. This might indicate the usefulness of the RWV bioreactor as a simulator of microgravity. Furthermore, the mechanisms by which these changes occur have to be unraveled to understand how changes in the dynamic physical forces affect microbes at the molecular, physiological and evolutionary levels. The detailed study of *R. metallidurans* can be extended to other organisms that might pose a threat for the astronaut's health during space flight.

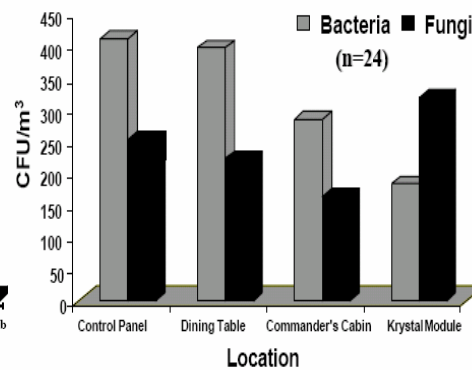
# 1 Micro-organismen in de ruimte

## 1.1 Microbiële contaminatie van het ruimtevaartuig

Ruimtevaartuigen en ruimtestations bevatten diverse populaties micro-organismen (figuur 1 en 2). De aanwezige bacteriën werden zowel voor kortdurende als voor langdurende missies gekarakteriseerd en geïnventariseerd in een uitgebreide databank. *Staphylococcus*, *Micrococcus* en *Bacillus* zijn de meest frequente bacteriële genera teruggevonden in de lucht van ruimtevaartuigen. De oppervlakte van constructiematerialen bevatte hoofdzakelijk *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* en *Bacillus* species [2]. De microbiële aanwezigheid in het ruimtestation Mir werd gedurende 15 jaar bestudeerd door Novikova en medewerkers [3]. Op basis van de 1669 stalen genomen aan boord van Mir, werden 234 bacteriële species en fungi geïdentificeerd. De observaties waren gelijkaardig aan deze in ruimtevaartuigen. Zowel op de oppervlakten van materialen als in de lucht van het ruimtestation waren *Staphylococcus* (53,2% lucht; 55,5% oppervlakte), *Corynebacterium* (16% lucht, 36% oppervlakte), *Bacillus* (34 % lucht; 27,5 %) en *Micrococcus* (13,8% lucht, 24,3% oppervlakte) de meest representatieve species.



*Figuur 1:* Concentraties bacteriën en fungi in de STS-58 shuttle lucht [2]



*Figuur 2:* Concentraties bacteriën en fungi in de lucht van het ruimtestation Mir [2]

Deze microbiële species kennen verscheidene afkomsten. Bemanningsleden vormen de hoofdbron van micro-organismen, de normale flora van een gezond menselijk lichaam is samengesteld uit honderden microbiële species en miljarden individuele micro-organismen [4]. Ook bevoorradingsvehikels, hardware en toebehoren leveren bijkomstige bronnen van micro-organismen.

## 1.2 Potentiële gevolgen van microbiële aanwezigheid in de ruimte

De aanwezigheid van micro-organismen aan boord van zowel bemande als onbemane ruimtevaartuigen kan door de combinatie van de nauwe, afgesloten omgeving van het ruimtevaartuig en de ervaren stress gedurende de ruimtevlucht (versnelling, gewichtsloosheid, radiatie, e.d.), leiden tot ongunstige effecten op de gezondheid van de astronauten en de integriteit van het ruimteschip of habitat [5, 6]. Naast het feit dat micro-organismen ongewenste passagiers zijn aan boord van ruimteschepen en ruimtestations, hebben deze een belangrijke rol in toekomstige life support systemen.

### 1.2.1 Voor de mens

Reizen in de ruimte brengt potentieel veranderingen teweeg in het immuunsysteem van de mens en veroorzaakt mogelijkwerwijs een nieuwe selectiedruk voor endogene en exogene microbiota.

Buiten een lichte daling van de *Corynebacterium* en *Haemophilus* species in keelstalen en enige stijging in  $\alpha$ -hemolytische streptococci en *Staphylococcus aureus* in nasale stalen, werden geen opmerkelijke veranderingen waargenomen in de residente microbiota van de respiratoire tractus. In de fecale stalen werd een daling van het aantal anaërobe bacteriën geobserveerd. Buiten deze observatie werden geen significante wijzigingen van de flora aangetoond ter hoogte van de gastro-intestinale tractus. Urinestalen afgenomen na de vlucht vertoonden echter een significante stijging van het aantal huidcontaminanten evenals potentieel pathogene bacteriën zoals *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* en *Proteus mirabilis* [7]. Deze toenamen zouden kunnen toegekend worden aan het gebrek van persoonlijke hygiëne evenals aan fysiologische wijzigingen van het menselijk lichaam onder ruimte-omstandigheden. De microbiologische resultaten van de Mir-bemanning waren gelijkaardig aan deze van de shuttle leden. Door de nauwe en sterk bevolkte aard van het ruimtevaartuig, bestaat de kans op interindividuele uitwisseling van potentiële pathogenen. Dit werd een aantal maal geobserveerd maar meestal vond geen overdracht van bacteriën plaats.

Verscheidene studies toonden een wijziging aan van het immuunsysteem tijdens ruimtevluchten (zie tabel 1). Leukocytose is één van de meest opvallende bevindingen in astronauten na korte en langdurige vluchten. Vaak is dit te wijten aan een sterke toename van de polymorfonucleaire leukocyten [8]. De proliferatie van lymfocyten als respons op mutagenen en antigenen daalt in afwezigheid van graviteit [9]. De functies van de cytotoxische T-cellen als aanvallers van doelwitcellen en de antigen presenterende rol van macrofagen worden onderdrukt in humane bloedstalen afgenomen in de ruimte [10]. De productie van de cytokines interleukine-1 (IL-1), IL-2 en tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) door culturen van humane perifere bloedleukocyten kent een afname bij ruimtevluchten van meer dan twee weken [11]. De titer van de immunoglobulines A en M verhoogde bij lange ruimtereizen [12], maar bleef constant bij korte reizen [13]. Er wordt vermoed dat de waargenomen wijzigingen van het immuunsysteem niet uitsluitend te wijten zijn aan de micrograviteit. De fysiologische (vibratie, geluid, radiatie, voeding, slaapproblemen, e.d.) en psychologische vormen van stress (angst, isolatie, intense werkactiviteiten, nauwe ruimte, e.d.) tijdens de ruimtevlucht spelen waarschijnlijk een belangrijke rol.

De kans op het ontwikkelen van infectieziekten zal stijgen onder invloed van bepaalde risicofactoren zoals lange ruimtevluchten, een sterk bevolkte omgeving, beperkingen in diagnostische en behandelingstechnologieën, e.d.. Preventieve maatregelen bestaan en bewezen reeds hun nut in huidige en afgelopen vluchtprogramma's [7, 14, 15]. De astronauten zijn buitengewoon gezond en vele infectieziekten (humaan immunodeficiënt virus, tuberculose, hepatitis B en C) waaraan de algemene bevolking is blootgesteld, vormen een beperkt risico voor de astronauten. Meer waarschijnlijk zijn de infecties veroorzaakt door de normale microbiologische flora van de astronauten. Voorbeelden zijn staphylococcale en streptococcale huidinfecties en urineweginfecties met *Escherichia coli* als oorzaak. Latente virussen blijven een risico voor de bemanning wegens hun alomtegenwoordigheid en hun inefficiënte preventieve procedures [16-18]. Klinisch



significante dalingen in immuunrespons zullen leiden tot sterke stijgingen in ziekterisico's [7, 19].

CHANGES IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE NUMBERS OR DISTRIBUTION (STATED AS PERCENTAGE) AFTER SPACE FLIGHT				
Cell type	Change observed after space flight*	n subjects/missions	Days of space flight	Reference
Polymorphonuclear leukocytes†	Neutrophil number significantly ↑ (two-fold)	41/11	3–18	84
	Number significantly ↑ (5000 ± 100 versus 3100 ± 100 cells/μL)	30/6	4–5	92
	Neutrophil number significantly ↑ (~1.5-fold‡)	16/3	8, 9, and 14, respectively	4
	Number significantly ↑ (>2-fold‡)	19/§	10–18	1
	Neutrophil number significantly ↑ (5330 ± 1289 versus 2638 ± 525 cells/μL; 3821 ± 1314 versus 2461 ± 525 cells/μL)	5/2	4–7	3
Monocytes		6/3	11–16	
	Number ↑ (250 ± 280 versus 160 ± 20 cells/μL)	30/6	4–5	92
	Number ↑ or ↓ after different missions	16/3	8, 9, and 14, respectively	4
	Number ±, but significant reduction in the CD14 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> subset relative to the entire monocyte population	19 for peripheral monocytes, 14 for CD14 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> monocyte subset§	10–18	1
	Number ↑ (536 ± 60 versus 357 ± 69 cells/μL; 437 ± 92 versus 332 ± 188 cells/μL)	5/2	4–7	3
T cells (CD3 <sup>+</sup> )	Percentage ± (slightly ↑ in 6, slightly ↓ in 5)	6/3	11–16	
	Percentage slightly, but significantly ↓	11/2	6 and 8	84
CD4 <sup>+</sup> T cells	Percentage ± (↑ in 8, ↓ in 3)	13/§	10–18	1
	Percentage significantly ↓ (23 ± 2 versus 32 ± 2%)	11/2	6 and 8	84
CD8 <sup>+</sup> T cells	Percentage significantly ↓ ‡	30/6	4–5	92
	Percentage ± (↑ in 5, ↓ in 5, ± in 1)	20/§	10–18	1
	Percentage significantly ↓ (12 ± 1 versus 17 ± 1%)	11/2	6 and 8	84
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ratio	Percentage significantly ↓ ‡	30/6	4–5	92
	↑ in 7, ↓ in 4	20/§	10–18	1
B cells	↑ in 23 of 27	11/2	6 and 8	84
	Percentage ± (↓ in 7, ↑ in 4)	27/4	10–18	1
	Percentage ±	11/2	6 and 8	84
Natural killer cells	Percentage ±	30/6	4–5	92
	Percentage ±	13/§	10–18	1
	Percentage ↓ (3 ± 1 versus 9 ± 1%)	10/§	4–5	92
	Percentage ±	13/§	10–18	1

\* Day of re-entry versus before launch.

† Some investigators provided numbers only for neutrophils, a subcategory of polymorphonuclear leukocytes.

‡ The data are represented graphically, making it difficult to determine actual numbers.

§ Number of missions not specified.

↑, increase; ↓, decrease; ±, no statistically significant change occurred.

**Tabel 1:** Effect van ruimte-omstandigheden op verschillende cellen van het immuunsysteem [20]

Ook de werking van het spijsverteringsstelsel wordt verstoord. Bijgevolg kent medicatie ingenomen in micrograviteit geen normale verdeling over het lichaam [21].

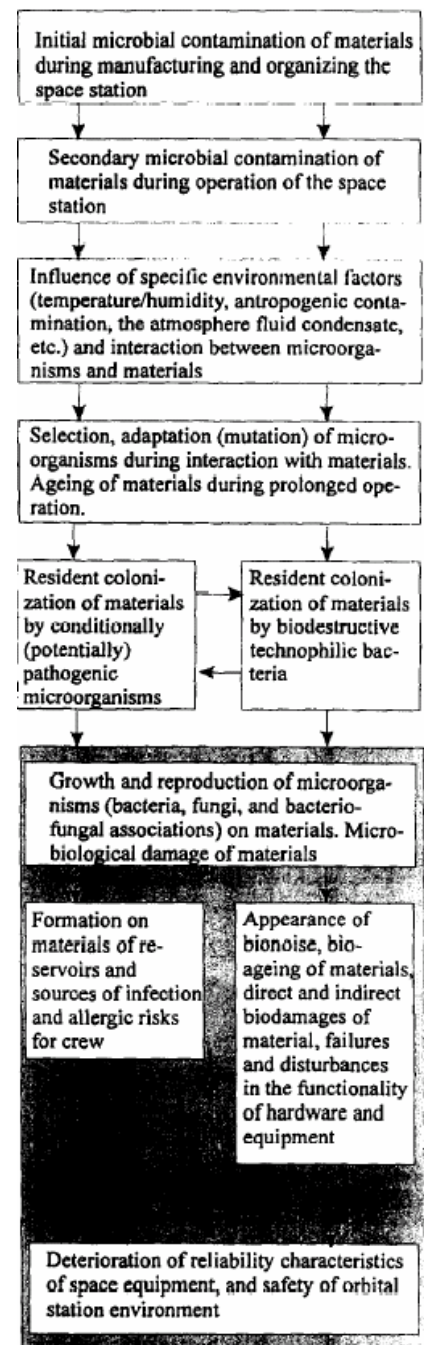
Plantaardige pathogenen kunnen indirect de gezondheid en het prestatievermogen van de astronauten schaden door vernietiging van planten die deel uitmaken van de voedselvoorraad, van systemen voor recyclage van water, lucht of afval.

De microbiële groei op metalen, elektronische componenten, brandstoffen of andere componenten van het ruimteschip resulteren in de productie van vluchtige organische stoffen [22] schadelijk voor de gezondheid.

Het geheel van deze mogelijke gevolgen voor de mens kan in combinatie met de verhoogde groeisnelheid en toegenomen resistentie aan antibiotica van sommige micro-organismen, een toekomstige bedreiging vormen voor het leven in ruimteverblijfplaatsen zoals het Internationaal Ruimte Station (Eng: International Space Station, ISS).

## 1.2.2 Voor het ruimtevehikel

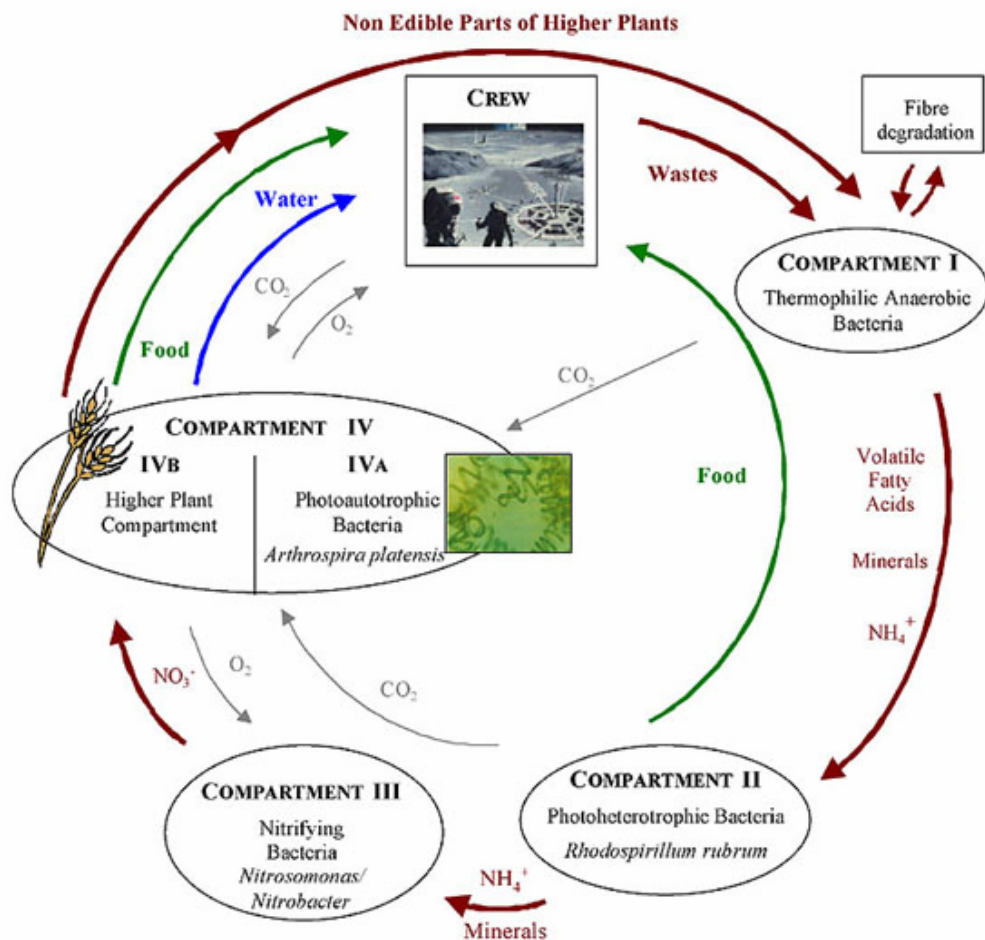
Tijdens langdurige bemande ruimtemissies werden meer dan 100 bacteriële species en fungi geïdentificeerd op de oppervlakten van materialen [23]. Metalen oppervlakten worden frequent bedekt met polymeren om een fysieke barrière te creëren en direct contact tussen het metaal en de omgeving te vermijden. De vorming van microbiële biofilms op deze isolerende laag leidt tot schade ervan en bijgevolg corrosie van het onderliggend metaal. Biofilmvorming op de oppervlakten van materialen is een effectieve overlevingsstrategie van micro-organismen die leven in een natuurlijke omgeving, vnl. onder condities van stress en hongersnood. Polymeren die vermoedelijk biofilmvorming inhouden zijn o.a. verpakkingsmateriaal, elektronische isolatie polyimides en polymerische omhulsels [24]. Sommige van deze polymeren worden sterk gemineraliseerd door zowel aërobe als anaërobe micro-organismen. Anderen worden deels gedegradeerd wat afzwakking van het materiaal tot gevolg heeft resulterend in systeemfalen, verstoringen van het materiaal en de hardware [2, 25]. Het mechanisme van deze degradatie houdt het gebruik in van het polymeer en/of additieven door micro-organismen als koolstof- en energiebron [24]. Dit veroorzaakt directe (gebruik van chemische componenten als nutriënt) of indirecte (productie van o.a. enzymen en zuren) schade. De vorming van biofilms op de oppervlakten van het Russisch Mir Ruimtestation werd geobserveerd. Deze biofilms vormen een gevaar voor de gezondheid van de astronauten. Ook vormen ze een risico voor materialen die in contact zijn met water en lucht in het ruimtestation. Een voorbeeld hiervan is de progressieve destructie van een venster in een Mir-afstammingsmodule dat grotendeels te wijten was aan de groei van *Bacillus polymira*, *Penicillium chrysogenum* en *Aspergillus* species [2, 26]. In orbit vormt de aanwezigheid van micro-organismen op materialen een belangrijke risicofactor voor zowel de bemanning als de integriteit van het ruimteschip. In figuur 3 wordt hiervan een samenvatting gegeven.



**Figuur 3:** Microbiologische risicofactoren bij contaminatie van materialen in het ruimtestation [1]

### 1.2.3 Gebruik van micro-organismen voor recyclage

Langdurige bemande ruimtemissies moeten voorzien worden van grote voedsel-en drank voorraden. Een reis naar de planeet Mars neemt bijvoorbeeld 1000 dagen in beslag. Wanneer 8 personen aan boord zijn van het ruimtevaartuig dient 5 kg water en voedsel per dag voorzien te worden, overeenstemmend met 40 ton bevoorrading voor de heenreis en 40 ton afval voor de terugreis. De brandstof en vereiste ruimte om dit transport te verzekeren is gigantisch. Bijgevolg is men genoodzaakt over te schakelen naar systemen voor recyclage. Het MELiSSA project (Micro-Ecological Life Support System Alternative) heeft dit als doel. Het principe van MELiSSA is gebaseerd op het herbruiken van voedsel, water en zuurstof vanuit afval (faeces, ureum), koolstofdioxide en mineralen. MELiSSA bestaat uit 5 compartimenten (thermofiele anoxygene bacteriën, fotoheterotrofe bacteriën, nitrificerende bacteriën, fotosynthetische bacteriën, planten en de astronauten) die elk hun specifieke rol spelen in het recyclage-proces (zie figuur 4) [27]. Eventuele wijzigingen van het microbiel gedrag van deze bacteriën in ruimte-omstandigheden kunnen kritisch zijn voor deze gesloten kringloop en dienen bijgevolg nauwkeurig ingeschat te worden.



Figuur 4: De MELiSSA-loop [27]

## 1.3 Effect van micrograviteit op micro-organismen

### 1.3.1 Overzicht testorganismen

Het effect van ruimtevluchten op het gedrag van micro-organismen wordt reeds bestudeerd sinds het prille begin van de exploratie van de ruimte door de mens. Wijzingen ter hoogte van de microbiële groei, fysiologie, virulentie en stressresistentie kunnen schadelijke gevolgen impliceren voor de astronauten en de missie. Vermits het aantal en de duur van bemande ruimtevluchten aanzienlijk toeneemt, wordt het onontbeerlijk de effecten van ruimte-omstandigheden op deze microbiële parameters te karakteriseren. Talrijke organismen werden gebruikt als model voor de studie van de effecten van kosmische straling, micrograviteit, vibratie en grote snelheden tijdens verscheidene missies (zie tabel 2).

Prokaryoten	Eukaryoten
<b>Bacteria</b> <i>Actinomyces aureofaciens</i> <i>Actinomyces erythreus</i> <i>Actinomyces levoris</i> <i>Actinomyces streptomycin</i> <i>Aerobacteria aerogenes</i> <i>Aeromonas proteolytica</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Hydrogenomonas eutropha</i> <i>Methylobacterium organophilum</i> <i>Methylomonas methanica</i> <i>Methylosinus sp.</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Ralstonia metallidurans</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptomyces levoris</i>	Protozoa <i>Euglena gracilis</i> <i>Paramecium aurelia</i> <i>Paramecium tetraurelia</i> <i>Pelomyxa carolinensis</i> <i>Tetrahymena periformis</i> <i>Tetrahymena pyriformis</i>
<b>Bacteriofagen</b> <i>Aerobacteria aerogenes</i> phage 1321 <i>Escherichia coli</i> phage T1, T2, T4, T7 and $\lambda$ <i>Salmonella typhimurium</i> phage P-22	Fungi Schimmels <i>Aspergillus niger</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Penicillium roquefortii</i> <i>Phycomyces blakesleeanae</i> <i>Polyporus brumalis</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Trichophyton terrestre</i>
	Gisten <i>Candida tropicalis</i> <i>Rhodotorula rubra</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces vivi</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	Slijmschimmels <i>Physarum polycephalum</i>
	Algen <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella ellipsoidea</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>

Tabel 2: Overzicht van de organismen gebruikt in ruimte-experimenten [28]

De vele beperkingen van dergelijke experimenten zorgden echter voor het uitsluiten van uitgebreide onderzoeken. Hieronder catalogeert men de ontwikkeling van gespecialiseerd materiaal en procedures ten gevolge van de afwezigheid van graviteit evenals logistieke problemen, het vereiste gewicht, de energetische behoeften, de stockage, het beperkt aantal herhalingen en de tijd die de astronaut kan spenderen aan het experiment.

### 1.3.2 Begrip micrograviteit

Om werkelijk een zwaartekracht van nul te ondervinden dient een object zich op een oneindig grote afstand te bevinden van een aantrekkend lichaam. Alle andere condities van gewichtsloosheid zijn het resultaat van een netto som van nul van alle krachten inwerkend op het voorwerp, niet tengevolge van de afwezigheid van graviteit. Een astronaut zal in een ruimtevehikel in orbit nog blootgesteld worden aan ongeveer 94% van de aardse zwaartekracht (op zeeniveau) maar de centrifugale kracht van het orbitale traject van het ruimtevaartuig balanceert de gravitationele kracht waardoor de astronaut geen netto acceleratiekracht ondervindt. Dit wordt ervaren als gewichtsloosheid. Oscillatorische acceleraties van mechanismen in het ruimtevaartuig, de beweging van bemanningsleden evenals zonnwind, luchtdruk, brandstoffen, enz. veroorzaken bijkomende krachten die niet aanwezig zouden zijn in een perfecte gewichtsloze omgeving. Hierdoor kan verondersteld worden dat de g-kracht van deze "bijna gewichtsloze" toestand zich situeert tussen  $10^{-4}$  en  $10^{-6}$  g, overeenstemmend met de term **micrograviteit**.

### 1.3.3 Groeikinetiek

Alle organismen ontstonden in de aanwezigheid van graviteit. Het verdwijnen van de gravitationele versnelling zorgt voor het ontstaan van een nieuwe omgeving voor deze organismen. Wegens hun alomtegenwoordigheid en hun medische betekenis, is het noodzakelijk het gedrag van bacteriën fysiologisch te karakteriseren in micrograviteit. Eventuele veranderingen in groeisnelheden van bacteriën kunnen kritisch zijn voor ruimtemissies. De effecten van micrograviteit op bacteriën tijdens ruimtevluchten werden hoofdzakelijk bestudeerd door evaluatie van groei en overleving van bacteriële kolonies na de vlucht. De observaties zijn sterk variabel. Een onderscheid dient gemaakt te worden tussen vloeibare en vaste kweekmedia, tussen motiele en niet-motiele micro-organismen, tussen rijk en arm medium evenals met additionele factoren zoals het materiaal gebruikt voor het bewaren van de stalen.

#### 1.3.3.1 Vloeibaar *versus* vast medium

In dit opzicht dient het verschil aangehaald te worden tussen de directe en de indirecte effecten van graviteit. Graviteit geeft een gewicht aan de cel en staat in voor de sedimentatie van de cel en/of zijn interne componenten. De graviteit oefent aldus een directe invloed uit op de cel. Graviteit veroorzaakt eveneens wijzigingen in de externe vloeibare omgeving die de cel omgeeft en dit kan indirecte gevolgen impliceren voor de cel. Bij het opkweken van bacteriën in een vloeibaar medium in micrograviteit treedt een betere beschikbaarheid op van nutriënten en vindt een betere verspreiding van afvalproducten plaats. Dit wordt verklaard door de afwezigheid van sedimentatie naar de bodem van de kweekcontainer. Het indirecte graviteitseffect wordt hier opgeheven. Ook kan de lage graviteit een efficiëntere metabolisatie van nutriënten veroorzaken waardoor cellen zich gemakkelijker kunnen vermenigvuldigen. Dit is een direct effect van de micrograviteit [29].

Door de cellen te kweken op een vast medium (waardoor de indirecte effecten worden uitgeschakeld), kon onderzocht worden of de waarnemingen toegekend kunnen worden aan de directe of indirecte effecten van micrograviteit. Culturen van *E. coli* en *B. subtilis* gegroeid op vaste voedingsbodems gaven statistisch identieke finale concentraties in ruimte-omstandigheden en op aarde [30, 31]. Wel vertoonden beide testorganismen een

kortere lag fase in micrograviteit [30]. Bijgevolg kan worden afgeleid dat bacteriën tijdens de ruimtevlucht geen efficiëntere metabolische capaciteiten ontwikkelen wanneer ze gekweekt worden op vaste voedingsbodems.

Mattoni observeerde als eerste dat *E. coli* gekweekt in een vloeibaar medium in de ruimte groeit tot een significant dichtere populatie dan identieke culturen op aarde [32]. Hoewel er meestal een hogere finale celconcentratie wordt waargenomen voor *E. coli* en *B. subtilis* in de ruimte dan onder normale graviteit (1 g) [29, 33-36] wordt dit in sommige onderzoeken niet bevestigd [37, 38]. Ook *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [39] en *Proteus vulgaris* groeiden beter in een ruimte-omgeving [40].

Een aantal publicaties signaleerden een significant kortere lag fase in de ruimte [29, 41]. Vermits de exponentiële fase een ongewijzigde duur kende in deze conditie kan afgeleid worden dat de groeisnelheid in de ruimte hoger is dan op aarde voor de bacteriën *E. coli* en *B. subtilis* [29, 35, 36]. Mennigmann en Heise toonden aan dat de groeisnelheid van *B. subtilis* in orbit oorspronkelijk gelijkaardig was aan dat van grondcontroles maar later steeg tot twee maal de groeisnelheid waargenomen in de controles [42]. Ook de protozoa *Paramecium tetraurelia* bleek sneller te groeien wanneer het gekweekt werd in het ruimtevehikel [43]. Andere studies vonden een groeisnelheid voor *E. coli* in orbit die gelijkaardig was aan grondcontroles [44] of niet significant verschillend [33, 34].

### 1.3.3.2 Motiele versus immotiele bacteriën

Graviteit resulteert in een constante sedimentatiekracht op partikels waarbij de snelheid o.a. afhankelijk is van de dichtheitsverschillen met de omgeving (wet van Stokes). Diffusie impliceert een willekeurige beweging van partikels tengevolge van thermische energie en is onafhankelijk van graviteit. De diffusiekracht werd theoretisch beschreven als een tegenwerkende kracht van sedimentatie voor partikels met een diameter die kleiner is dan 0,5  $\mu\text{m}$  en voor een dichtheitsverschil van zo'n 0,03  $\text{g}/\text{cm}^2$  [45]. Op basis van deze criteria kunnen niet-motiele bacteriën beïnvloed worden door graviteit. Er wordt verondersteld dat motiele bacteriën minder gevoelig zouden zijn aan de indirecte effecten van sedimentatie door hun tegenwerkende zwemmende beweging. Berg and Turner [46] toonden aan dat wild type motiele *E.coli* op een willekeurige manier zwemt met een snelheid van ongeveer 30  $\mu\text{m}/\text{s}$ , terwijl de snelheden tengevolge van sedimentatie en diffusie 0,1 respectievelijk 0,5  $\mu\text{m}/\text{s}$  bedragen [34]. Vermits de beweging van de cel tengevolge van sedimentatie geschat wordt twee grootteordes lager te zijn dan deze van motiliteit, wordt verondersteld dat de afwezigheid van graviteit weinig effect zal hebben op het zwemmend organisme. Voor niet-motiele bacteriën echter, zal de afwezigheid van graviteit de celbeweging beperken tot enkel de diffusie. Dit zal resulteren in een minder gemengde extracellulaire vloeibare omgeving. In functie van de tijd zal deze meer bewegingsloze status de chemische gradiënten die het organisme omgeven wijzigen en zal een fysiologische respons geïnduceerd worden. Een voorbeeld hiervan is het mechanisme verondersteld het einde van de lag fase te induceren: geëxcreteerde cofactoren zoals enzymen dienen een bepaalde concentratie te bereiken in het extracellulair medium alvorens de cellen kunnen verdubbelen [47]. Een daling van het netto massatransport in het medium zou tot een opstapeling van deze componenten leiden in de quasi-stabiele micro-omgeving die de cel omgeeft. Wegens de afwezigheid van convectiestroom en sedimentatie in gewichtsloosheid wordt de vereiste concentratie eerder bereikt. Dit kan een verklaring zijn voor een kortere lag fase in de ruimte. Dit is een typisch voorbeeld van de indirecte effecten van graviteit.

Om effecten ten gevolge van motiliteit te kunnen evalueren, werden de laag motiele bacterie *E. coli* en de zwemmende bacterie *B. subtilis* opgenomen in verschillende ruimte-experimenten. Zoals reeds aangehaald vertoonden beide bacteriën meermaals een verhoogde groeisnelheid, kortere lag fase en groeiden tot hogere celconcentraties in de ruimte. Enkel de lag fase van *B. subtilis* geïncubeerd bij 37 °C bleek onveranderd. Dit kan te wijten zijn aan de motiliteit van de *B. subtilis* cellen in combinatie met de verhoogde temperatuur, vermits bij 23 °C de gewijzigde groeiparameters wel werden geobserveerd [30].

### 1.3.3.3 Rijk versus arm medium

Bouloc and D'Ari spraken de toegenomen groeisnelheid en celconcentratie waargenomen in orbit tegen en vonden geen verschil in groeiparameters tussen ruimtestalen en grondculturen voor *E. coli* [37]. Een aantal bijkomende parameters dienen in acht genomen te worden waaronder het feit dat een minimaal medium gebruikt werd voor dit ruimte-experiment. Ook werd de groeisnelheid als dusdanig niet gemeten maar werd deze afgeleid uit het gemiddelde celvolume. Snelgroeïende cellen zijn breder dan traaggroeïende, waarbij de celgrootte toeneemt met minstens een factor vijf. Bijgevolg geeft het celvolume bepaald op een specifiek tijdstip tijdens de bacteriële groei een goede weergave van de groeisnelheid. Voor groeisnelheden die één verdubbeling per uur niet bereiken (zoals mogelijk het geval bij een minimaal medium), neigt de gemiddelde celmassa constant te blijven. Indien de groeisnelheden in ruimte-en grondcultuur verschillend zijn van elkaar en ze ondergaan één of minder dan één verdubbeling per uur, zal dit verschil niet waarneembaar zijn op basis van enkel het celvolume [48]. Het onderzoeksteam van Gasset [38] gebruikte arm medium voor de kweek van *E. coli* in de ruimte en nam eveneens geen significante verschillen waar in de celgrootte tussen ruimte-en grondstalen. Dit werd niet bevestigd door Kacena et al [29] vermits de kweek van *E. coli* en *B. subtilis* in minimaal medium statische verschillen gaven in de finale celconcentratie voor beide bacteriën. Het celvolume noch de groeisnelheid werden hier geëvalueerd.

### 1.3.4 Productie van antibiotica als secundaire metaboliet

Twee experimenten werden uitgevoerd om de antibioticumproductie in de ruimte te evalueren voor de organismen *Humicola fuscoatra* [49] en *Streptomyces plicatus* (Lams, niet-gepubliceerde data). De eukaryotische schimmel *Humicola fuscoatra* en de myceliale eubacterie *Streptomyces plicatus* produceren respectievelijk de antibiotica monorden en actinomycine D.

De schimmel werd gekweekt in twee verschillende semi-vloeibare agarmedia nl. T8 en PG. In het PG medium werd een toename van 190% in de antibioticumproductie geobserveerd t.o.v. de grondcontroles. Het T8 medium in de ruimte bevatte 30% meer monorden, deze toename was echter niet significant. De grondcontroles toonden een gelijkaardige monorden-productie aan in beide agarmedia. Het verschil tussen beide media zou deze uiteenlopende percentages in de ruimte kunnen verklaren. Het T8 medium is een rijk medium dat Pharmamedia als stikstofbron bevat waardoor het denser is dan PG. De diffusiesnelheid van nutriënten naar de micro-organismen toe zou bijgevolg verschillend kunnen zijn in beide gebruikte media.

Vermits de fungus gekweekt werd in een semi-vloeibaar agarmedium zowel in de ruimte als op aarde, kan de toegenomen antibioticumproductie in de ruimte niet toegekend worden aan een afwezige sedimentatie. Bijgevolg kan een direct effect van gereduceerde graviteit

op het organisme zelf of op subcellulaire processen (zoals een gewijzigde vochtopname vanuit de agar) als mogelijke oorzaak beschouwd worden.

Het *S. plicatus* experiment onderzocht de actinomycine D productie in gedefinieerd en complex medium. De gemiddelde productie van actinomycine D in zowel het gedefinieerde als het complex medium was niet significant verschillend voor de ruimte-en grondstalen. Niettegenstaande was de maximale productie in het complex medium meer dan twee keer hoger dan het maximum bereikt in de grondcontroles.

### 1.3.5 Resistentie aan antibiotica

*Staphylococcus aureus* vertoont een hogere resistentie aan de antibiotica oxacillin, chloramphenicol en erythromycin [50] in ruimte-omstandigheden in vergelijking met grondcontroles. *E. coli* bleek resistenter te zijn aan colistin, kanamycin [50], dihydrostreptomycin [44] en ampicillin (Juergensmeyer, niet-gepubliceerde data). Deze gestegen resistentie aan antibiotica werd meermaals bevestigd [51, 52]. Deze waarnemingen werden gedaan bij kweek in vloeibaar medium, de antibiotica werden toegevoegd tijdens de ruimtevlucht. Verschillende hypothesen werden geformuleerd voor het verklaren van deze data [50]: antibioticaresistentie kan geïnduceerd worden tengevolge van het stimulerend effect van de ruimte op bacteriële multiplicatie. Een tweede mogelijkheid is een wijziging van de celwandpermeabiliteit.

Om de indirecte effecten van micrograviteit tengevolge van het vloeibaar medium uit te schakelen, werden verscheidene bacteriële species in de ruimte gekweekt op vaste agarbodem [53, 54]. Om de langetermijn effecten te bestuderen testten Juergensmeyer et al [54] de resistentie uit van 4 bacteriële culturen die vier maanden verbleven aan boord van het ruimtestation Mir. De bacteriën werden behandeld met 12 soorten antibiotica. *B. subtilis* bleek gevoeliger in de ruimte voor de 12 antibiotica. Buiten penicilline G en rifampicine, hadden alle antibiotica een efficiëntere werking op *E. coli*. *P. aeruginosa* vertoonde geen gewijzigde resistentie. Culturen van *S. aureus* werden resistent aan penicilline G en gevoelig aan polymyxine B in de ruimte. Voor een kortdurende ruimtevlucht toonden Kacena en Todd een ongewijzigde resistentie aan van *E. coli* gekweekt in een vaste agarbodem voor gentamicine [53]. Dit suggereert dat de waarnemingen hun oorsprong vonden in een fysiologisch en niet in een biologisch effect. De wijzigingen in antibioticumresistentie zijn vermoedelijk transiënt vermits reproduceerbaarheid van de resultaten onmogelijk blijkt te zijn na de landing van het ruimtevehikel [52].

Er werden enkele testen gedaan om de antibioticumresistentie van de flora van de bemanningsleden *in vivo* na te gaan [55]. Algemeen kon besloten worden dat bacteriën gecollecteerd tijdens de vlucht een grotere resistentie vertoonden aan antibiotica dan bacteriën afgenomen voor en na de vlucht.



### 1.3.6 Infectiviteit

*Saccharomyces cerevisiae* cellen afkomstig van de Apollo 16 experimenten waren in staat beter te overleven in intradermale lesies van artificieel geïnfecteerde muizen vergeleken met grondcontroles [56].

Verscheidene studies toonden een toegenomen virale reactivatie aan in astronauten als respons op ruimtevlucht. De bestudeerde virussen zijn o.a. Epstein-Barr virus [18], cytomegalovirus [17] en varicella-zoster virus [57].

## 1.4 Microbial Experiment in the Space Station about Gene Expression (MESSAGE)

Het door ESA gesponsorde experiment MESSAGE staat voor "Microbial Experiment in the Space Station About Gene Expression". Het had als doel het bestuderen van de synergetische effecten van micrograviteit en kosmische straling in het ISS op het gedrag van bacteriën. De volgende aspecten werden onderzocht: (1) de stabiliteit en genetische veranderingen van bacteriële genen, (2) de mobiliteit van de bacteriën, (3) de expressie van bacteriële genen en (4) de fysiologische veranderingen van de cellen tijdens hun groei in de ruimte. Het onderzoeksteam van het labo Microbiologie aan het SCK•CEN gebruikte de goed bestudeerde bacterie *R. metallidurans* CH34 in het MESSAGE-experiment. Bacteriële culturen van de stam werden gedurende 10 dagen gekweekt aan boord van het ISS in minimaal vast medium. Proteïnen en RNA werden uit de cellen geëxtraheerd en geanalyseerd. De resultaten bekomen met het eerste MESSAGE experiment (Odyssey Mission, Belgian Taxi Flight, Oktober 2002) werden opnieuw geëvalueerd met een tweede MESSAGE-experiment (Cervantes Mission, Spanish Soyuz Mission, Oktober 2003).

Voor cellen gekweekt in een minimaal medium werden tot nu toe 15 proteïnen geïdentificeerd (met 2D-gelelektroforese) die een overexpressie kenden in ruimteomstandigheden in beide MESSAGE experimenten in vergelijking met grondcontroles (zie tabel 3). Hieronder werden enkele housekeeping proteïnen gekarakteriseerd. De meeste proteïnen die in de ruimte tot overexpressie kwamen vertegenwoordigen waarschijnlijk een specifieke respons op ruimtecondities. Enkele stressgerelateerde proteïnen kenden een overexpressie terwijl de overige een ongewijzigde expressie vertoonden. De meest opvallende inductie in de ruimte werd waargenomen voor het *acxC* gen coderend voor de aceton carboxylase  $\gamma$ -subeenheid [58].

Overexpressie in de ruimte	Functie
House-keeping genen	
<i>TufA</i>	Elongatie factor TU
<i>EftS</i>	Elongatie factor TS
<i>RpsA</i>	30S ribosomale subeenheid S1
<i>RplL</i>	50S ribosomale subeenheid L7/L12
Algemene stress respons genen	
<i>UspA</i>	Universeel stress proteïne
<i>DpsA</i>	DNA bindend en beschermend proteïne
<i>GrpE</i>	Heat shock proteïne P24
Ruimtevlucht specifiek regulon?	
<i>AcxABC</i>	Aceton carboxylase subeenheden A, B en C
<i>ExaC</i>	Acetaldehyde dehydrogenase
<i>LpsJ</i>	Succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA transferase subeenheid B
<i>GlnB</i>	Stikstof regulator PII transcriptie regulator
<i>CaiA</i>	Acyl CoA dehydrogenase
<i>TrxA</i>	Thioredoxine 1
<i>AhpC1</i>	Alkyl hydroperoxide reductase
<i>Ald</i>	Fructose bifosfaat aldolase

Tabel 3: Proteïnen tot overexpressie in MESSAGE 1&2

## **2 Simulatie van micrograviteit**

### **2.1 Beperkingen van experimenten in de ruimte**

Experimenten met betrekking tot het bestuderen van het effect van micrograviteit op micro-organismen kunnen uitgevoerd worden in de ruimte maar zijn geassocieerd met verschillende moeilijkheden en risico's. Ten eerste kan de veiligheid van de astronauten bedreigd worden wanneer gewerkt wordt met levende micro-organismen. Zoals reeds aangehaald bestaan tevens diverse beperkingen die ruimte-experimenten met zich meebrengen zoals vereiste energie, maximaal toegelaten gewicht en volume wegens beperkte stockage faciliteiten, de financiële kosten, de nood aan gespecialiseerd materiaal voor het uitvoeren van experimenten aan boord van ruimtevaartuigen en ruimtestations. Ook ten aanzien van de astronauten bestaan limitaties qua tijd en arbeid die in het experiment gestoken kan worden. De experimenten dienen bijgevolg eenvoudig en snel uitvoerbaar te zijn. Tevens dient de stress gecreeërd tijdens de lancering en de ruimtevlucht in beschouwing genomen te worden: o.a. sterke acceleraties, kosmische straling en vibraties kunnen instaan voor wijzigingen in microbiële fysiologie. Verder dient rekening gehouden te worden met het feit dat de analyse van de stalen slechts mogelijk is enige tijd na het beëindigen van het experiment wat een mogelijke invloed inhoudt voor de resultaten.

Talrijke ruimte-experimenten bevestigden dat ruimtevlucht een effect heeft op een variëteit van microbiële parameters zoals microbiële groei, morfologie, metabolisme, gentransfer en virale reactivatie. Echter zorgden de experimentele limitaties evenals onduidelijke, soms niet-reproduceerbare observaties voor het uitsluiten van grondig inzicht in de mechanismen verantwoordelijk voor deze microbiële responsen. Gezien deze onderzoeksmoeilijkheden, is men genoodzaakt over te schakelen naar technieken die op aarde bepaalde aspecten van de ruimte, zoals micrograviteit, nabootsen.

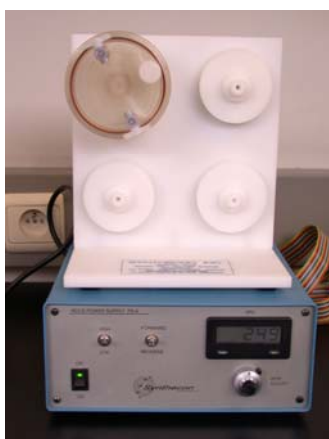
### **2.2 Micrograviteit op aarde**

#### **2.2.1 "Drop towers" en parabolische vluchten**

De afwezigheid van graviteit is gebaseerd op het balanceren van de zwaartekrachtsvector met een fictieve kracht, resulterend in een nettokracht van nul. In orbit was deze kracht, zoals eerder vermeld, de centrifugale kracht. Ook op aarde is het mogelijk om een omgeving te creëren arm aan graviteit. Deze conditie wordt bekomen wanneer een object zich bevindt in vrije val. Op dit ogenblik is de enige kracht inwerkend op het object de zwaartekracht. De inertie van het object zorgt echter voor een tegengestelde, fictieve kracht om de acceleratie tegen te gaan. Dit resulteert in een nettokracht, door het object ervaren, van nul in vrije val, overeenstemmend met micrograviteit.

NASA gebruikt verschillende technieken om micrograviteitscondities te creëren. De meest bekende is het KC-135 vliegtuig dat parabolische vluchten maakt. Hierdoor creëert men een omgeving van micrograviteit gedurende 20 tot 25 seconden. Ook de NASA's "Drop towers" zijn simulators van micrograviteit. Dit zijn brede lege schachten van ongeveer 150 m die een vrije val van ongeveer 5 seconden toelaten. De duur van deze experimenten is echter te kort voor microbiële onderzoek.

## 2.2.2 Simulatie van micrograviteit a.d.h.v. de Rotating Wall Vessel



*Figuur 5:* Rotating wall vessel

De NASA biotechnologie groep uit het Johnson Space Center in Houston, Texas ontwikkelde het Rotating Wall Vessel (RWV) cultuurapparaat (zie figuur 5) als nieuwe vorm van suspensiecultuur die een omgeving creeert arm aan wrijving en turbulentie [59, 60]. Deze technologie zou toelaten bepaalde aspecten van ruimtevlucht (nl. micrograviteit) na te bootsen.

De RWV bioreactor is een geoptimaliseerde suspensiecultuur bestaande uit een holle cilinder volledig gevuld met medium waardoor geen luchtbellens kunnen ontstaan. Het wentelt om een as parallel aan de grond (of loodrecht t.o.v. de gravitationele krachtvector). Na een korte opstartperiode wordt de rotatiesnelheid van de wand van de bioreactor radiaal en inwaarts overgebracht zodat het medium roteert als een vaste massa met een snelheid die gelijk is aan de rotatiesnelheid van de wand. Hoewel de graviteit aanwezig blijft, wordt de g-vector continu gereoriënteerd door het feit dat vloeistof en cellen samen roteren als een vaste massa. Deze constante rotatie resulteert in een gemiddelde g-vector van ongeveer nul ( $10^{-2}$  g) over één omwenteling. Deze resultante kracht wordt **gesimuleerde micrograviteit** (Eng: Simulated Microgravity, SMG) genoemd.

Onder deze cultuurcondities worden de cellen in suspensie gehouden en wordt een omgeving met een lage wrijving en turbulentie bekomen [60, 61]. Een gas-permeabel membraan aan de ene zijde van de RWV bioreactor maakt een constante luchtuitwisseling mogelijk tijdens de groei.

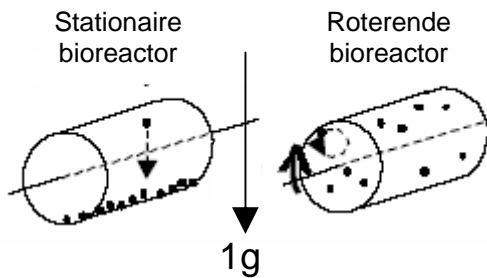
De gesuspendeerde partikels vormen kleine circulaire banen (zie figuur 6) waarvan de omtrek overeenkomt met de afstand dat het deeltje gesedimenteerd zou hebben in een normale vloeibare omgeving tijdens één omwentelingsperiode. De sedimentatiesnelheid wordt bepaald door de Navier-Stokes vergelijking:

$$V_{\text{sed}} = 2/9 (\rho_{\text{partikel}} - \rho_{\text{vloeistof}}) (g/\mu) a^2$$

- $\rho_{\text{partikel}}$  = densiteit van het partikel ( $\text{g/cm}^3$ )
- $\rho_{\text{vloeistof}}$  = densiteit van het vloeibare medium ( $\text{g/cm}^3$ )
- $g$  = graviteit ( $980 \text{ cm/s}^2$ )
- $\mu$  = viscositeit van het medium ( $\text{kg/ms}$ )
- $a$  = effectieve Stokes straal (cm)  
[ $a = (3V/4\pi)^{1/3}$  met  $V = \text{celvolume (cm}^3\text{)}$ ]

De afstand die een cel sedimenteert ( $y$ ) in een bepaalde tijd ( $t$ ) wordt geschat a.d.h.v. de formule:

$$y = V_{\text{sed}} \cdot t$$

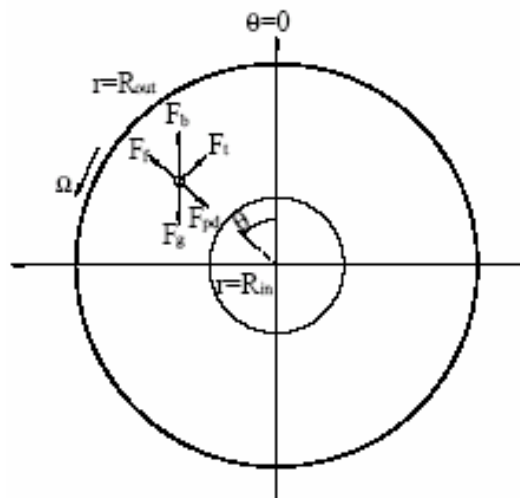


*Figuur 6:* Beweging van een partikel in een stationair recipiënt en tijdens rotatie in de RWV [61]

Wanneer de RWV wordt gebruikt als simulator van micrograviteit, worden deze cirkelbanen echter geminimaliseerd en bijgevolg verwaarloosd door het instellen van een adequate rotatiesnelheid (zie 2.2.3. Rotatiesnelheid). De aldus bekomen bewegingsloze toestand van de cellen relatief aan de omgevende vloeistof is analoog aan de extracellulaire omgeving in gewichtsloosheid.

Bij het gebruik van de RWV als geoptimaliseerde suspensiecultuur wordt er niet gestreefd naar de eliminatie van de cirkelbanen vermits deze uitwisseling van nutriënten en verspreiding van afval en opgeloste gassen bevorderen, ideaal voor groei van cellen.

De krachten die objecten beïnvloeden in de RWV werden in detail bestudeerd. De partikels of cellen in de RWV bevinden zich constant in suspensie doordat de hydrodynamische krachten de sedimentatiekrachten van de bacteriën uitschakelen in de reactor. Bijgevolg "vallen" de organismen met een constante maximale snelheid zonder de mogelijkheid te krijgen zich te vestigen op de bodem van de bioreactor. De krachten die op een partikel in de bioreactor inwerken, worden weergegeven in figuur 7.



*Figuur 7:* Schematische voorstelling van de krachten inwerkend op een deeltje in de RWV [62]

- $F_g$  = zwaartekracht
- $F_b$  = drijfkracht
- $F_{pd}$  = centripetale kracht
- $F_f$  = wrijvingskracht tussen het partikel en de vloeistof in radiale richting
- $F_t$  = wrijvingskracht tussen het partikel en de vloeistof in tangentiële richting
- $R_{out}$  = straal van de bioreactor ( $R_{in}$  is de binnenstraal, echter de reactor in figuur 5 bevat geen centrale opening)
- $\Omega$  = rotatiesnelheid (rpm)

Bij het roteren van de RWV zullen de partikels sterk beïnvloed worden door de visceuze sleepkracht en de neiging hebben te roteren samen met het vloeibaar medium. De beweging relatief t.o.v. de roterende vloeistof wordt bepaald door een evenwicht van hun gravitationele en centrifugale krachten in samenhang met krachten uitgeoefend door de vloeistof evenals drijfkrachten afhankelijk van het dichtheidsverschil tussen de partikels en de vloeistof.

Vermits het RWV apparaat een omgeving creeërt arm aan wrijving dat bepaalde aspecten van de ruimte simuleert, wordt er geopteerd voor de terminologie **Low-Shear Modeled MicroGravity** (LSMMG).

### 2.2.3 Rotatiesnelheid van de RWV

Het bepalen van de boven- en onderlimiet van de snelheid waarmee de RWV roteert, is noodzakelijk om de gesuspendeerde partikels in een staat van relatieve bewegingsloosheid te houden. Indien de rotatie te traag is, zal het partikel vallen tengevolge van graviteit. Bij een te hoge rotatiesnelheid wordt het deeltje gecentrifugeerd naar de wand van het recipiënt. Ook de Browniaanse beweging of diffusie van het partikel dient in acht genomen te worden. Deze beweging wordt veroorzaakt door de thermische energie en is onafhankelijk van graviteit. Zelfs in een volledig gewichtsloze omgeving bewegen partikels willekeurig met een bepaalde snelheid afhankelijk van hun grootte en de viscositeit van de omgevende vloeistof. De gemiddelde afstand dat een deeltje zal afleggen in een bepaalde tijd werd geformuleerd door Einstein:

$$\langle r \rangle = \sqrt{6Dt}$$

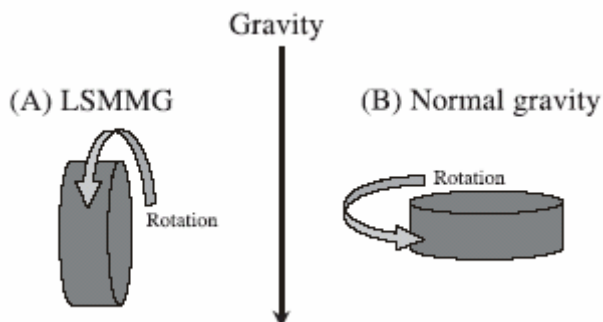
met  $\langle r \rangle$  = gemiddelde diffusieafstand (cm)  
D = diffusie coëfficiënt (cm<sup>2</sup>/s)  
t = tijd (s)

Deze beweging wordt aanzien als achtergrond. De selectie van een geschikte rotatie-snelheid impliceert dat de beweging van de bacteriën tengevolge van sedimentatie en centrifugatie valt binnen de grenzen van de Browniaanse achtergrond. Een adequate minimum snelheid kan berekend worden zodat het circulaire pad van de cel tijdens de rotatie beperkt wordt tot een cirkel met straal x (afgelegde diffusieafstand) die rekening houdt met elke diffusierichting van het partikel tijdens een tijd t overeenkomstig met één omwentelingsperiode. Deze conditie wordt gedefinieerd als **functionele gewichtsloosheid**. De maximale rotatiesnelheid wordt berekend rekening houdend met de centrifugale kracht op de cel [63].

Zoals eerder aangehaald dient opgemerkt te worden dat er naar deze ideale snelheid gestreefd wordt indien de RWV wordt gebruikt om micrograviteit na te bootsen. Bij de toepassing als suspensiecultuur hoeft de circulaire beweging tengevolge van sedimentatie en centrifugatie niet binnen de grenzen te liggen van de Browniaanse achtergrond. Deze beweging laat een constante menging van het medium toe.

## 2.2.4 Oriëntatie van de bioreactor

Wanneer de rotatie-as loodrecht staat t.o.v. de zwaartekrachtrichting, wordt micrograviteit gesimuleerd door het randomiseren van de zwaartekrachtsvector. Bij het plaatsen van de bioreactor in een horizontale "controle" positie (rotatie-as is parallel aan de graviteitsvector), benadert de resultante van de graviteitsvector niet meer nul en heerst er een normale graviteit ( $1 \times g$ ) in het recipiënt (zie figuur 8). Ook in deze oriëntatie heerst er een lage wrijving en turbulentie. De LSMMG en de normale graviteit condities in de bioreactor zijn bijgevolg identiek op de oriëntatie van het apparaat na.



Figuur 8: Oriëntatie van de bioreactor resulterend in een LSMMG (A) of normale (B) zwaartekracht omgeving [64]

## 2.3 Effect van gesimuleerde micrograviteit op bacteriën

### 2.3.1 Productie van antibiotica als secundaire metaboliet

De unicellulaire aërobe bacterie *Bacillus brevis* staat in voor de productie van gramicidin S (GS). Dit is een cyclisch decapeptide antibioticum dat tijdens de late logaritmische en vroege stationaire fase van de celgroei geproduceerd wordt. De antibioticumproductie werd vergeleken in normale graviteits- en gesimuleerde micrograviteitsomstandigheden gebruik makend van de roterende bioreactor, gepositioneerd in horizontale respectievelijk verticale stand [65, 66]. Beiden vertoonden geen verschil waaruit afgeleid kon worden dat de GS productie niet beïnvloed wordt door de positie van de bioreactor. In vergelijking met een klassieke schudcultuur, vertoonden de bacteriën gekweekt in de RWV recipiënten wel een hogere antibioticumproductie. De productie van dit antibioticum wordt waarschijnlijk beïnvloed door de wrijvingskracht, de turbulentie en/of de vorm van het recipiënt waarin de kweek plaatsvindt. Opmerkelijk is dat het repressieve effect van glycerol op de gramicidin productie door *B. brevis* niet werd geobserveerd tijdens de cultuur in de RWV.

Bij de organismen *Streptomyces clavuligerus*, *E. coli* en *Streptomyces hygroscopicus* werd de productie van de antibiotica cephalosporine, microcin B17 en rapamycine respectievelijk geïnhibeerd in gesimuleerde micrograviteit [66-71]. Tevens werd het repressieve effect van glucose op de microcin B17 productie door *E.coli* sterk gereduceerd in beide RWV [70].

Hieruit kan afgeleid worden dat de repressie ten gevolge van de koolstofbronnen glycerol en glucose op de antibioticumproductie van *B. brevis* respectievelijk *E.coli* beïnvloed wordt door het kweken van de bacteriën in een RWV-recipiënt, zowel in de LSMMG als  $1 \times g$  oriëntaties.

Een andere bevinding was dat de plaats van accumulatie van microcin B17 verschillend is wanneer bacteriën gekweekt worden in de RWV vergeleken met schuddende Erlenmeyers. Bij dit laatste werd een intracellulaire accumulatie waargenomen in tegenstelling tot een

extracellulaire stockage in de RWV [68]. Vermoedelijk is deze wijziging te wijten aan een lagere graad van wrijving in de RWV-recipienten. Dit werd bewezen door de toevoeging van één enkele glasparel aan het RWV medium die leidde tot een hoofdzakelijk intracellulaire accumulatie van het antibioticum in LSMMG omstandigheden i.t.t. extracellulaire opstapeling in de 1 x g RWV. De glasparel veroorzaakt namelijk een stijging van de wrijving in een LSMMG-omgeving door constante redistributie en niet in de 1 x g RWV vermits sedimentatie van de parel optreedt. Ook werd een sterke verhoging van de microcin B17 productie waargenomen in gesimuleerde micrograviteit na het toevoegen van de glasparel. Andere stressfactoren zoals ethanol hadden geen stijging in microcin B17 productie tot gevolg [71].

### 2.3.2 Resistentie aan stress

In het algemeen stemt de mogelijkheid van een pathogeen organisme om bestand te zijn tegen omgevingsstress zoals extreme wijzigingen in pH, osmolariteit en temperatuur overeen met zijn virulentie [72]. Recente studies toonden aan dat *S. enterica* serovar Typhimurium gekweekt in LSMMG meer resistent was aan zure, osmotische en thermische stress evenals een verhoogde mogelijkheid had om in macrofagen te overleven [73, 74]. Dit kan de waargenomen verhoogde virulentie verklaren van het organisme in gesimuleerde micrograviteit. Echter stelde men ook vast dat het organisme meer gevoelig was aan oxidatieve stress in deze omstandigheden [73]. Ook in *E.coli* werd een gewijzigde stressresistentie waargenomen in LSMMG. Het organisme blijkt hier meer resistent te zijn aan de groei-inhiberende effecten van ethanol in vergelijking met klassieke schudculturen en vertoont eveneens een hogere resistentie aan osmotische en thermische shock t.o.v. cellen gekweekt in een horizontaal gepositioneerde roterende bioreactor [71].

*RpoS* (RNA polymerase sigma factor) is de belangrijkste sigma factor verantwoordelijk voor de expressie van genen vereist voor de resistentie aan omgevingsstress en werd reeds beschreven als de hoofdregulator van de algemene stressrespons van *E.coli* en *Salmonella enterica* [75, 76]. *RpoS*-deficiënte stammen zijn zeer gevoelig aan een brede waaier van omgevingsstress. Ook zijn *S. enterica rpoS*-mutanten avirulent in het muismodel van infectie. Dit is hoogstwaarschijnlijk een gevolg van de deficiënte expressie van diverse genen vereist voor een complete pathogeniciteit [77-80]. Wegens de centrale rol van *rpoS* in de stressresistentie en de virulentie van *S. enterica* werden de effecten van een LSMMG-omgeving onderzocht op de stressresistentie van een *S. enterica* serovar Typhimurium *rpoS*-mutant [73]. Een verschillende observatie werd verwacht tussen de mutant en de wild-type stam. Deze voorspelling werd niet bevestigd vermits *rpoS* niet vereist bleek te zijn voor de stressresistentie tijdens de exponentiële groeifase wanneer *S. enterica* gekweekt werd in LSMMG omstandigheden. Dezelfde fysiologische responsen werden waargenomen voor zure, osmotische, thermische en oxidatieve stress voor de wild-type en de *rpoS*-mutant. De gewijzigde fenotypes geassocieerd met de LSMMG in *S. enterica* serovar Typhimurium vinden plaats via een *rpoS*-onafhankelijke route. Micro-array analyse toonde aan dat 25 genen, die deel uitmaken van het *rpoS*-regulon, een ongewijzigde expressie vertoonden in LSMMG.

Een gelijkaardig experiment werd uitgevoerd voor *E. coli* [81]. Hier werden zowel de exponentiële als de stationaire fase van de groeicyclus geanalyseerd. Bij blootstelling aan een hoge concentratie natriumchloride stierf tijdens de exponentiële fase het grootste deel van de cellen gekweekt in normale graviteit i.t.t. de helft van de cellen in gesimuleerde micrograviteit (LSMMG). Dit werd waargenomen voor zowel de wild-type als de *rpoS*-mutante stammen. Tijdens de stationaire fase vertoonden de wild-type cellen gekweekt in de roterende bioreactor een blijvende stijging in resistentie aan deze osmotische stress (ongeveer 100% overleving),

terwijl de mutante stam niet resistent was. In deze fase was er zelfs geen significant verschil aantoonbaar tussen de mutanten in normale graviteit en gesimuleerde micrograviteit. Een blootstelling aan een lage pH (3,5) gaf gelijkaardige resultaten. Hieruit kan besloten worden dat hoewel de gesimuleerde micrograviteit resistentie verleent aan zowel osmotische als lage pH-stress in beide groeifasen, deze resistentie onafhankelijk is van de sigmafactor in de exponentiële fase maar ervan afhankelijk tijdens de stationaire fase. Vermits LSMMG de *E. coli* cellen resistent maakt volgt hieruit dat het effect van micrograviteit op de bacteriële resistentie een grote zorg kan wanen voor ruimte-expedities.

### 2.3.3 Groeikinetiek

Het kweken van *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in LSMMG in minimaal medium toonde een verkorte generatietijd aan (25 à 30 minuten korter in vergelijking met 1 x g omstandigheden) [73]. Wanneer rijk medium werd gebruikt, werden identieke groeiparameters bekomen voor de LSMMG en de 1 x g condities. De combinatie van een minimaal medium en LSMMG blijkt een toegenomen metabolische activiteit in *Salmonella* te veroorzaken, hetgeen de groei stimuleert. De specifieke route en genen hierbij betrokken zijn nog niet gekend. Wel werden m.b.v. microarray verschillende genen gekarakteriseerd die een mogelijke rol spelen bij de waargenomen wijziging in metabolisme van *S. enterica* in LSMMG [74]. Hun exacte rol is echter nog niet bepaald.

Twee *E. coli* stammen reageerden verschillend in gesimuleerde micrograviteit. *E. coli* AMS6 vertoonde in minimaal medium een verhoging van het totaal celgewicht [68] terwijl *E. coli* (ATCC 4157) ongewijzigde groeiparameters kende in gesimuleerde micrograviteit in vergelijking met 1 x g controles [81].

De motiele bacterie *Sphingobacterium thalpophilium* vertoonde geen verschillen in groei bij het vergelijken van SMG en 1 x g condities, zowel in arm als rijk medium [82]. De immotiele bacterie *Ralstonia picketti* bleek echter beter te groeien in gesimuleerde micrograviteit wanneer dit organisme gekweekt werd in rijk medium. Het gebruik van minimaal kweekmedium leverde echter geen verschillen op in totaal celaantal [82].

De observaties in groei zijn bijgevolg sterk afhankelijk van het bacteriële genus en de stam.

### 2.3.4 Virulentie

Het kweken van *S. enterica* in LSMMG veroorzaakt een verhoogde virulentie in dit pathogeen organisme [83]. Een daling van de lethale dosis 50 (LD<sub>50</sub>), een kortere overlevingstijd en een toegenomen kolonisatie van lever en milt na orale infectie in de muis werden geobserveerd in gesimuleerde micrograviteit. De moleculaire mechanismen verantwoordelijk voor deze LSMMG-geïnduceerde stijging in virulentie zijn niet gekend. Micro-array analyse toonde geen inductie aan van gekende *Salmonella* virulentiefactoren [74]. Wel werd een daling waargenomen van de expressie van verschillende genen die deel uitmaken van de twee belangrijkste *Salmonella* pathogeniciteitseilanden (SPI-1 en SPI-2). De mogelijkheid bestaat dat LSMMG nieuwe *Salmonella* virulentie mechanismen induceert.



### 2.3.5 Genexpressie: het Low Shear Modeled Micro Gravity regulon

2D gelelektroforese toonde aan dat de expressie van talrijke *Salmonella* proteïnen gewijzigd is wanneer de cellen worden gekweekt in LSMMG-omstandigheden [83]. Ook DNA-microarrays werden gebruikt om de globale transcriptionele respons van *S. enterica* op LSMMG in te schatten [74]. Bij het vergelijken van de genexpressie in de horizontaal en verticaal geplaatste RWV treedt er een differentiële genexpressie op voor 163 genen in het *Salmonella* chromosoom. Deze studie wijst aan dat LSMMG een belangrijk regulatorisch signaal is in *Salmonella*.

*E. coli* gekweekt in gesimuleerde micrograviteit vertoont meer dan 100 genen die tot over-of onderexpressie komen in vergelijking met klassieke schudculturen. De meest opvallende overgeëxprimeerde genen zijn o.a. *araD* (coderend voor L-ribulose-5-fosfaat-4-epimerase), *marA* (multipel antibiotica resistentie proteïne) en *hisM* (transport en bindingsproteïne). De genen die tot onderexpressie gebracht worden in LSMMG zijn o.a. *araH* (een L-arabinose transport systeem permease proteïne), *imp* (een organisch solvent tolerantie proteïne precursor), *trg* (coderend voor een methyl-accepterend chemotaxis proteïne) en *caiE* (coderend voor het carnitine operon proteïne) [84].

Ook in de celwandhoudende eukaryote gist *Saccharomyces cerevisiae* werd een verschil in de expressie van talrijke genen waargenomen bij cultivatie in LSMMG [85].

### 2.3.6 Overzicht van de LSMMG-geïnduceerde effecten

Fysiologische effecten geïnduceerd door LSMMG	Bacteriële soort	Referenties
<b>Gewijzigde productie secundaire metabolieten</b>		
<b>Inhibitie</b>		
Cephalosporin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	[67]
Microcin B17	<i>Escherichia coli</i>	[68]
Rapamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	[69]
<b>Inhibitie repressie door koolstofbron in RWV (zowel LSMMG als NG)</b>		
Gramicidin S (glycerol)	<i>Bacillus brevis</i>	[65]
Microcin B17 (glucose)	<i>Escherichia coli</i>	[70]
<b>Toename extracellulaire accumulatie</b>		
Microcin B17	<i>Escherichia coli</i>	[68]
Rapamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	[69]
<b>Gewijzigde stressresistentie</b>		
Toename ethanol stress resistentie (vs. schudcultuur)	<i>Escherichia coli</i>	[71]
Toename osmotische en thermische shock (vs. 1 x g)	<i>Escherichia coli</i>	[71]
Toename zure, osmotische, thermische stressresistentie	<i>Salmonella typhimurium</i>	[83], [73]
Afname oxidatieve stress (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) resistentie	<i>Salmonella typhimurium</i>	[73]
<b>Afname generatietijd in minimaal medium</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>	[73]
	<i>Escherichia coli</i>	[68]
<b>Toename overleving in J774 macrofagen</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>	[83]
		[73]
<b>Toename virulentie in muismodel van infectie (afname LD50, afname gastheer tijd tot overlijden, toename kolonisatie van lever en milt)</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>	[83]
<b>Algemene gewijzigde genexpressie (LSMMG regulon)</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>	[83], [74]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[85]
	<i>Escherichia coli</i>	[84]

Tabel 4: Overzicht van de LSMMG-geïnduceerde effecten

## 2.4 De RWV als menselijk lichaam

Bij het kweken van cellen volgens de klassieke methoden (petrischalen of flessen) vindt groei plaats in tweedimensionele lagen. De *in vitro* gekweekte cellen gedragen zich niet als cellen in het menselijk lichaam. *In vivo* gekweekte cellen groeien driedimensioneel en vormen weefsels die uit cellen bestaan met een gewijzigde, gespecialiseerde functie. *In vitro* gekweekte cellen specialiseren noch differentiëren zich in normale omstandigheden. Dit zorgt voor beperkingen indien men mechanismen wenst te begrijpen die verband houden met celgedrag en weefselvorming. Zoals eerder aangehaald kan de RWV, naast zijn functie als simulator van micrograviteit, tevens gebruikt worden als geoptimaliseerde suspensiecultuur. Oorspronkelijk werd dit toestel hiervoor ontwikkeld. Vermits cellen voortdurend in suspensie blijven, kunnen ze zich verenigen en weefsels vormen die meer lijken op weefsels in het lichaam.

Tegenwoordig is er een stijgende interesse voor de roterende bioreactor. Zestien projecten zijn huidig aan de gang binnen het National Institutes of Health (NIH). De studies resulteerden reeds in de succesvolle cultuur van verschillende infectieuze agenten die moeilijk kweekbaar zijn onder normale omstandigheden waaronder de parasiet *Cyclospora* die ernstige gastro-intestinale stoornissen veroorzaakt na orale inname. De weefselstalen gekweekt in de RWV worden gebruikt voor het aanmaken van therapeutische stoffen of antilichamen. Ook werd het humane immunodeficiëntie virus (HIV-1) gekweekt in lymfoïd weefsel in de bioreactor. Dit laat wetenschappers toe de dynamische processen van het virus te observeren in omstandigheden die sterk lijken op de natuurlijke omgeving. Dit kan toelaten de ziekte vanuit een nieuwe invalshoek te bekijken en mogelijke behandelingen opleveren. Het ontwerpen van weefsels voor transplantaties boekt tevens vooruitgang. Zo is er bijvoorbeeld een project aan de gang dat als doel heeft het kweken van menselijke pancreatische eilandjes van Langerhans-cellen voor transplantatie in diabetes patiënten. Huidig wordt de roterende bioreactor gebruikt voor het kweken van gedifferentieerde pancreatische cellen, omgeven door membranen bestaande uit zeewier, om ze aanvaardbaar te maken voor het menselijke immuunsysteem. Deze omkapselde cellen worden heden ten dage getest in humane patiënten. Eens getransplanteerd zijn de cellen verondersteld een adequate hoeveelheid insuline te secreteren voor de regulatie van de glycemie. In de RWV zal het kleine aantal pancreatische cellen verkregen uit donoren vermenigvuldigd worden tot een concentratie aan cellen vereist voor de behandeling van diabetes patiënten (Educational brief: NASA's Bioreactor: Growing cells in a microgravity environment, [spaceresearch.nasa.gov/sts-107/resourceguide/content/science/bioreactor/info/EdBriefBioreactor.pdf](https://spaceresearch.nasa.gov/sts-107/resourceguide/content/science/bioreactor/info/EdBriefBioreactor.pdf)).

### 3 Doelstelling

Er werd reeds aangetoond dat ruimtevaart een toestand creeert die bacteriën aanzet tot het wijzigen van groei, genexpressie en stressrespons. Ook de mens ondervindt biologische veranderingen ter hoogte van o.a. het immuunsysteem. Een combinatie van deze factoren kan de veiligheid van langdurige bemande ruimtevluchten in het gedrang brengen. Het is belangrijk om de mechanismen, die aan de oorsprong liggen van deze veranderingen, nauwkeurig te karakteriseren en de gevolgen ervan in te schatten.

De Rotating Wall Vessel (RWV) laat toe bepaalde aspecten van ruimtevlucht na te bootsen. In deze bioreactor wordt een omgeving met een lage wrijvingskracht bekomen die vergelijkbaar is met de micrograviteit ervaren tijdens ruimtevaart. In dit eindwerk wordt gebruik gemaakt van de roterende bioreactor om de respons van het modelorganisme *Cupriavidus metallidurans* CH34 (voorheen *Ralstonia metallidurans* ATCC 43123) op gesimuleerde micrograviteit te onderzoeken. De groei, genexpressie, substraatverbruik en proteïne-expressie worden opgevolgd in dit screeningsexperiment. De studie van het gedrag van een modelorganisme kan bijdragen tot het begrijpen van de cellulaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de respons op mechanische signalen uit de extracellulaire omgeving. Tot slot kan de RWV als simulator van micrograviteit geëvalueerd worden door de resultaten bekomen in gesimuleerde micrograviteit te vergelijken met de resultaten verzameld tijdens de ruimtevaart experimenten MESSAGE 1&2. Hierbij werd *R. metallidurans* gedurende 10 dagen gekweekt in het ISS.

### 4 Materiaal en methoden

#### 4.1 *Ralstonia metallidurans* CH34

##### 4.1.1 Algemene eigenschappen *R. metallidurans* CH34

*Ralstonia metallidurans* CH34 is een aërobe gram-negatieve chemolithotrofe bacterie behorend tot de klasse van de niet-sporulerende  $\beta$ -proteobacteriën. Oorspronkelijk was dit organisme gekend onder de naam *Alcaligenes eutrophus*, achteraf werd het *Ralstonia eutropha* genoemd. Recent werd de taxonomie van de bacterie herbekeken [86] waardoor *R. metallidurans* tegenwoordig gekend is als *Cupriavidus metallidurans*.

*R. metallidurans* koloniseert industriële sedimenten, bodems en afval met een hoog gehalte aan toxische zware metalen. De referentiestam CH34 werd voor het eerst geïsoleerd in 1976 in een klaringsbekken van een zinkindustrie in België, dichtbij Luik. De stam CH34 is drager van twee grote plasmiden (pMOL28 en pMOL30) die beide verscheidene metaalresistentiegenen bevatten. Hierdoor is de stam resistent aan diverse zware metaalionen nl. Cadmium (Cd), Cobalt (Co), Zink (Zn), Thallium (Tl), Koper (Cu), Lood (Pb), Nikkel (Ni), Kwik (Hg) en Chromaat ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ). De resistentie aan Cd, Zn en Co wordt toegekend aan pMOL30 (czc-locus), terwijl resistentie aan Co, Ni en  $\text{CrO}_4^{2-}$  gelinkt is aan het plasmide pMOL28. Beide plasmiden coderen tevens voor Tl en Hg-resistentie. De optimale groeitemperatuur bedraagt 30°C, de maximale temperatuur waarbij groei geobserveerd werd is 37°C. *R. metallidurans* CH34 is een geschikt recipiënt voor vreemde genen via plasmide-gemedieerde mobilisatie van genen tussen verschillende bacteriën. De fysiologie en genetica van dit organisme werden de voorbije 25 jaar intensief bestudeerd. De sequencerij van het *R. metallidurans* genoom werd gestart in 2000. Een voorlopige genoomsequentie is beschikbaar in de vorm van 29 contigs en momenteel wordt de laatste hand gelegd aan de genoomsluiting en annotatie (<http://genome.ornl.gov/microbial/rmet/>).

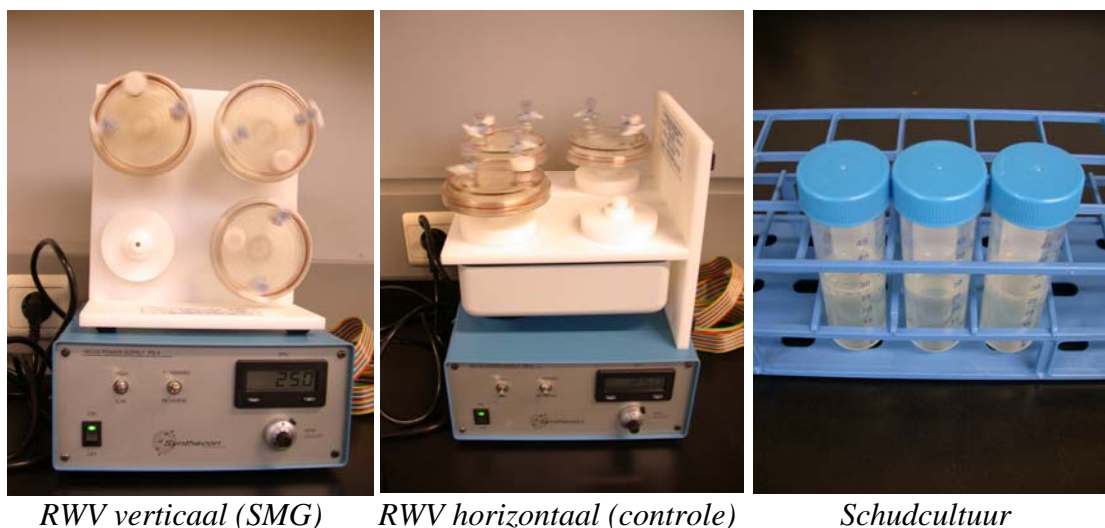
##### 4.1.2 Keuze van *R. metallidurans* als testorganisme

Er zijn verschillende redenen waarom *R. metallidurans* CH34 (ATCC 43123) gekozen werd om de invloed van LSMMG na te gaan:

- *R. metallidurans* CH34 kan beschouwd worden als het "huisdier" van het labo Microbiologie aan het SCK•CEN. Het wordt reeds bestudeerd sinds 1976. De optimalisatie van proteïne- en genetische analyses voor dit organisme vond reeds plaats.
- Het effect van ruimte-omstandigheden op het gedrag van dit modelorganisme werd reeds tweemaal bestudeerd in beide MESSAGE-experimenten.
- Verder is dit micro-organisme zeer robuust. Het werd geïsoleerd uit industrieel vervuilde grond en overleeft in extreme condities.
- Het is tevens een flexibel organisme wegens een mogelijke adaptatie aan nieuwe omgevingen (het is een mutator fenotype en een recipiënt uitstekend voor vreemde genen).
- Zijn veelzijdigheid maakt van *R. metallidurans* een geschikt testorganisme: het groeit op kamertemperatuur, in vloeibare, vaste en diverse media, zowel aëroob als anaëroob en is autotroof. Een voordeel voor ruimte-experimentatie is dat de kweektemperatuur van *R. metallidurans* (30°C) de ambiënte temperatuur aan boord van het ISS benadert (14-26°C).
- Het is niet pathogeen en vormt geen sporen.

## 4.2 Gebruikte media en groeicondities

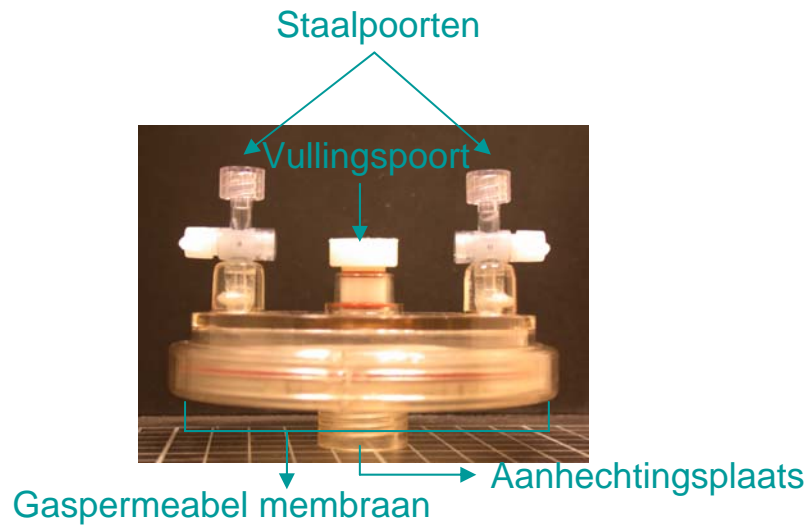
Alle studies werden uitgevoerd met de wild-type stam *R. metallidurans* CH34 (ATCC 43123). Bacteriële cellen werden overnacht gegroeid in het rijk medium Lennox bouillon (LB) (per liter MilliQ H<sub>2</sub>O: 5 g gistextract, 10 g pepton van caseïne, 5 g NaCl) in 50 ml Erlenmeyers (25 ml cultuur) in een schudincubator (125 rpm) bij 28 °C. Overnachtculturen werden gedilueerd tot een OD van ongeveer 10<sup>-2</sup> (overeenstemmend met 10<sup>7</sup> bacteriën/ml) in het selectief medium 284 gluconaat (per liter MilliQ H<sub>2</sub>O: 2 g gluconaat; 6,06 g Tris/HCl; 4,68 g NaCl; 1,49 g KCl; 1,07 g NH<sub>4</sub>Cl; 0,43 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,20 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,03 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 40 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 4,8 mg Fe(III)NH<sub>4</sub>Citraat; 1 ml spoorelementen). Aangezien slechts 1 toestel beschikbaar was, werd het apparaat in een eerste experiment verticaal gepositioneerd (SMG, gesimuleerde micrograviteit) en in een tweede experiment horizontaal (1 x g controle). Telkens werden in parallel klassieke schudculturen opgezet (zie figuur 9). Door de gelijkaardige groei van de schudculturen in beide experimenten konden de horizontale en de verticale stand van het toestel ten opzichte van elkaar vergeleken worden. Elk experiment werd in drievoud opgesteld. 50 ml van de verdunning werd in elke RWV-bioreactor overgebracht. Er werd gezorgd voor de volledige vulling van het recipiënt en verwijdering van de luchtbellens. De rotatiesnelheid van de RWV bedroeg telkens 25 rpm, voor de schudincubator 125 rpm. De incubatietemperatuur bedroeg 28 °C in beide incubatoren. De falconbuizen (volume 50 ml) voor schudincubatie werden elk gevuld met 25 ml verdunning.



*Figuur 9:* Cultuurcondities *R. metallidurans* CH34

### 4.3 Staalname en verwerking

Het RWV-recipient is een cilindrische bioreactor met een capaciteit van 50 ml die 1 opening bevat voor het vullen en 2 openingen voor staalname (zie figuur 10).



*Figuur 10:* RWV recipient in horizontale positie

Na het vortexen tijdens 1 minuut gebeurde de staalname door het aanbrengen van twee steriele spuitjes (zonder naald) t.h.v. de staalpoorten. Eén spuit was gevuld met steriel 284 gluconaat, de andere was leeg. Het ledigen van de 284 gluconaat spuit gebeurde gelijktijdig met het vullen van de lege spuit, aldus werd het staal bekomen. Een staalname van 2 ml gebeurde op regelmatige tijdstippen in zowel de RWV-recipienten als de schudculturen.

Op elk tijdstip werd 100  $\mu$ l staal gebruikt voor het meten van de OD met de fotospectrometer (Eppendorf, Biophotometer). 500  $\mu$ l werd ingevroren bij  $-20$  °C voor latere proteïne-analyse. Het overige staal werd gecentrifugeerd bij maximale snelheid (16100 g) tijdens 3 min (Eppendorf, Centrifuge 5415 R). Het supernatans werd geïsoleerd en ingevroren voor latere meting van gluconaat-en ammoniumconcentraties. Het pellet werd heropgelost in 1 ml van de isotone buffer Recovery Diluent (RD) (per liter MilliQ H<sub>2</sub>O: 1 g pepton; 8,5 g NaCl) en ingevroren bij  $-20$  °C voor RNA-extractie.

## 4.4 Analyse

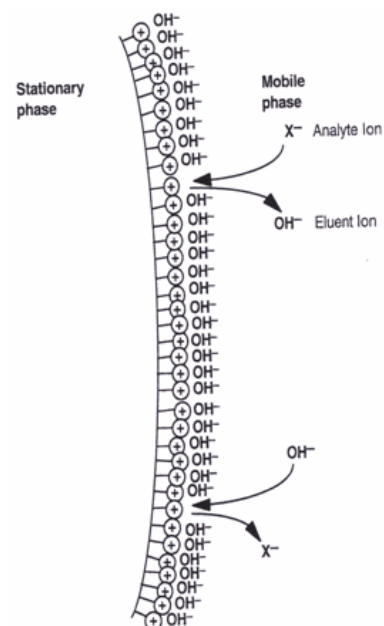
### 4.4.1 Metabolisme

#### 4.4.1.1 Groei

De celdensiteit werd gemeten met fotospectrometrie (Eppendorf, Biophotometer). Bij een golflengte van 600 nm wordt de verstrooiing van celpartikels in oplossing gemeten, hetgeen een maat is voor het aantal bacteriën in het kweekmedium.

#### 4.4.1.2 Gluconaatverbruik

Het gluconaat in het medium werd gemeten via ionchromatografie. Dit is een proces van ionuitwisseling waarbij een geladen analyticum in competitie is met een eluent (mobiele fase) met een gelijke lading voor sites met een tegenovergestelde lading (functionele groepen) op een stationaire fase (hars). Alvorens het analyticum geïnjecteerd wordt in de kolom, zijn de functionele groepen ionen gepaard met de eluent ionen zodat de stationaire fase elektrisch neutraal is. Wanneer een staal wordt geïnjecteerd, zullen de ionen uit het staal in competitie treden met de eluent ionen op de functionele groep (zie figuur 11). De analytische ionen die een sterke affiniteit hebben voor de uitwisselingsite worden langer weerhouden bij het spoelen van de kolom met eluent dan ionen met een lage affiniteit. Deze ionen kennen een grotere elutietijd. Na het verbreken van de binding tussen het analyticum en de functionele groep wordt de geleidbaarheid (microSiemens,  $\mu\text{S}$ ) van de geëluëerde stof gemeten. Hoe meer analyticum in de oplossing, hoe groter de geleidbaarheid. Een standaardcurve werd opgesteld met gekende concentraties gluconaat.



*Figuur 11:* Ionuitwisselingsproces voor een anion met hydroxide eluent

Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een positief geladen kolom met  $\text{NH}_3^+$  als functionele groep wegens de negativiteit van het te analyseren gluconaat ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7^-$ ). De eluent ionen zijn  $\text{OH}^-$ -ionen. Om de achtergrond geleidbaarheid van dit eluent te reduceren wordt een tweede kolom, de suppressor kolom, met een tegengestelde functie als de analytische kolom ingeschakeld net voor de detectie. Deze suppressorkolom elimineert de achtergrondgeleidbaarheid en verhoogt hierdoor de sensitiviteit van de meting. In dit systeem zal het eluent  $\text{XOH}$  (met X zijnde het kation geassocieerd met het eluent) doorheen de suppressor geleid worden en een uitwisseling veroorzaken van X voor  $\text{H}^+$  om  $\text{H}_2\text{O}$  als background te produceren. Deze detectietechniek wordt Suppressed Conductivity genoemd.

Voor het meten van de gluconaatconcentratie in de verschillende stalen werd het ingevroren medium (zie 4.3. Staalname en verwerking) ontdooid op kamertemperatuur ( $22\text{ }^\circ\text{C}$ ) en 10 keer verdund in steriel MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$ . Het medium werd vervolgens overgebracht in steriele 1,5 ml vials (VWR Internationals). Een eliminatie van overblijvende bacteriën vond plaats met filtrering doorheen een poriegrootte van  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  (Pall Life Sciences) bij het overbrengen van het verdund staal in de vials.

### 4.4.1.3 Ammoniumverbruik

De detectie van de hoeveelheid ammonium in het 284 gluconaat medium gebeurde door de indofenol blauw colorimetrische techniek. De reactie tussen ammonium, hypochloriet en fenol levert een intense blauwe component nl. indofenol die fotospectrometrisch kan worden gemeten. Deze kleurreactie wordt gekatalyseerd door natrium nitroprusside.

Het reactiemengsel bevat verschillende producten die per liter oplossing als volgt zijn samengesteld. De fenol oplossing bevat 111 ml vloeibare fenol ( $\geq 89\%$ ), opgelost in 889 ml 95% ethyl alcohol. De natrium nitroprusside oplossing bevat 5 g natrium nitroprusside per liter steriel MilliQ H<sub>2</sub>O. Het alkalisch citraat mengsel werd bereid door het oplossen van 200 g trinitrium citraat en 10 g natrium hydroxide in 1 l steriel MilliQ H<sub>2</sub>O. Het natrium hypochloriet is commercieel beschikbaar en heeft een massa-volume verhouding van 5 %. De oxiderende oplossing bevat 250 ml natrium hypochloriet per liter alkaline citraat oplossing. Deze laatste oplossing dient vers bereid te worden.

De indofenol blauw reactie werd uitgevoerd in een microtiterplaat (96 putjes). Elk staal werd 1000 keer verdund in steriel MilliQ H<sub>2</sub>O zodat de ammoniumconcentratie zich situeerde binnen het detectie-interval van 0,05 tot 2 mg ammonium/l. De startconcentratie in het 284 gluconaatmedium bedraagt namelijk 0,36 g/l. Van elke verdunning werd 250  $\mu$ l overgebracht in het putje van de microtiterplaat. Hieraan werden achtereenvolgens 10  $\mu$ l fenol oplossing, 10  $\mu$ l natrium nitroprusside oplossing en 25  $\mu$ l oxiderende oplossing toegevoegd. Na elke toevoeging werd enkele malen op en neer gepipetteerd. Tevens werden een blanco en een standaardreeks ingevoerd. De plaat werd afgedekt met een passend deksel en geïncubeerd op kamertemperatuur (22 tot 27 °C) in gedimd licht tijdens ten minste 1 uur. De ontstane kleur blijft 24 uur stabiel. De absorptie werd gemeten met fotospectrometrie (Multiscan Ascent, Thermo LabSystems) bij een golflengte van 640 nm.

De gekende ammoniumconcentraties uit de standaardreeks werden uitgezet t.o.v. de gemeten absorptiewaarden. Bijgevolg kon de absorptie van het indofenol uit te stalen gecorreleerd worden met de aanwezige ammoniumconcentratie.

## 4.4.2 Genexpressie: Kwantitatieve PCR

### 4.4.2.1 RNA-extractie

Het totale RNA werd geëxtraheerd met de Promega kit (SV Total RNA Isolation System). Lyse van de bacteriële cellen vond plaats door een voorbehandeling met lysosyme (3 mg lysosyme/ml 10 mM Tris/EDTA-buffer). Vervolgens werden de cellulaire ribonucleasen geïnactiverend met guanidine thiocynaat (GTC) en  $\beta$ -mercaptoethanol. GTC in combinatie met SDS brak dan de nucleoproteïne complexen zodat het RNA vrijkwam in oplossing en vrij was van proteïnen. Dilutie van celextracten in aanwezigheid van hoge concentraties GTC veroorzaakte selectieve precipitatie van cellulaire proteïnen. Het RNA werd selectief uit de oplossing gehaald door precipitatie met ethanol gevolgd door een passage doorheen een glasvezel membraan. Hierdoor werd het RNA gebonden aan de silica oppervlakte van de glasvezels. RNA-se vrij DNase I werd direct aangebracht op de silica membraan om contaminerend DNA af te breken. Het gebonden RNA werd gezuiverd van contaminerende zouten, proteïnen en cellulaire onzuiverheden door simpele wasstappen. Uiteindelijk werd het totale RNA geëluëerd van de membraan door het toevoegen van Nuclease vrij H<sub>2</sub>O.

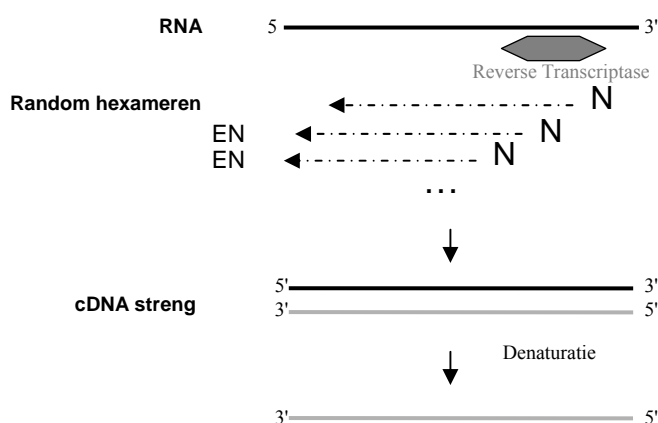
Voor de experimentele procedure wordt verwezen naar de technische handleiding van de RNA isolatiekit (Promega).



Het geëxtraheerde RNA werd geanalyseerd met de NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. De kwaliteit (zuiverheid) en concentratie van het RNA werden bepaald door meting van de absorptie bij drie verschillende golflengten (230, 260 en 280 nm). De absorptie bij 260 nm is een maat voor de RNA-concentratie in het staal. De verhouding van de golflengtes 260 nm en 280 nm geeft de kwaliteit weer van het RNA en dient zich te situeren tussen 1,8 en 2,1.

#### 4.4.2.2 Omgekeerde transcriptie (RT)

Vermits RNA uracil-adenine i.p.v. thymine-adenine baseparen bevat, dient de omzetting tot cDNA plaats te vinden. Hiervoor wordt een DNA Taq Reverse Transcriptase enzyme (resistent aan hoge temperaturen) gebruikt. Deze reactie vond plaats met de "TaqMan Reverse Transcription Reagents" van Roche.



*Figuur 12:* Omgekeerde transcriptie van RNA naar cDNA door aanhechting van random primers op willekeurige plaatsen in het RNA en transcriptie m.b.v. het DNA Taq polymerase (N=random primer)

Er werd gebruik gemaakt van random hexameren, dit zijn primers die bestaan uit elke mogelijke hexamere basensequentie. Het reverse transcriptase voegt aan deze primers complementaire basen toe en vormt aldus een cDNA streng. Vervolgens dissociëert de hybride-streng door blootstelling aan hoge temperatuur (zie figuur 12).

Het samenvoegen van de reactieproducten gebeurde op ijs (4 °C). Elke RT-mix bevatte 2 µl RNase inhibitor (20 U/µl); 2 µl Reverse Transcriptase (50 U/µl); 5 µl primer (50 µM); 10 µl RT-buffer (10x); 20 µl deoxynucleotide mix (2,5 mM/dNTP) en 11 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM). Een gepast volume (X µl) RNA-template werd toegevoegd om een finale concentratie van 1 µg RNA/100µl te bekomen. Het mengsel werd aangelengd tot een eindvolume van 100 µl met steriel MilliQ H<sub>2</sub>O (49,5 – X µl).

De omgekeerde transcriptie reactie werd uitgevoerd in de Perkin Elmer 9700 thermocycler (Applied Biosystems). Het programma bestond uit een primer-RNA binding (annealing) van 10 min bij 25 °C gevolgd door een Reverse Transcriptie reactie (30 min, 48 °C) en een RT-inactivatie en denaturatie (5 min, 95 °C). Het cDNA werd na de reactie 4x verdund en gestockeerd bij -20 °C.

#### 4.4.2.3 Controle van het RT-product

Na de RT-reactie werd het RT-product geëvalueerd via een PCR reactie: het cDNA van een housekeeping gen (dat steeds tot expressie komt in de cel) werd geamplificeerd en onderging vervolgens een agarose gelelektroforese. Deze controle stap liet toe de kwaliteit van het cDNA te evalueren alvorens dit te gebruiken voor Q-PCR.

Het primerpaar voor de PCR-reactie had het 16S rRNA cDNA (*bac16S*) van *R. metallidurans* CH34 als doelwit. De gegevens van de primerset staan vermeld in tabel 5.

	Sequentie (5'-3')	AnnealingT (°C)	Lengte amplicon (bp)
Forward primer	AGCGGTGGATGATGTGGATTAA	54	232
Reverse primer	TTGTCACCGGCAGTCTCTCTAG	55	

*Tabel 5:* Primerpaar voor controle van het RT product met PCR

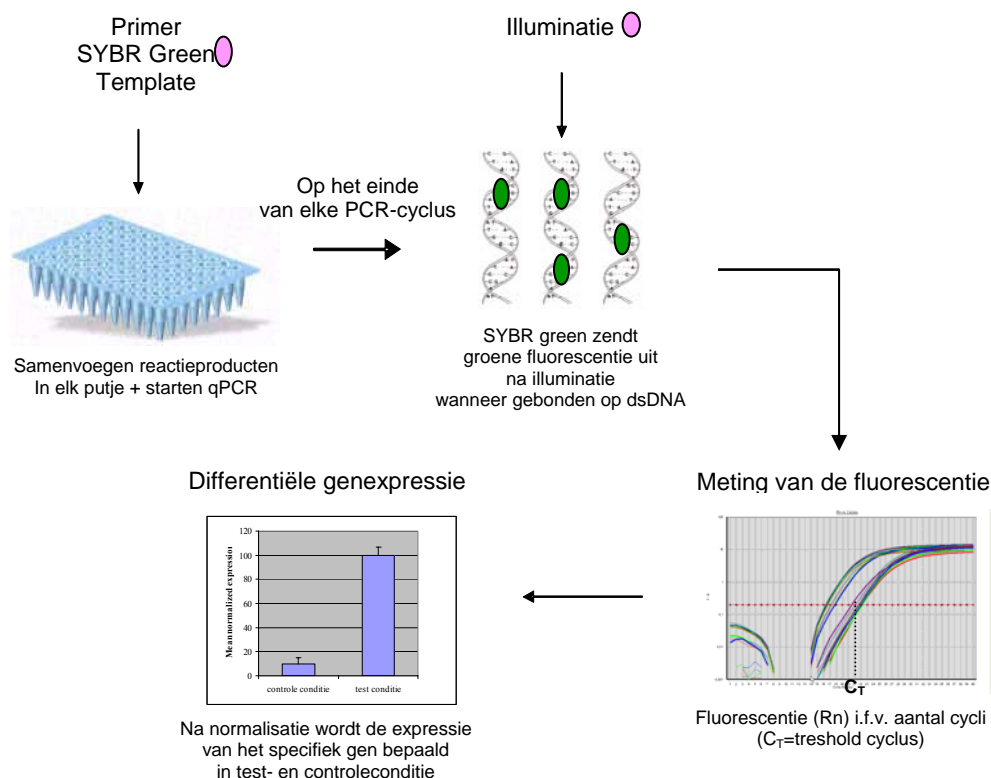
Alle reactieproducten waren afkomstig van de firma Roche. De bereiding van het PCR mengsel gebeurde op ijs. Het reactiemengsel bevatte telkens 1 µl PCR nucleotidenmix (200 µM/dNTP); 2,5 µl forward primer (10 µM); 2,5 µl reverse primer (10 µM); 5 µl template cDNA; 33,75 µl steriel MilliQ H<sub>2</sub>O; 5 µl Taq PCR buffer (10x) en 0,25 µl Taq DNA polymerase (1,25 U/50µl).

De PCR reactie vond plaats in de Perkin Elmer 9700 thermocycler (Applied Biosystems). De initiële denaturatie gebeurde gedurende 2 min bij 94 °C. Vervolgens vond denaturatie plaats gedurende 45 s bij 94 °C gevolgd door een annealing (55 °C, 30 s) en elongatie (72 °C, 30 s). De denaturatie, annealing en elongatie werden 30 keer herhaald. Na deze cycli gebeurde de finale elongatie tijdens 7 min bij 72 °C. De stalen werden bewaard bij 4 °C voor het laden op gel.

De geamplificeerde cDNA stalen werden vervolgens geladen op een 1,5 % agarose gel [0,70 g agarose in 50 ml TBE buffer (10,8 g Tris base; 5,5 g Boorzuur; 0,744 g EDTA, pH 8,3)]. Na het koken en afkoelen van de agarose werd 0,01 % ethidium bromide (EB) (1 µg EB/ml gel) toegevoegd. Aan de cDNA stalen werd een visualiserende kleurstof toegevoegd (1µl kleurstof/5 µl staal). De elektroforese buffer was 1x TBE en de run gebeurde bij 100 Volt gedurende 30-40 min in het "Mini gel migration trough high voltage" toestel (i-mupid, COSMO BIO CO., LTD). Een 100 bp DNA ladder (Invitrogen) werd toegevoegd om de grootte van het PCR-product in te schatten.

#### 4.4.2.4 Kwantitatieve PCR (Q-PCR)

Q-PCR is een methode die toelaat op een kwantitatieve wijze de differentiële expressie van specifieke genen te bepalen. Dit gebeurt door de gen-specifieke amplificatie (via PCR-reactie) “real time” op te volgen m.b.v. het fluorochroom SYBR Green (zie figuur 13). SYBR Green heeft een hoge bindingsaffiniteit voor dubbelstrengig DNA en wordt bijgevolg op het einde van elke PCR-cyclus geïncorporeerd in het dubbelstrengig target cDNA. Na illuminatie (excitatie bij 497 nm) zendt SYBR Green groene fluorescentie (520 nm) uit waarvan de intensiteit gecorreleerd is met de hoeveelheid geamplificeerd gen. De cyclus waarbij er voldoende fluorescent cDNA is om gedetecteerd te worden, wordt de  $C_T$ -waarde genoemd (Cycle Treshold). Deze waarde is determinerend voor de hoeveelheid specifiek RNA in het staal. Hoe hoger de hoeveelheid target cDNA, hoe sneller deze treshold bereikt wordt en hoe lager de  $C_T$ -waarde.



*Figuur 13:* Principe kwantitatieve PCR

De SYBR Green Master Mix bevat een UNG activiteit (uracil-N-glycosylase). Dit werkt op nucleotidefragmenten die dU basen bevatten. Deze behandeling vermijdt reamplificatie van overgedragen PCR producten (zoals RNA residuen van de RT reactie).

De primers werden gedilueerd in steriel milliQ H<sub>2</sub>O tot een concentratie van 10 µM. Een 96 putjes PCR-plaat (MicroAmp Optical tubes) werd in een koelingsbak geplaatst zodat de bereiding van het reactiemengsel plaatsvond bij 4 °C. Elk putje werd gevuld met 5 µl cDNA staal (4x verdund); 1,25 µl van de reverse- en forward primer (10 µM); 5 µl steriel MilliQ H<sub>2</sub>O en 12,5 µl SYBR Green Master Mix 1x (qPCR<sup>TM</sup>Mastermix Plus for SYBR®GreenI, Eurogentec). Ook werd een negatieve controle ingelast (zonder template). De PCR-plaat werd afgedekt met optische kapjes (MicroAmp Optical caps).

De Q-PCR reacties werden uitgevoerd in het toestel GeneAmp<sup>®</sup> 5700 Real Sequence Detection System (Applied Biosystems). De UNG incubatie vond plaats bij 50 °C tijdens 2 min. Vervolgens gebeurde de polymerase activatie door verhitting bij 95 °C tijdens 10 min. Dit werd gevolgd door 40 cycli van denaturatie (15 s, 25 °C), annealing en elongatie (1 min, 60 °C).

De genexpressie van elk staal werd telkens in tweevoud getest. Voor de normalisatie werd gebruik gemaakt van de *uvrD* primer (housekeeping gen) (zie 5.2.6 Bepaling van het meest stabiele normalisatiegen). Na normalisatie werden de gemiddelde expressies berekend en vergeleken in een excel grafiek waarna statistische berekingen plaatsvonden voor de identificatie van significante verschillen.

### **4.4.3 Proteïne-expressie: Twee dimensionele gelelektroforese (zie figuur 14)**

Alle analyses betreffende de proteïne-expressie werden uitgevoerd in het 'Departement voor proteomics en proteïne biochemie' aan de universiteit van Mons-Hainaut (UMH) te Bergen.

Bij 2D-gelelektroforese worden proteïnen gescheiden in 2 opeenvolgende stappen: eerst volgens hun lading, dan volgens hun massa. In de eerste stap wordt het celextract volledig gedenateerd bij hoge concentraties ureum. De gels voor de eerste dimensie zijn gekenmerkt door een continue pH gradiënt tot stand gebracht door amfolieten (mengsel van polycationische en polyanionische moleculen). Onder invloed van een elektrisch veld migreren de proteïnen door deze pH-gradiënt tot het iso-elektrisch punt (pI) bereikt wordt. Dit is de pH waarbij de netto lading van het proteïne nul bedraagt. Deze techniek wordt isoelektrische focussing (IEF) genoemd en laat toe proteïnen te scheiden die slechts 1 ladingseenheid verschillen. De tweede migratie vindt plaats door de IEF gel, na behandeling met SDS, te plaatsen boven een verticaal gepositioneerde polyacrylamide gel. SDS denatureert de proteïnen en geeft deze een negatieve lading zodat deze tweede scheiding enkel volgens het moleculair gewicht (MG) gebeurt. Deze techniek laat dus toe om proteïnen met een gelijke pI en verschillende massa te scheiden en omgekeerd.

#### **4.4.3.1 Proteïne extractie**

De lyse van de bacteriële cellen vindt plaats met de niet-ionische detergent CHAPS (3-[(3cholamido-propyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonaat). Het ureum zorgt voor het breken van alle aanwezige waterstofbruggen waardoor extractie van membraanproteïnen mogelijk wordt. De lyse-oplossing bevat amfolieten die in deze fase zorgen voor een goede oplosbaarheid van de eiwitten. Naast deze rol werken de amfolieten ook als bijkomende detergent. Het TBP (tributyl phosphine) reduceert de zwavelbruggen tussen de subeenheden van de proteïnen.

De ingevroren stalen (zie 4.3 Staalname en verwerking) werden ontdooid op kamertemperatuur (22 °C) en gecentrifugeerd bij 4 °C tijdens 15 min met een snelheid van 15700 g. Het supernatans werd verwijderd en ingevroren bij -20 °C. De lyse van de bacteriële cellen vond plaats door het toevoegen van 70 µl van de volgende oplossing: 8 M ureum; 4% w/v CHAPS; 40 mM Tris; 0,2% v/v Biolyte 3-10; 2 mM TBP (Bio Rad); 1/8 tablet/ml Complete Mini EDTA Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) en door een sonicatie (Elma® Transsonic 460/H) bij 4 °C tijdens 3 min.. De stalen werden gecentrifugeerd (15700 g, 15 min, 4 °C) en bewaard bij -20 °C.

#### **4.4.3.2 Dosage proteïnen**

De dosage vond plaats d.m.v. de Bradford colorimetrische techniek. Deze methode is gebaseerd op de verplaatsing van het absorptiemaximum van het Coomassie blauw G-250 van 465 nm naar 595 nm na interactie met proteïnen. De absorptie bij 595 nm werd gemeten met fotospectrometrie.

Het proteïnestaal werd ontdooid (op 4 °C) en vervolgens 16x (5 µl supernatans, 75 µl H<sub>2</sub>O) en 40x (2 µl supernatans, 78 µl H<sub>2</sub>O) verdund in MilliQ H<sub>2</sub>O. Op basis van het oorspronkelijk bacterieel pellet werd een schatting gemaakt van de proteïneconcentraties en een

standaardreeks opgesteld in deze range met het runder  $\gamma$ -globuline (BgG) (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Ook werden negatieve controles ingelast nl. de lysebuffer, waarin de proteïnen werden opgelost bij de extractie, werd 16x en 40x verdund. Aan 80  $\mu\text{l}$  verdunning/standaard werd 4 ml Bradford kleurstof (4x verdund) (Bio Rad) toegevoegd. Het geheel werd intensief gevortext en geanalyseerd m.b.v. fotospectrometrie (Uvikon 940 Spectrophotometer) bij 595 nm.

De dosage van de standaardreeks werd uitgevoerd in 3-voud, de negatieve controles in 2-voud en de proteïnestalen in enkelvoud (wegens een lage bacteriële concentratie). Na de substractie van het blanco werden de OD's van de standaardreeks uitgezet t.o.v. de respectievelijke BgG-concentraties. De bekomen vergelijking liet toe de OD van de proteïnestalen om te zetten in proteïneconcentratie.

#### **4.4.3.3 Eerste dimensie: Migratie volgens pI**

##### 4.4.3.3.1 Rehydratatie van de 1D gels

De gels (pH 4-7) voor de eerste dimensie (Immobiline Dry Strips, Amersham Pharmacia Biotech) worden geleverd als smalle strips van 18 cm lang, een plastic folie dient verwijderd te worden. Deze gels zijn gedehydrateerd en moeten voor gebruik worden gehydrateerd. Elke gel werd daarom ondergedompeld in 2 ml van de rehydratatie oplossing (2% w/v CHAPS; 8 M ureum; 0,5% v/v Pharmalyte 3-10; 13 mM DTE (dithioerythritol 99+%) en enkele korrels bromophenol blue) en bedekt met een laag paraffine. De rehydratie gebeurde overnacht.

##### 4.4.3.3.2 Laden van de 1D-gels op het Multiphore II-toestel

De migratie van de proteïnen volgens hun iso-elektrisch punt gebeurde m.b.v. een Multiphor II systeem (Pharmacia Biotech Multiphor II) gekoppeld aan de voeding Electrophoresis power supply-EPS 3500XL (Pharmacia Biotech) en aan een koelingssysteem (Pharmacia Biotech Multitemp III refrigerated bath circulator 230 V). De gels werden uit de rehydratatieoplossing gehaald en overgebracht op het Multiphore II-toestel. Na het vullen van het recipiënt met paraffine werden de proteïnestalen op de gels aangebracht. Er werd gekozen voor een hoeveelheid van 50  $\mu\text{g}$  proteïne per gel. Het vereiste volume werd berekend op basis van de dosage.

De migratie van de proteïnen gebeurde in 3 fasen: tijdens een eerste fase steeg het voltage van 0 naar 500 V in 1 minuut tijd, dit laat de incorporatie toe van de proteïnen in de gel. Bij de tweede fase steeg het voltage van 500 V naar 3500 V tijdens 1u en 30 min. Deze geleidelijke toename voorkomt precipitatie van de proteïnen. De laatste fase vond plaats bij 3500 V en duurde 16 uur en 20 min. De 3 fasen gebeurden bij 2 mA en 5 W. De duur van elke fase is afhankelijk van de pI range van de strips en werd ingesteld volgens de aanbevelingen van de fabricant.

#### **4.4.3.4 Tweede dimensie: Migratie volgens MG**

##### 4.4.3.4.1 Bereiding 2D gels

12 glazen platen met een centrale gleuf werden op elkaar gestapeld in een houder (Bio Rad Protean<sup>®</sup> plus Multi-casting Chamber). De houder werd gesloten en dichtgeschroefd zodat er geen ruimte bestond tussen de afzonderlijke platen. De geloplossing werd aangebracht in een hoger gelegen reservoir. Een rubberen holle slang vormde de verbinding tussen het reservoir en de houder. Het openen van de reservoirkraan veroorzaakte een stapsgewijze vulling van de

12 platen. Na het volledig vullen van de platen werd het geloppervlak bedekt met een laag MilliQ H<sub>2</sub>O (1ml/plaat). Het opstijven van de gels nam een nacht in beslag. De gels bevatten 11% acrylamide. Voor 1 l gel (12 platen=700 ml) werden 367 ml acrylamide/bis (30%); 250 ml tris HCl (pH 8,8; 1,5 mM) en 383 ml MilliQ H<sub>2</sub>O samengevoegd. Dit mengsel werd gedurende 1 uur ontgast. Vervolgens werden 5 ml APS (10% ammonium persulfaat) en 314 µl TEMED (NNN'N'-tetramethylethylenediamine) toegevoegd (per liter oplossing) en het geheel werd overgebracht in het reservoir.

De polymerisatie van het acrylamide gebeurt door katalysatie met vrije radicalen geproduceerd door het koppel APS en TEMED. Het TEMED katalyseert de afbraak van de persulfaat ionen om vrije radicalen op te leveren. Een vrij radicaal reageert met een molecule acrylamide of bisacrylamide (laat koppeling toe tussen 2 polyacrylamide ketens). Dit paar hecht een ander molecule aan en vormt uiteindelijk een lange polyacrylamide keten. Zuurstof kan een probleem vormen vermits dit vrije radicalen aantrekt. Dit is de reden waarom een ontgassing plaatsvond alvorens APS en TEMED toe te voegen.

#### 4.4.3.4.2 Laden 2D gels

Na de eerste dimensie ondergingen de 1D-gels een equilibratie die naast het inbrengen van SDS, een optimale pH levert voor de 2<sup>de</sup> dimensie. Dit gebeurde door de gels onder te dompelen in 2 oplossingen telkens tijdens 20 minuten. De eerste oplossing bevatte 50 mM Tris HCl pH 8,8; 6 M ureum; 30% v/v glycerol; 2% w/v SDS; 65 mM DTE. Het DTE zorgt voor een reductie van de zwavelbruggen tussen de subeenheden van het proteïne. Elke strip werd overgebracht in een glazen buis met 5 ml van de eerste equilibratie-oplossing en op een schudplaat geplaatst tijdens 20 min. Na het ledigen van de glazen buizen werd 5 ml van de tweede equilibratie-oplossing bij elke gel gevoegd. Deze was identiek aan de eerste, enkel werd DTE vervangen door 135 mM iodoacetamide hetgeen de reductie stabiliseert.

De overgang van de proteïnen van de 1D gels naar de acrylamide 2D gels vond plaats via een verbinding tussen beide gels met hete agarose. Deze oplossing bevatte 0,3% w/v agarose in TGS-buffer (25 mM Tris HCl, 192 mM glycine, 0,1% w/v SDS, pH 8,3) en enkele korrels bromophenol blue. De agarose werd boven de polyacrylamidegels aangebracht. De 1D strips werden doorheen de agarose tegen de 2D gels geplaatst. De agarose verhardde na enkele minuten.

Vervolgens kon de migratie plaatsvinden volgens het MG van de proteïnen. De 12 platen werden in verticale positie aangebracht in de rubberen gleuven van het recipiënt (Bio Rad Protean<sup>®</sup> plus Dodeca<sup>™</sup> Cell) dat volledig gevuld was met TGS-buffer. De elektroden werden gekoppeld aan de Microcomputer electrophoresis power supply (Consort, Analis). Ook was er een verbinding met een Buffer Recirculation pump voor de constante recirculatie van de TGS buffer in het recipiënt en met een koelingssysteem (Pharmacia Biotech Multitemp III refrigerated bath circulator 230 V) voor een constante temperatuur van 20 °C.

De migratie gebeurde bij 200 V, 30 mA per gel (360 mA voor 12 gels) tijdens minstens 6 u (tot de kleurstof bromophenol blue van de agarose op het einde van de plaat gemigreerd is).

#### 4.4.3.5 Kleuren van de gels met zilvernitraat

Er werd geopteerd voor een zilverkleuring vermits een kleine hoeveelheid proteïne werd geladen. Deze techniek laat toe hoeveelheden van minder dan 1 ng proteïne per spot te detecteren. Tijdens de fixatie worden de proteïnen gefixeerd in de gel. Dit gebeurt in aanwezigheid van protonen die reageren met het water rond de proteïnen. Het hydrofobe methanol zorgt voor de precipitatie van de proteïnen. Het glutaaraldehyde gaat tijdens de incubatiefase covalente bindingen creëren binnen de proteïnen waardoor de capaciteit om zilver te binden aanzienlijk stijgt. Na de incubatie met zilver wordt het overtollige zilver verwijderd tijdens het wassen. Het natriumcarbonaat levert een basische pH vereist voor de ontwikkeling van de kleur. Deze ontwikkeling is gebaseerd op de omzetting van het ionische zilver ( $\text{Ag}^+$ ) tot metaalisch zilver ( $\text{Ag}^0$ ) met de katalysator formaldehyde. De reactie wordt gestopt met EDTA die als chelator ionen opneemt waardoor geen omzetting tot  $\text{Ag}^0$  meer mogelijk is.

Meteen na de tweede dimensie werden de platen uit de Dodeca Cell gehaald. De platen werden geopend met een smalle spatel (Bio Rad) en de gels werden voorzichtig overgebracht op vierkante stapelbare bakjes passend in het toestel voor kleuring (Bio Rad Dodeca™ Stainer Small). De gels werden geïncubeerd in de volgende 8 oplossingen (voor 12 gels, 6 l): Per liter oplossing:

- 1) Fixatie (overnacht): 500 ml methanol; 100 ml azijnzuur; 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- 2) Incubatie (1 uur): 300 ml methanol; 10 ml glutaaraldehyde; 2 g natrium thiosulfaat; 41 g natrium acetaat; 690 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- 3) Wassen (2 x 20 min): 2 x 1 l  $\text{H}_2\text{O}$
- 4) Zilvernitraatoplossing (30 min): 1 g  $\text{AgNO}_3$ ; 288  $\mu\text{l}$  formaldehyde; 1 l  $\text{H}_2\text{O}$
- 5) Wassen (enkele seconden): 1 l  $\text{H}_2\text{O}$
- 6) Wasoplossing (1 min): 25 g natrium carbonaat; 1 l  $\text{H}_2\text{O}$
- 7) Ontwikkelingoplossing (3 à 5 min): 25 g natrium carbonaat;  $\text{NaHCO}_3$  (tot pH 11,3), 288  $\mu\text{l}$  formaldehyde; 1 l  $\text{H}_2\text{O}$
- 8) Stopoplossing (minimum 20 min): 18,6 g EDTA; 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

#### 4.4.3.6 Interpretatie resultaten

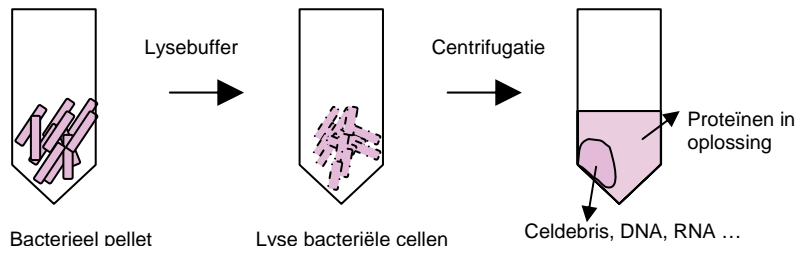
De proteïne patronen in de gels werden geanalyseerd als gedigitaliseerde beelden gebruik makend van een hoge resolutie scanner (Microtek ScanMaker 9800XL) in combinatie met de moleculaire analyse software Delta2D Version 3.2. (Decodon GmbH). Na het definiëren van de proteïnespots werden de gels "gematched" zodat spots uit de ene gel overeenkomstig met spots uit de andere gel konden worden vergeleken. Elke gel kreeg een kleur toegekend. De gematchte gels werden over elkaar geplaatst. Een over-of onderexpressie werd gekenmerkt door een overheersende kleur (groen of rood). Gelijke expressie werd herkend door zwart gekleurde spots.

De ratio's van de controle condities (horizontale RWV) en de testcondities (verticale RWV) werden berekend door het programma. Vermits voor elke conditie 2 stalen werden geanalyseerd, kon bepaald worden of de geobserveerde differentiële expressie reproduceerbaar was.

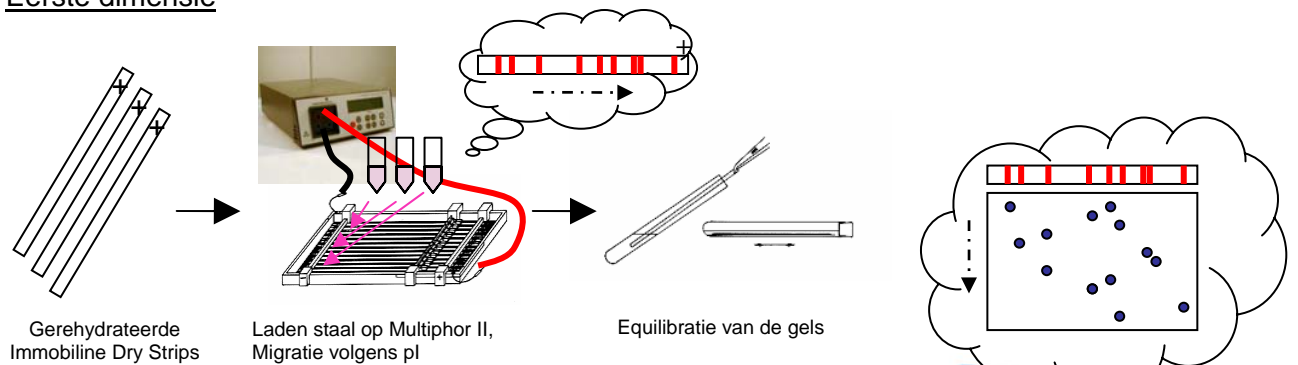


**Figuur 14:** Twee dimensionele gelelektroforese

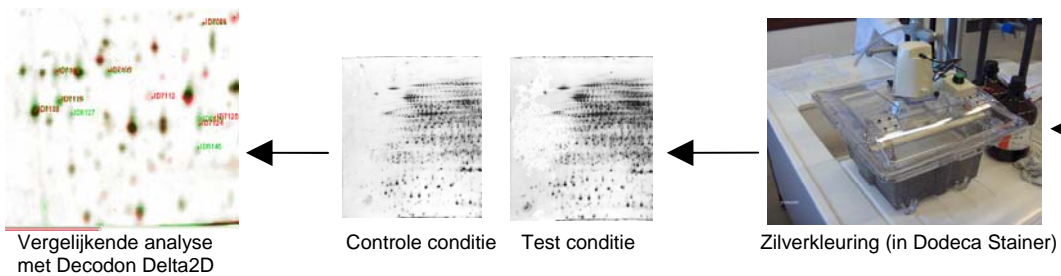
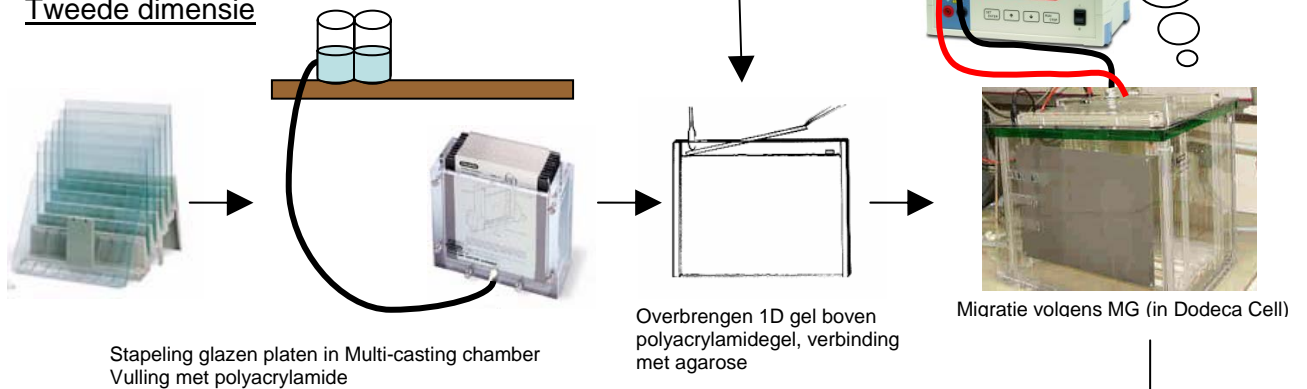
**Staal voorbereiding**



**Eerste dimensie**



**Tweede dimensie**



## 5 Resultaten en bespreking

### 5.1 Groei en metabolisme

#### 5.1.1 Groei

Figuur 15 toont de groeicurves van *R. metallidurans* gekweekt in een klassieke schudcultuur, in gesimuleerde micrograviteit (SMG) en in de controle RWV t.e.m. de stationaire fase. Deze sigmoïdale curves (figuur 15A) werden gemodelleerd met het grafisch programma Sigmaplot 8.0. Voor de modelering werd het Gompertz model (3 parameters) met de volgende vergelijking gekozen:

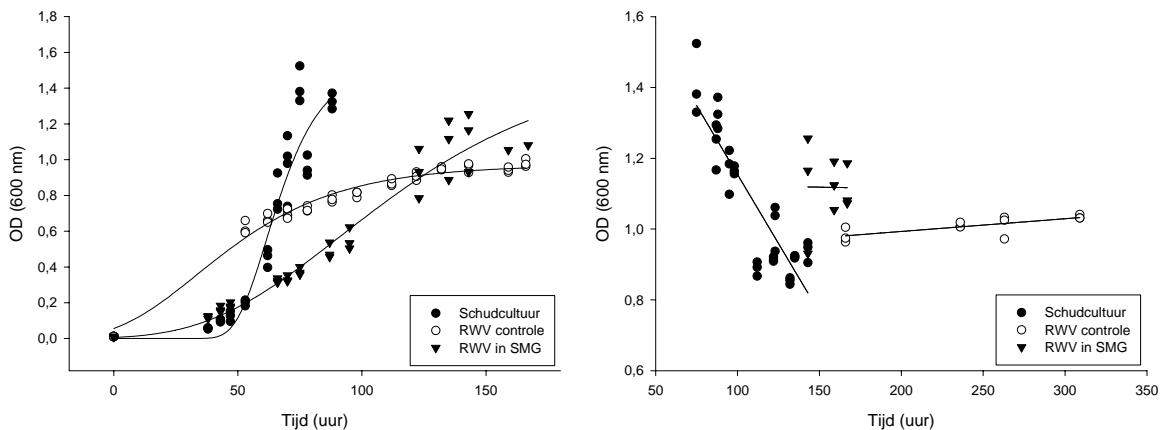
$$y = a \cdot e^{-e^{-[(x-x_0)/b]}}$$

De groeiparameters [groeisnelheid tijdens exponentiële fase ( $\mu$ ), duur lag fase ( $\lambda$ ), maximale celdensiteit (A)] werden afgeleid uit de vergelijking van de sigmoïdale groeicurves op basis van de studie van Zwietering [87] en staan vermeld in tabel 6. Hierbij stelt men  $x_0/b=b'$ ,  $1/b=c'$  en  $a=a'$ .

De groeiparameters worden vervolgens bepaald m.b.v. de volgende formules:

$$\mu_{\max} = \frac{a' \cdot c'}{e} \quad \lambda = \frac{b'-1}{c'} \quad A = a'$$

In figuur 15B worden de stationaire en afstervingsfasen weergegeven.



**Figuur 15:** Groeicurves van *R. metallidurans* gekweekt in een schudincubator, gesimuleerde micrograviteit en controle RWV. De lag -en exponentiële fasen werden opgenomen in A, de stationaire/afstervingsfasen in B.

Groeiparameter	$\mu_{\max}$ ( $u^{-1}$ )	$\lambda$ ( $u^{-1}$ )	A ( $u^{-1}$ )	Vergelijking sigmoïdale curve
Schudcultuur	0,045	49,9	1,52	$y = 1,5 \cdot e^{-e^{-[(x-61,7)/12,3]}}$
RWV in SMG	0,010	36,5	1,54	$y = 1,5 \cdot e^{-e^{-[(x-91,0)/52,7]}}$
RWV controle	0,010	1,5	0,97	$y = 1,0 \cdot e^{-e^{-[(x-33,5)/32,0]}}$

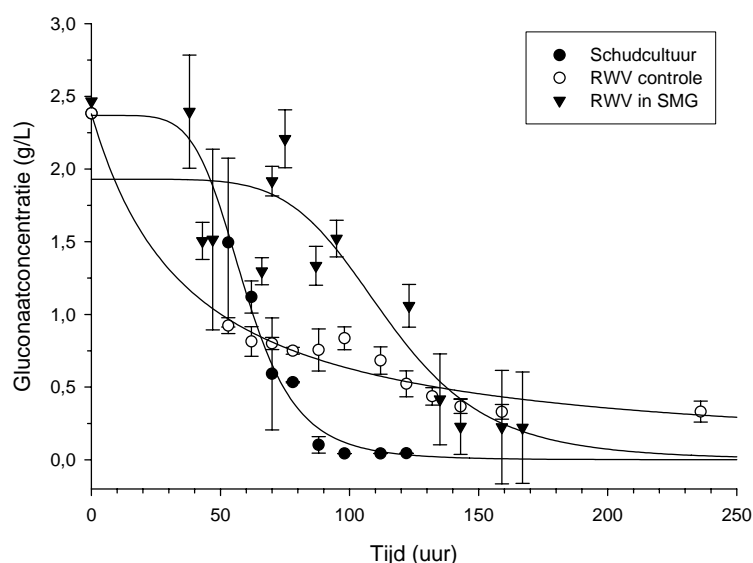
**Tabel 6:** Groeiparameters voor de verschillende groeicondities

*R. metallidurans* vertoonde een verschillend groeipatroon in de drie testcondities. Exponentiële groei werd het snelst geïnitieerd in de controle RWV. De exponentiële fase in SMG en in de schudcultuur begon op een gelijkaardig tijdstip ( $p > 0,05$ ). Er werd geen verschil geobserveerd in groeisnelheid tussen SMG en controle. De groeisnelheid in de schudincubator was echter meer dan 4x groter ( $p < 0,05$ ) dan in beide RWV (zie figuur 15A). De schudcultuur leek geen stationaire fase te kennen en ging meteen over in de afstervingsfase. Beide RWV culturen werden gekenmerkt door een trage, zelfs afwezige afsterving (tot het laatste meetpunt) (zie figuur 15B). De bacteriële afsterving vanaf het bereik van het maximum was ongeveer 80x hoger in de schudcultuur dan in SMG. De OD van de controle conditie bleef constant of steeg licht tijdens de stationaire fase.

## 5.1.2 Gluconaatmeting

Een standaardreeks met gekende concentraties gluconaat werd gemeten met ionchromatografie. Dit liet toe de gemeten geleidbaarheden om te zetten in gluconaatconcentraties. De standaardcurve had de vergelijking  $y = 0,0443x + 0,0043$  en een  $R^2$ -coëfficiënt van 0,997. In figuur 16 worden de gluconaatconcentraties van de stalen uitgezet t.o.v. de kweekduur. Een logistische curve met 4 parameters vormde een goede modelering voor deze gluconaatcurves. De vergelijking luidde als volgt:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log C50 - x) \cdot \text{helling}}}$$



**Figuur 16:** Gluconaatconcentraties en OD i.f.v. tijd voor de verschillende groeicondities

De 4 parameters van de gluconaatcurves werden bepaald en uitgezet in tabel 7. Deze zijn de maximale en minimale gluconaatconcentraties in het medium, de C50 waarde (tijdstip waarbij 50% van het gluconaat opgebruikt werd) en de helling van de curve. Vermits de helling van de gluconaatcurves van beide RWV's geen significante parameter bleek te zijn, werd deze niet verder gebruikt.

Parameter	Min (g/l)	Max (g/l)	C50 (u)	Helling (g <sup>l</sup> u <sup>-1</sup> )
<b>Groeiconditie</b>				
Schudcultuur	0	2,37	59,3	5,82
RWV in SMG	0	1,93	114,6	5,81
RWV controle	0	2,38	36,7	1,02

**Tabel 7:** Parameters gluconaatverbruik voor de verschillende groeicondities

Om de efficiëntie van het gluconaatverbruik te bepalen voor de drie groeicondities werden de celconcentraties bij het tijdstip C50 met elkaar vergeleken. Deze waren voor de schudcultuur, de RWV in SMG en de controle RWV respectievelijk 0,48; 0,8 en 0,58 (uit vergelijking groeicurves zie tabel 6). De bacteriële cellen gekweekt in condities van gesimuleerde micrograviteit verbruiken de koolstofbron gluconaat op een efficiëntere manier in vergelijking met de schudcultuur ( $p < 0,05$ ) en de controle RWV ( $p < 0,05$ ). De schudcultuur en controle RWV verbruiken gluconaat met een gelijkaardige efficiëntie ( $p > 0,05$ ).

### 5.1.3 Ammoniumbepaling

De ammoniumconcentraties werden voor de verschillende groeicondities bepaald i.f.v. de tijd. De standaardcurve (OD i.f.v. ammoniumconcentratie) had als vergelijking  $y = 0,1087x + 0,0743$  en  $R^2$ -coëfficiënt 0,999.

De ammoniumconcentraties daalden niet significant tijdens de groei. Er wordt gesteld dat ammonium in overmaat aanwezig is in het 284 gluconaat medium waardoor eventuele verschillen in ammoniumverbruik tussen de verschillende groeicondities niet aantoonbaar zijn.

## 5.2 Analyse van differentiële genexpressie met Kwantitatieve PCR

### 5.2.1 Genselectie voor Kwantitatieve PCR (Q-PCR)

Q-PCR laat toe te bepalen of een gen in een bepaalde omstandigheid tot over-of onderexpressie komt of een ongewijzigde expressie kent. Voor de evaluatie van de LSMMG-omgeving op de genexpressie van *R. metallidurans* werden 28 genen geselecteerd die een rol kunnen spelen in de respons op gesimuleerde micrograviteit en 4 controlegenen.

Negen genen werden geselecteerd op basis van het overzichtsartikel van Nickerson en medewerkers [64]. In dit artikel wordt verondersteld dat een omgeving laag aan wrijving, zoals micrograviteit, wordt gevoeld aan de hand van mechanogevoelige sensoren. Op basis van de beschikbare genomische informatie van *R. metallidurans* werden 9 genen geselecteerd die behoren tot de functionele groep van de genen betrokken bij mechanische, nutritionele en oxidatieve stress (*rseB*, *kefA1*, *kefA*, *msrA*, *msrA1*, *msrA2*, *mscL*, *cutA*, *soxS*). Slechts twee hiervan hebben een gekende functie.

Drie andere genen werden opgenomen in de genselectie wegens hun overexpressie in het MESSAGE experiment (*grpE*, *dpsA*, *acxC*). Vermits de RWV tot doel heeft de simulatie van de ruimtelijke micrograviteit, zouden deze genen tot expressie gebracht in de ruimte ook in dit experiment tot overexpressie kunnen komen.

Een gen dat de algemene stressrespons weerspiegelt nl. *rpoS* werd tevens gekozen voor analyse met Q-PCR. Een hogere expressie in LSMMG omstandigheden van dit gen zou een mogelijke indicatie kunnen zijn voor een verhoogde stressresistentie in *Salmonella enterica*. Echter volgens Wilson *et al.* [73] zou de LSMMG een *rpoS* onafhankelijke stressrespons teweeg brengen tijdens de exponentiële fase. Door dit gen op te nemen in het experiment kan deze hypothese onderzocht worden voor *R. metallidurans*.

Het artikel “Microarray analysis identifies *Salmonella* genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon” door Wilson *et al.* [74] vormde de basis voor de selectie van 15 genen. In dit onderzoek werd een DNA microarray gebruikt om de transcriptionele respons

in te schatten van *S. enterica* serovar Typhimurium op LSMMG ten opzichte van identieke groeicondities in normale graviteit. Een gewijzigde expressie werd waargenomen voor 163 genen. Deze liggen verspreid over het gehele chromosoom en vertegenwoordigen functioneel diverse groepen waaronder transcriptionele regulatoren, virulentie factoren, lipopolysaccharide biosynthetische enzymen, ijzer-houdende enzymen en proteïnen met onbekende functie.

Via de DNA-sequentie van deze 163 genen werden, door middel van een multi-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), homologen gezocht in het testorganisme *R. metallidurans*. Een totaal van 79 genen beantwoordden aan deze voorwaarde. In het geval van meerdere homologen werden enkel de statistisch meest significante weerhouden. De functie van 9 van deze 79 genen werd reeds achterhaald voor *R. metallidurans* zijnde o.a. flagellaire biosynthese, proteïne vouwing en modificatie.

Vervolgens werd nagegaan welke van deze genen een multi hit of single hit vertoonden in *R. metallidurans*, enkel de genen met een single hit werden geselecteerd. Een verdere selectie vond plaats door de drempel van de expressie ratio (expressie van de *Salmonella* genen in LSMMG t.o.v. de controle) arbitrair te leggen op 0,38 voor de genen met een verminderde expressie en 8,0 voor de genen die tot overexpressie kwamen. Op die manier werd een verzameling van 7 down-gereguleerde en 8 up-gereguleerde genen bekomen.

Ook werd de grootte van de genen nagekeken zodat voor elk gen primers ontwikkeld konden worden.

Ook werden verschillende controlegenen uitgekozen (*uvrD*, *gyrB*, *bac16S*, *recA*). Deze genen worden onafhankelijk van de behandeling steeds tot expressie gebracht. Ze onderhouden de basisfunctie van de cel en worden de housekeeping of normalisatie genen genoemd. Het meest stabiele normalisatiegen werd bepaald en gebruikt voor de normalisatie van de Q-PCR-reacties over de verschillende stalen (zie 5.2.6. Bepaling van het meest stabiele normalisatiegen).

## 5.2.2 Ontwerp van primers voor Q-PCR

Het ontwerpen van de primers vond plaats met behulp van het programma Primer Express 2.0. van Applied Biosystems. De primers dienen aan bepaalde voorwaarden te voldoen:

- het percentage van de G en C basen moet ongeveer 50 bedragen
- G en C moeten vermeden worden op het 3' uiteinde van de primers, de kans op dimerisatie van de primers stijgt in dit geval. Concreet mochten de laatste vijf baseparen niet meer dan 2 G/C's bevatten.
- Zelfhybridisatie moet vermeden worden. De graad van homo en heterodimerisatie werd nagegaan aan de hand van het programma OligoAnalyser 3.0 (<http://biotools.idtdna.com/analyser/oligocalc.asp>). Concreet mocht de absolute delta G waarde van elk mogelijk dimeer niet meer bedragen dan 10% van de maximale delta G waarde.
- De primer dient enkel de targetsequentie te amplificeren. Een lokale BLAST werd uitgevoerd om na te gaan of de primersequentie niet elders voorkomt in het genoom van *R. metallidurans* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Dit was het geval voor 2 primerparen waardoor deze 2 genen (gen 4984 en gen 5352 van *R. metallidurans*), behorend tot de groep van de down-gereguleerde *Salmonella* homologen, niet verder werden bestudeerd.

De 26 primerparen voor de amplificatie van de geselecteerde genen tijdens Q-PCR staan vermeld in tabel 8. De annealing temperatuur bedroeg arbitrair 55 °C.

Gen			Primerpaar		Lengte amplicon (bp)	Smeltt° (°C)
Naam	Groep	Functie	Naam	Sequentie (5'-3')		
Geen	UpS	Niet gekend	G234Fw	ATCGGCGCGGTCATGT	63	58
			G234Rv	CACGATGGTGTGGCATCAT		59
<i>rseB</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G719Fw	AAACGTTGGACGGCAAACC	62	59
			G719Rv	AATCAGGCTGTGAACCACATCA		59
Geen	DownS	Niet gekend	G923Fw	GCGTATCAAGTCACCGTAATGC	71	58
			G923Rv	GCGCAAAGGATGGTTTCAT		59
<i>kefA1</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G938Fw	CATCCTCCGGCGAGTGAT	62	58
			G938Rv	CTTCTCCACCAGCACAAGCA		59
Geen	UpS	Niet gekend	G1369Fw	GCCAACACCAACGCCTACAT	74	59
			G1369Rv	CGCAGCATGGCAGTGAAG		59
<i>acxC</i>	MESS	Mogelijk aceton carboxylase subeenheid C	G1632Fw	TCGGCCCCGACATGTATA	60	58
			G1632Rv	CGCACTTGACCACCCACTT		58
<i>gdhA1</i>	UpS	mogelijk glutamaat dehydrogenase	G1986Fw	CGAAAACGTCCTCCAATGG	64	59
			G1986Rv	CACGGGCCGAGGTTGTC		60
<i>rpoS</i>	Stress	RNA polymerase sigma S (algemene stressrespons)	G2198Fw	CCGAACATTTCCGTGTCGAT	67	59
			G2198Rv	AGGCTGGAGTGGCAAGACCTGACG		59
Geen	UpS	Niet gekend	G2758Fw	CCGGGCGACGTGTTCTT	71	59
			G2758Rv	TCGATATGCGGACGACCAT		58
<i>msrA</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G3700Fw	ACGATCCGACGCAACTGAA	64	59
			G3700Rv	AAGATGCTGGAACGTAAGTGT		59
Geen	DownS	Niet gekend	G3757Fw	GTCAAGAGCGCAAAGGTCATC	68	59
			G3757Rv	GCGCCCAGACCCTTGAT		58
<i>cutA</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G3766Fw	GAGCAAGCGCAGGAATGG	63	59
			G3766Rv	TTCCAAGGCCGCGTACTG		59
Geen	UpS	Niet gekend	G3889Fw	TGAGGCGCACCGATTCT	60	59
			G3889Rv	CGCTTTCGCCGCACACTCTGC		59
<i>mscL</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G3927Fw	TTCTCGCATCATCTTTTCATG	68	59
			G3927Rv	AGGCTCTGCCTCCTTTTCG		58
<i>msrA2</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G4303Fw	GCGTGCAAGGCGTGTTT	91	58
			G4303Rv	ATCTCGTATTGGCGTTGCT		58
<i>ppiB</i>	UpS	proteïne modificatie en vouwing	G4517Fw	TGGCACGCACGTCGAA	61	59
			G4517Rv	TTATCCACCACATTGACGAAGAA		58
Geen	UpS	Niet gekend	G4547Fw	CGGCCAGATCCAGTTCTACATC	64	60
			G4547Rv	GCTTGAACCGGCATAGAC		58
<i>grpE</i>	MESS	mogelijk heat shock proteïne 24	G5036Fw	CCGTTGCGCAGGACGAAGT	67	58
			G5036Rv	CACGAGGTTATCGGCAAAGC		59
Geen	DownS	Niet gekend	G5173Fw	GCGCCAGATCGAGCAGTT	66	59
			G5173Rv	CGCATGCCCCTTGATAC		59
<i>dpsA</i>	MESS	DNA-bindend-ferritin-achtig proteïne	G5840Fw	ATCCGCGCATTGGGCTAT	60	60
			G5840Rv	CGAGGACAACCTGGCGTATTC		58
<i>msrA1</i>	Stress	mechanische, nutritionele, oxidatieve stress	G7104Fw	CGCCAGATCCTGGAGTTCTTC	64	60
			G7104Rv	CGTTGCCCTGGCGATTCT		60
<i>soxS</i>	Stress	AraC-type transcriptionele regulator (mech stress)	G7967Fw	CCGGATTGATGGCCATA	61	59
			G7967Rv	GTGACGGTATCGTTCGTAACCA		58
<b>Geen</b>	<b>DownS</b>	<b>Niet gekend</b>	<b>G8018Fw</b>	<b>GCCTTCGGCTCGCTACTG</b>	<b>79</b>	<b>58</b>
			<b>G8018Rv</b>	<b>TGAATGCGGTCAGCGAGAT</b>		<b>59</b>
<i>kefA</i>	Stress	Klein geleidend mechanosensitief kanaal	G8051Fw	GGAAAATTTCCACGAAGTGCAA	71	60
			G8051Rv	CGGCCAATAACAAGGCTCAAG		59
Geen	DownS	Niet gekend	G8780Fw	TCGCCTCCGTAATGTGACT	71	59
			G8780Rv	GACGCTGAGATATGCGATGAAG		59
Geen	UpS	Niet gekend	G9518Fw	CCCACGTCCCCTCTTATC	70	59
			G9518Rv	GATTTTGCCTTGGGAAATGAGA		59

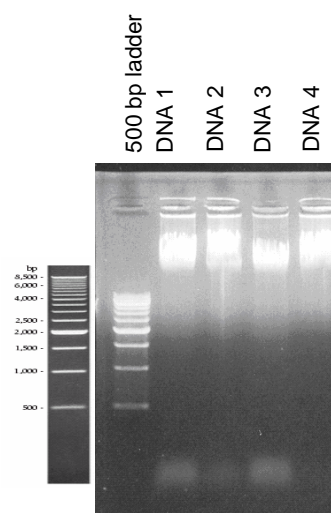
**Tabel 8:** Primersequenties voor RWV-experiment (Fw=Forward primer, Rv=Reverse primer, MESS=MESSAGE, DownS/UpS=Up en Downgereguleerde *Salmonella* analogen)

■ aspecifieke primerbinding (zie 5.2.4 Testen van de primers)

### 5.2.3 Standaard DNA

Om de primers te testen op het binden van de juiste sequenties en om de efficiëntie van de Q-PCR-reactie uit te testen, is DNA van *R. metallidurans* vereist. Hiervoor vond een DNA extractie plaats van 4 onafhankelijke culturen met de Promega kit (Promega Corporation). Het DNA werd gemeten bij verschillende golflengten (230, 260 en 280 nm) in de fotospectrometer (Eppendorf, Biophotometer). De DNA-stalen werden geladen op een agarose-gel (1,5%) (zie figuur 17), de migratie volgens MG gebeurde gedurende  $\pm 30$  min bij 100 V in de impid. Een 500 bp ladder (Invitrogen) werd toegevoegd.

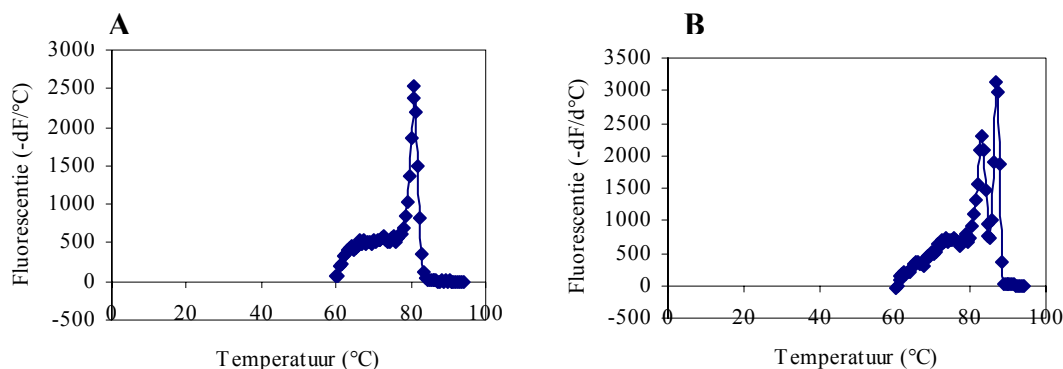
De 4 DNA stalen werden samengevoegd als een stock standaard DNA met een concentratie van 370  $\mu\text{g/ml}$  en een 260 nm/280 nm ratio van 1,96. Een tienvoudige standaardreeks werd gemaakt startend van een concentratie van 100  $\mu\text{g/ml}$  tot 0,01  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figuur 17:** DNA extractie onafhankelijke *R. metallidurans* culturen

### 5.2.4 Testen van de primers

De primerspecificiteit werd getest door het uitvoeren van een Q-PCR-reactie op DNA van *R. metallidurans* CH34 met een concentratie van 10  $\mu\text{g/ml}$  (uit standaard). De zuiverheid van het PCR-product werd nagegaan op basis van de dissociatiecurve. Door blootstelling van het dsDNA aan stijgende temperatuur ontstaat een dissociatie van het DNA bij de specifieke dissociatietemperatuur van het amplicon, zichtbaar als een piek op de dissociatiecurve. Indien twee pieken aanwezig zijn, werden 2 DNA-sequenties geamplificeerd. Dit was het geval voor primer G8018 (zie figuur 18B), waarschijnlijk te wijten aan een aspecifieke primerbinding. 27 van de 28 primers vertoonden één enkele piek in de dissociatiecurve (voorbeeld figuur 18A) en konden gebruikt worden voor het nagaan van de differentiële genexpressie.



**Figuur 18:** Dissociatiecurve van het cDNA-amplicon na specifieke (A) en aspecifieke (B) amplificatie met Q-PCR

## 5.2.5 Voorbereiding stalen voor Q-PCR

Er werd een staalselectie gemaakt representatief voor de volledige groeicurve (zie tabel 9) nl. tijdens de exponentiële fase, op het tijdstip met een maximale celdensiteit en tijdens de stationaire fase. Voor elk tijdstip werd het RNA van 2 stalen geëxtraheerd (zie tabel 10), omgezet naar cDNA (omgekeerde transcriptie) en gekwantificeerd met Q-PCR.

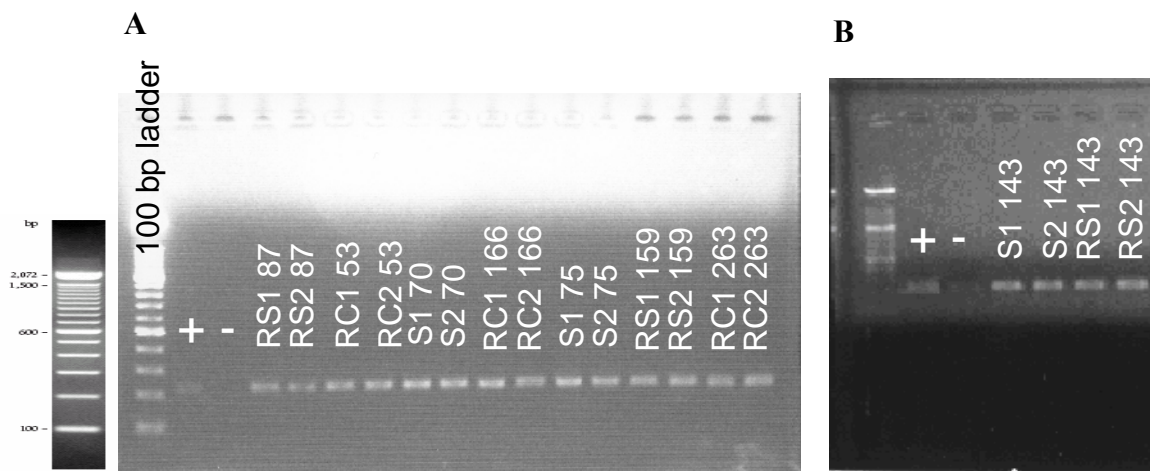
	RWV in SMG		RWV controle		Schudcultuur	
	Tijd (uur)	OD (600 nm)	Tijd (uur)	OD (600 nm)	Tijd (uur)	OD (600 nm)
Exponentiëel	87	0,50 ± 0,03	53	0,63 ± 0,03	70	0,70 ± 0,02
Maximum	143	1,21 ± 0,05	166	0,98 ± 0,02	75	1,35 ± 0,03
Stationair	159	1,16 ± 0,03	263	1,00 ± 0,03	143	0,96 ± 0,01

Tabel 9: Selectie stalen voor Q-PCR

	RWV in SMG		RWV controle		Schudcultuur	
	RNA (µg/ml)	260/280	RNA (µg/ml)	260/280	RNA (µg/ml)	260/280
Exponentiëel 1	14,26	1,86	13,57	1,98	6,22	1,69
	2	6,00	1,70	11,83	1,87	9,05
Maximum 1	49,64	2,03	9,14	1,84	85,76	1,93
	2	35,26	2,03	5,12	1,95	124,42
Stationair 1	6,96	1,86	3,55	1,65	27,12	1,90
	2	8,30	1,80	5,15	1,66	31,77

Tabel 10: RNA concentraties en 260/280 ratio's voor geselecteerde stalen

Zoals reeds vermeld werd een controle PCR (met *bac16S* als primerpaar, zie tabel 5) en agarose gelelektroforese uitgevoerd na de omgekeerde transcriptie van de geselecteerde stalen voor de evaluatie van de kwaliteit van het cDNA. Figuur 19 toont aan dat het cDNA gebruikt kan worden voor verdere analyse vermits een duidelijk signaal verkregen werd op de juiste positie in de gel voor elk cDNA. Een DNA ladder van 100 bp werd toegevoegd vermits de verwachte fragmentlengte 231 bp bedroeg. Als positieve controle werd een DNA staal geamplificeerd met dezelfde primers. De negatieve controle was de blanco van de RT-reactie (alle reactieproducten zonder template RNA). Gel B uit figuur 19 werd op een ander tijdstip uitgevoerd en de stalen migreerden minder lang. Dit verklaart de verschillende positie van de cDNA-banden op beide gels. Hoewel de DNA-ladder op deze rechter figuur minder duidelijk is, bevonden de cDNA-banden zich op de correcte positie.



Figuur 19: Controle RT-product voor eerste reeks (A) en tweede reeks (B) geselecteerde stalen (S=schudcultuur, RS=RWV in SMG, RC=RWV controle, 1/2=experiment in tweevoud, nummer=tijdstip staalname)



## 5.2.6 Bepaling van het meest stabiele normalisatiegenen

Het geNorm programma voor Microsoft Excel bepaalt de meest stabiele normalisatiegenen vanuit een set genen getest op een gegeven verzameling cDNA stalen. geNorm berekent de genexpressie stabiliteitswaarde  $M$ . Stapsgewijze eliminatie van het gen met de hoogste  $M$ -waarde rangschikt de geteste genen volgens hun expressiestabiliteit. De onderliggende principes en berekeningen zijn beschreven in Vandesompele et al [88].

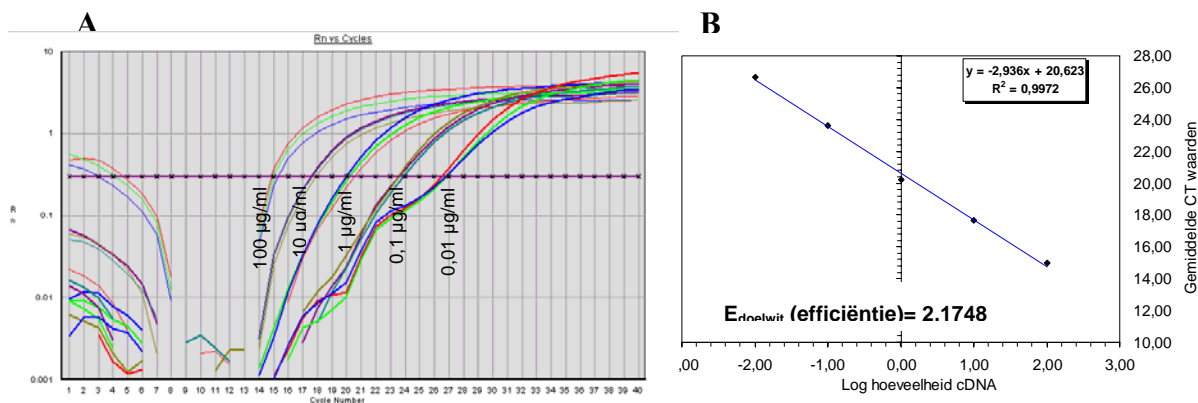
Elk staal werd in een Q-PCR-reactie in drievoud geamplificeerd met 6 normalisatieprimers (zie tabel 11). Na het invoeren van de  $C_T$ -waarden voor de stalen per primer in het programma werden de respectievelijke  $M$ -waarden berekend. Uit deze test bleek de  $uvrD'$  – expressie over de verschillende stalen het meest stabiele te zijn. Dit primerpaar werd verder gebruikt voor de normalisatie van de Q-PCR reacties.

Naam	Sequentie	Lengte amplicon (bp)	SmeltT° (°C)
uvrD	CATCGGTATAATTGCGGCCTAT	67	59
	GTTGAGATTGGCGAGCAGACT		58
uvrD'	ACCAGTTGCTCAAGACCTTTGG	110	60
	CTCCTTCACCACACCGATCA		58
gyrB	AACCAGAACAGCTACAAGGTTTCG	73	60
	ACTTCGACAGCGCGTTCAC		59
gyrB'	ACAACGGCGTGCATATCAAG	119	58
	GTGCAGCGTGGTCTTCGAG		59
bac16S	AGCGGTGGATGATGTGGATTAA	231	59
	TTGTCACCGGCAGTCTCTCAG		60
recA	TGATGTTGGTTCTCCCGAAA	110	59
	GACTTCGTCGCCCTTCTTGA		59

Tabel 11: Primers normalisatiegenen. *UvrD'* is het meest stabiele normalisatiegen, volgens geNorm, voor Q-PCR

## 5.2.7 PCR-efficiëntie bepalingen

De resultaten van de Q-PCR werden geëvalueerd gebruik makend van het programma Q-gene [89]. In een eerste stap werd de efficiëntie van de PCR-reactie nagegaan voor elk primerpaar. Hiervoor werd de DNA-standaardreeks gebruikt. Vermits de theoretische amplificatie van een 2x verdund staal 1 PCR-cyclus vereist, zal een tienvoudige verdunning 3,3 PCR-cycli verschillen. Door deze theoretische waarde te vergelijken met de experimentele waarden kan de efficiëntie van de PCR-reactie geëvalueerd worden, deze bedraagt optimaal 2 (tweevoudige toename van de hoeveelheid target cDNA tijdens 1 cyclus). Figuur 20A geeft een voorbeeld van een amplificatie plot en figuur 20B toont de bijhorende efficiëntie curve (uit Q-gene). Net als in dit voorbeeld, benaderden ook de andere primerparen de optimale efficiëntie-waarde. Met de efficiëntie wordt rekening gehouden voor verdere verwerking van de resultaten.



Figuur 20: Amplificatie van de DNA-standaardreeks met *dpsA* primers. De toename in fluorescentie ( $R_n$ ) na elke PCR-cyclus wordt weergegeven in A. De  $C_T$ -waarden i.f.v. de DNA-concentraties met bijhorende amplificatie-efficiëntie staan vermeld in B

## 5.2.8 Analyse resultaten

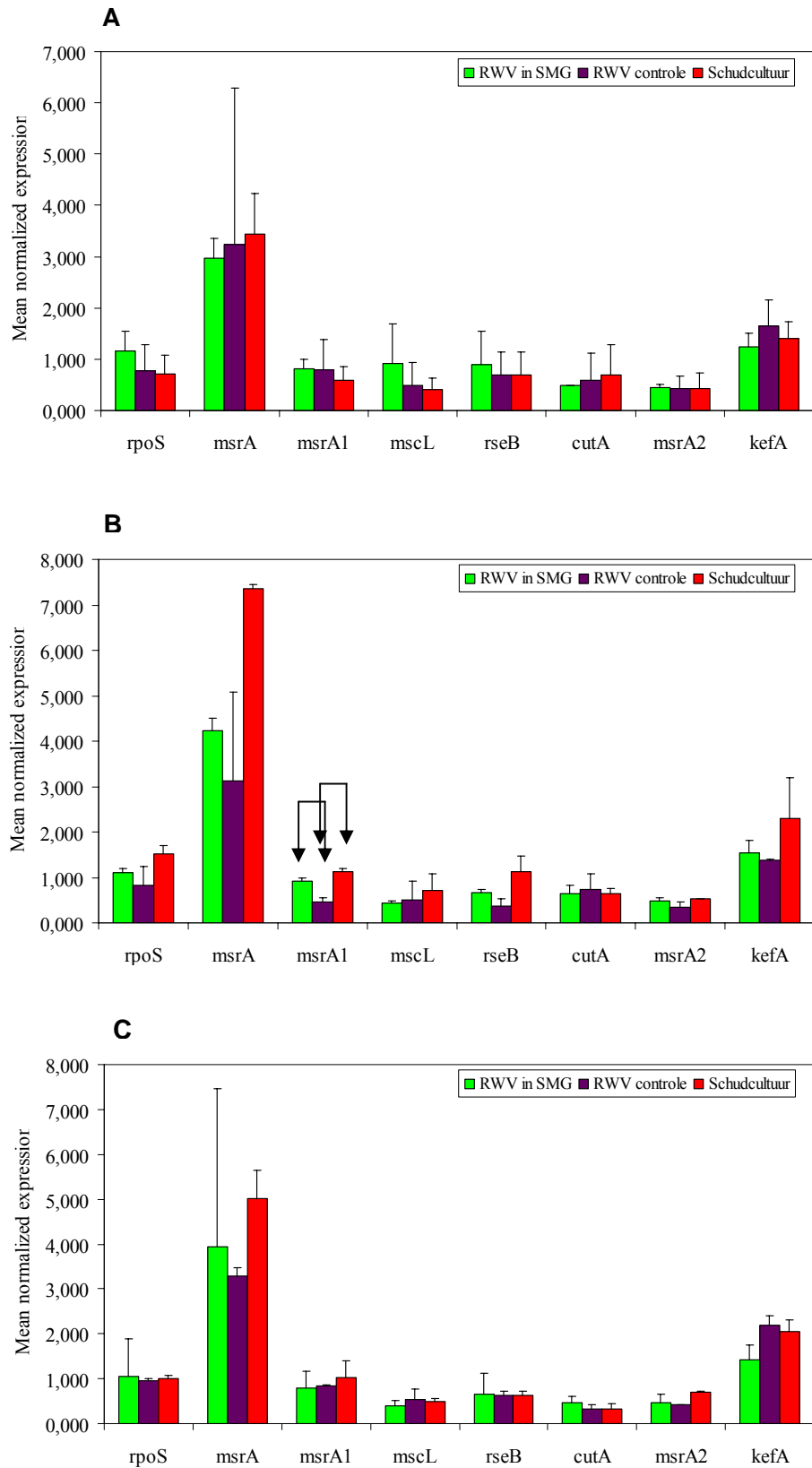
Vijftien van de 25 geselecteerde genen werden in dit onderzoek uitgetest. De normalisatie vond plaats per staal en per experiment vermits in elk Q-PCR experiment een amplificatie van de stalen met de *uvrD* primers ('housekeeping') werd opgenomen. Vermits de expressie van de 'housekeeping' genen gelijk dient te zijn in de drie cultuurcondities, werden eventuele verschillen in totale cDNA hoeveelheid tussen de stalen via deze weg geëlimineerd. Door de *uvrD* primers in elk Q-PCR-experiment voor elk staal op te nemen werden mogelijke inter-experimentele variaties uitgeschakeld. Tevens werd voor elke PCR-plaat een concentratie uit de DNA-standaardreeks geamplificeerd (met *uvrD*). De aldus bekomen  $C_T$ -waarde werd vergeleken met deze uit vorige experimenten en dient als interne controle. Het gehele experiment gebeurde in tweevoud.

De testgenen kunnen worden onderverdeeld in drie grote groepen nl. de stress genen (mechanische stress, algemene stressrespons), de MESSAGE genen en de *Salmonella* analogen. De resultaten (verwerkt met Q-gene) geven de gemiddelde genormaliseerde expressie weer i.f.v. de cultuurconditie voor elke fase van de groeicurve (zie figuur 21 t.e.m. figuur 23).

De grote standaardafwijkingen van sommige meetpunten zijn te wijten aan een grote biologische variabiliteit tussen de stalen van eenzelfde tijdspunt. In dit experiment werd elk relevant tijdspunt in duplicaat geanalyseerd.

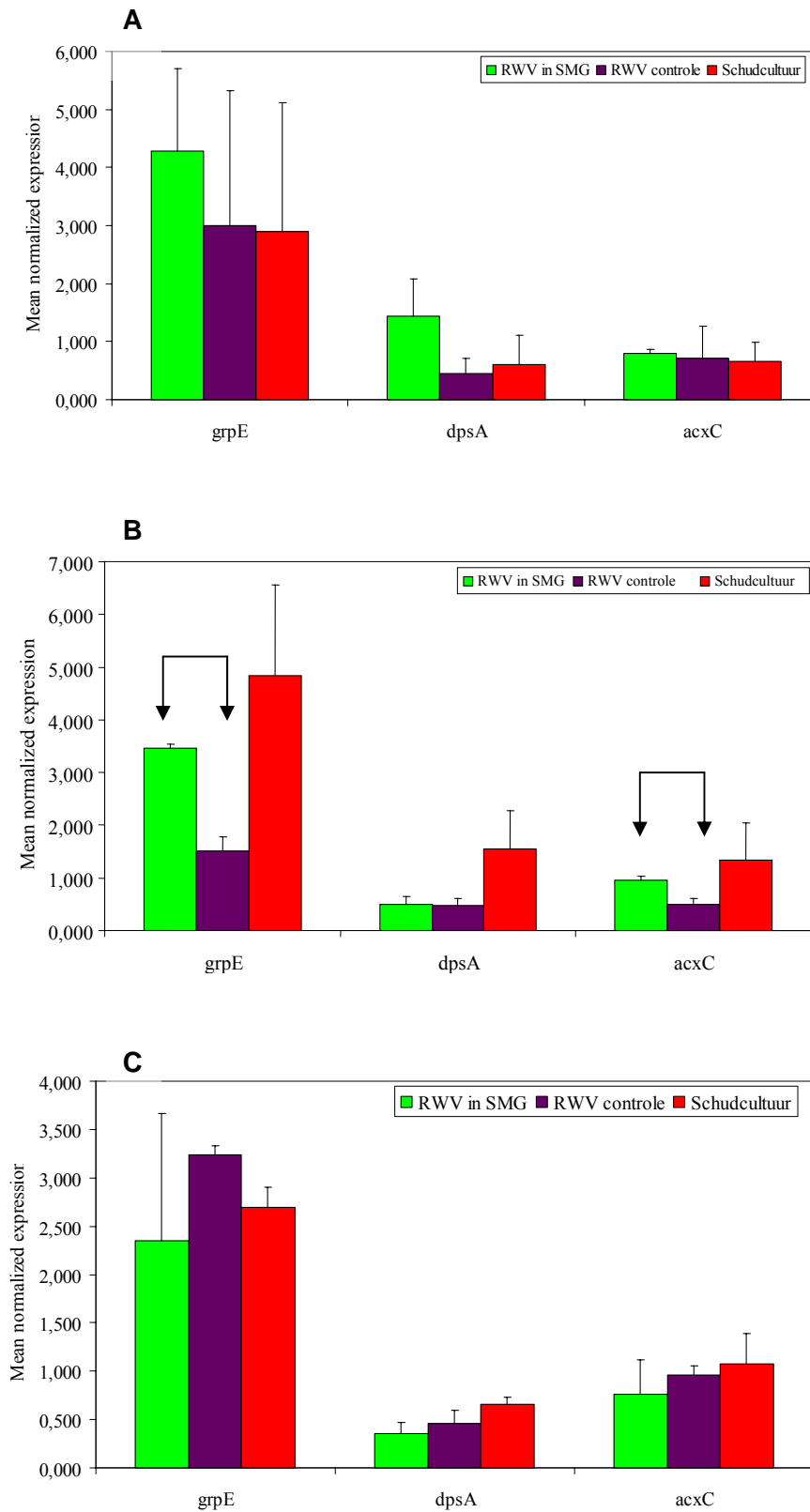
Bij het vergelijken van de genexpressie in de RWV in gesimuleerde micrograviteit en in controle positie werden 3 genen significant tot overexpressie gebracht ( $p < 0,05$ ) in gesimuleerde micrograviteit in het maximum van de groeicurve nl. *grpE*, *acxC* en *msrA1*. De MESSAGE genen *grpE* en *acxC* werden ongeveer 2x meer tot expressie gebracht in gesimuleerde micrograviteit. Het mechanisch stress gen *msrA1* kwam 2x meer tot uiting in zowel de RWV in SMG als in de schudcultuur in vergelijking met de controle RWV.

Hoewel geen significante verschillen aangetoond konden worden voor het *dpsA* gen in het maximum wegens een grote standaardafwijking, is er een tendens zichtbaar. De expressie van dit gen is driemaal hoger in de schudcultuur ten opzichte van beide RWV. In de exponentiële fase van de groeicurve komt *dpsA* minstens 3x meer tot expressie in gesimuleerde micrograviteit.



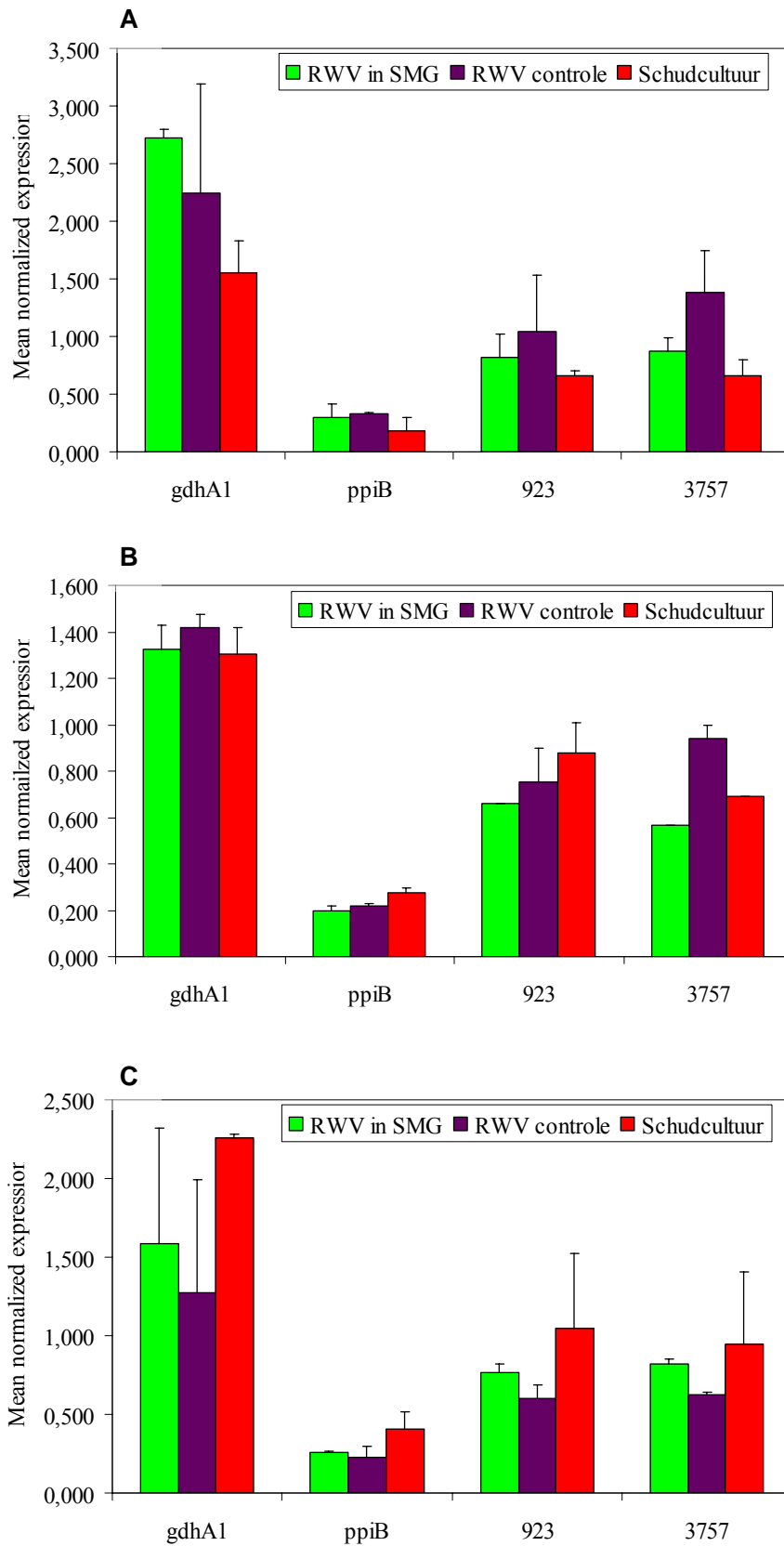
**Figuur 21:** Gemiddelde genormaliseerde expressie van de stress genen van *R. metallidurans* in gesimuleerde micrograviteit (SMG), in de horizontale controle (RWV controle) en in schudcultuur tijdens de exponentiële fase (A), bij maximale celdensiteit (B) en tijdens de stationaire fase (C)

↕ : significant verschil ( $p < 0,05$ )



**Figuur 22:** Gemiddelde genormaliseerde expressie van de MESSAGE genen van *R. metallidurans* in gesimuleerde micrograviteit (SMG), in de horizontale controle (RWV controle) en in schudcultuur tijdens de exponentiële fase (A), bij maximale celdensiteit (B) en tijdens de stationaire fase (C)

↓ : significant verschil ( $p < 0,05$ )



**Figuur 23:** Gemiddelde genormaliseerde expressie van de *Salmonella* analogen in gesimuleerde micrograviteit (SMG), in de horizontale controle (RWV controle) en in een schudcultuur. gdhA1 en ppiB maken deel uit van de Ups, 923 en 3757 behoren tot de Downs (zie tabel 8)

## 5.3 Proteïne-expressie: 2D gelelektroforese

### 5.3.1 Bereiding stalen voor proteomics

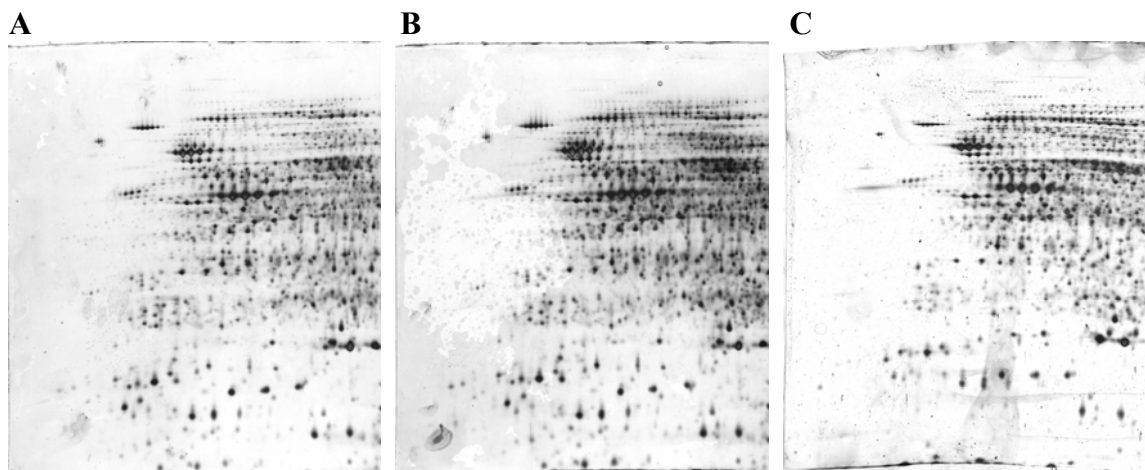
Voor het uitvoeren van 2D-gelelektroforese, werden stalen geselecteerd binnen de verschillende fasen van de groeicurve. De proteïne-extractie en dosage vond plaats voor 18 stalen. De standaardcurve met BgG kende de volgende vergelijking:  $y = 0,5055x - 0,0015$ . De  $R^2$ -coëfficiënt bedroeg 0,986. Op basis van deze standaardcurve werden de OD's (interactie tussen proteïnen en het Coomassie blauw) omgezet in proteïneconcentraties. De geselecteerde stalen met bijhorende OD en proteïneconcentratie staan vermeld in tabel 13.

	RWV in SMG			RWV controle			Schudcultuur		
	Tijd (uur)	OD (600 nm)	Proteïne (µg/µl)	Tijd (uur)	OD (600 nm)	Proteïne (µg/µl)	Tijd (uur)	OD (600 nm)	Proteïne (µg/µl)
Exp 1	95	0,58 ± 0,04	1,00	53	0,63 ± 0,03	1,42	70	0,70 ± 0,02	1,48
2			0,81			1,37			1,00
Max 1	143	1,21 ± 0,05	2,27	166	0,98 ± 0,02	2,89	75	1,35 ± 0,03	0,75
2			1,86			2,89			1,48
Stat 1	167	1,13 ± 0,06	2,12	263	1,00 ± 0,03	2,61	95	1,2 ± 0,02	1,87
2			2,32			2,74			2,01

*Tabel 13:* Selectie stalen voor proteomics met bijhorende OD en proteïneconcentraties (gemeten met Bradford colorimetrische techniek)

### 5.3.2 Proteïnegels

Voor elk van de proteïnestalen werd een 2D-gelelektroforese uitgevoerd met 50 µg proteïne. 10 van deze 18 gels werden verder geanalyseerd met de Delta2D software. Figuur 24 toont een gedigitaliseerde foto van een gel uit elke cultuurconditie op het maximum van de groeicurve..



*Figuur 24:* 2D gelelektroforese van de proteïnen uit de controle RWV (A), RWV in SMG (B) en schudcultuur (C)

### 5.3.3 Vergelijkende analyse

In deze fase wordt nagegaan of er verschillen zijn in de proteïne-expressie van *R. metallidurans* gekweekt in gesimuleerde micrograviteit en in de horizontale controle positie. Hiervoor worden de gels van gelijke tijdstippen met elkaar vergeleken gebruik makend van het programma Delta2D na het digitaliseren van de gels. Eerst vindt een normalisatie plaats om eventuele verschillen in hoeveelheid bij het laden van de proteïnen of in intensiteit van de zilverkleuring uit te schakelen. Elke gel krijgt een kleur (rood= RWV controle, groen=RWV in SMG). Vervolgens worden de gels over elkaar geplaatst zodat het overheersen van een bepaalde kleur wijst op een overexpressie in die specifieke conditie. Bij een gelijke expressie van een proteïne in beide gels wordt een zwarte kleur verkregen. De gels werden per paar geanalyseerd. Voor de stationaire fase en het maximum konden telkens 2 paar worden vergeleken. Enkel de proteïnespots die in de 2 paren een gewijzigde expressie vertoonden werden geselecteerd (zie figuur 25 en 26). Ook werden arbitrair enkel de spots die minstens een tweevoudig verschil vertoonden in beschouwing genomen. Voor de exponentiële fase werd slechts 1 gel paar geanalyseerd. De verschillen hier waargenomen konden niet gecontroleerd worden en werden niet gebruikt voor verdere analyse.

Op deze manier vertoonden 5 proteïnen in het maximum van de groeicurve en 4 proteïnen in de stationaire fase een gewijzigde expressie. Hiervan was één proteïne gemeenschappelijk (spot nr. 1 in het maximum en spot nr. 4 in de stationaire fase, zie figuur 25 en 26). Wel dient opgemerkt te worden dat enkel de meest opvallende spots in de selectie werden opgenomen.

De identificatie van deze proteïnen met massaspectrometrie vindt momenteel plaats en zal onderwerp uitmaken van later onderzoek.







## 6 Discussie

Wetenschappers hebben lang gepiekerd over de neveneffecten van ruimtevaart. Toen Yuri Gagarin zijn historische vlucht maakte in 1961 werd reeds gevreesd dat lange blootstelling aan ruimtevaartsomstandigheden ernstige gevolgen kon hebben. Het is nu duidelijk dat de ruimtevaart-omgeving verschillende effecten heeft op zowel mens als micro-organisme, hetgeen gevolgen kan impliceren voor ruimtevaarders. De unieke stress in de ruimte omvat fysische factoren zoals een erg gereduceerde graviteit, een ongewoon sterke straling, evenals, voor ruimtevaarders, psychologische stress veroorzaakt door het risico tijdens opstijgen en landen en de isolatie en opsluiting in een beperkte omgeving. Hoewel deze aspecten van belang zijn, wordt tegenwoordig veel aandacht gevestigd op de effecten van gereduceerde graviteit. De schadelijke effecten van micrograviteit op de mens werden gedocumenteerd. Astronauten kunnen tot 3% van de beenderdensiteit per maand verliezen en zijn bijgevolg meer vatbaar voor breuken bij lange ruimtereizen. Spieratrofie ten gevolge van de afwezigheid van het gewicht en beperkte lichaamsvoeding, is een additioneel probleem. Verder reduceert micrograviteit de bloedproductie en veroorzaakt het een onderdrukking van de immuunrespons. Studies op aarde wezen uit dat gereduceerde graviteit een belangrijke rol speelt in deze fysiologische wijzigingen [90].

De identificatie van honderden bacteriële soorten en fungi uit langdurende bemande missies toont aan dat deze organismen overleven en propageren in micrograviteit. Decontaminatieprocedures reduceren de bacteriële aanwezigheid maar elimineren ze niet vermits astronauten een belangrijk reservoir vormen van microbiële flora. De micro-organismen zijn o.a. intestinale bacteriën, opportunistisch pathogene organismen zoals staphylococci, streptococci en latente virussen. Recente studies tonen aan dat (opportunistische) pathogenen een probleem kunnen vormen, in het bijzonder in combinatie met een gewijzigde immuunrespons van de astronauten.

In deze studie werd micrograviteit gesimuleerd op aarde a.d.h.v. een roterende bioreactor. De invloed van deze omgeving werd onderzocht op het modelorganisme *Ralstonia metallidurans*. Drie testcondities werden met elkaar vergeleken: gesimuleerde micrograviteit (SMG), de RWV in controle positie (met de oriëntatie van de reactor als enig verschil t.o.v. SMG) en schudincubatie. Mogelijke verschillen werden gezocht op niveau van de groei, genexpressie, proteïne-expressie en verbruik van substraten in het medium.

De hogere groeisnelheid in de schudcultuur vergeleken met de RWV's zowel in SMG als in controle positie kan verklaard worden door een betere oxygenatie tijdens de schudincubatie. Het schudden van de culturen zorgt voor een constante menging van het medium terwijl uitwisseling van gassen in de RWV's enkel aan de oppervlakte mogelijk is. De natuurlijke habitat van *R. metallidurans* is de bodem en industriële gepolueerde sedimenten. Er wordt verondersteld dat een dergelijke omgeving die sterk verschillend is van een RWV-omgeving (bv. het epitheel van het gastro-intestinaal- en genito-uritaal stelsel) een suboptimale conditie is voor de groei van *R. metallidurans*. Verschillen tussen schudincubatie en de lage wrijvingscondities werden eveneens bekomen voor verschillende organismen [81, 91]. Lynch en medewerkers [81] observeerden een gelijke groeisnelheid voor *E. coli* AMS6 in SMG en 1 x g condities. De lag fase in de schudculturen was driemaal korter dan in beide RWV's. Voor *Pseudomonas aeruginosa* werden geen verschillen in groei opgemerkt tussen de verticaal en horizontaal geplaatste RWV [91]. De schudcultuur vertoonde echter een hogere finale celdensiteit. De lage wrijving of een andere factor zorgt waarschijnlijk voor een karakteristiek groeisignaal voor klassieke schudculturen en bacteriën gekweekt in de RWV. Soms werden er echter wel verschillen opgemerkt tussen culturen

gegroeid in gesimuleerde micrograviteit en controlecondities nl. voor *E. coli* NCTC 86 (ATCC 4157) en *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [68, 73]. Dit wijst op een verschillend groeipatroon in de RWV afhankelijk van de bacteriële stam en soort.

De lag fasen van de bacteriën gegroeid in SMG en in schudculturen waren gelijkaardig in tegenstelling tot de erg kortdurende lag fase in de controle RWV. Ondanks de snelle initiatie van de exponentiële fase waren de groeisnelheden tussen beide RWV's niet significant verschillend van elkaar. Een mogelijke hypothese was de verstopping van de gasuitwisselingsmembraan van de RWV na het bereiken van een bepaalde celdensiteit. De groei werd nl. snel geïnitieerd maar de groeisnelheid nam vervolgens af. Verstopping van de membraan is mogelijk vermits in 1g condities de cellen sedimenteren naar de bodem van het recipiënt, langs deze zijde is de membraan gevestigd. Om dit na te gaan werd de totale oppervlakte berekend die de bacteriën maximaal kunnen innemen tijdens de exponentiële fase. De bacteriën werden voorgesteld als sferen (diameter 0,2  $\mu\text{m}$ ) in een concentratie van  $10^8$  cellen per ml. Indien de cellen in een monolayer groeien zal de totale ingenomen oppervlakte 9,4  $\text{cm}^2$  bedragen. Vermits de oppervlakte van de gasuitwisselingsmembraan 48,6  $\text{cm}^2$  is, wordt slechts 20% van de membraan gekoloniseerd door *R. metallidurans* cellen in deze extreme situatie. Bijgevolg is er voldoende ruimte voor een adequate oxygenatie. De verstopping van de gasuitwisselingsmembraan ligt dus waarschijnlijk niet aan de basis van het geobserveerde fenomeen.

Een hypothese voor de snelle initiatie van de groei in de controle RWV is de vorming van biofilmen. De cellen sedimenteren naar de bodem van het recipiënt en bevinden zich hier in een zuurstof-rijke omgeving waar een optimale groei kan plaatsvinden. Gedurende de eerste 53 u van de groei kon dit fenomeen ongestoord plaatsvinden (zie figuur 15A). Bij de eerste meting werd intensief gevortext waardoor de cellen opnieuw in oplossing werden gebracht. Sindsdien vond een tragere groei plaats.

Er werden geen significante verschillen waargenomen in finale celconcentratie tussen de drie testcondities. De enige beschikbare literatuur over het genus *Ralstonia* toonde eveneens een ongewijzigd celtaal aan tussen SMG en controlecondities wanneer de cellen gekweekt werden in minimaal medium [82]. Als testorganisme werd *Ralstonia picketti* gebruikt.

Het verbruik van de koolstofbron gluconaat in het minimaal medium gebeurde efficiënter door de *R. metallidurans* cellen gekweekt in gesimuleerde micrograviteit. Deze observatie werd eveneens gedaan voor *E. coli* gekweekt in minimaal medium (koolstofbron glucose) zowel in gesimuleerde micrograviteit als in de ruimte door Brown en medewerkers [92]. Deze observaties steunen de hypothese dat de afwezigheid van sedimentatie en convectiestroom, ondervonden in orbit en gereduceerd in gesimuleerde micrograviteit, de geëxcreteerde bijproducten toelaat in de buurt van de bacteriële cellen te blijven, hetgeen het metabolisme verhoogt.

Op het maximum van de groeicurve werden 3 genen differentieel tot expressie gebracht nl. *acxC*, *grpE* en *msrA1*. De *grpE* en *acxC*-genen werden in gesimuleerde micrograviteit up-gereguleerd. Dit werd eveneens waargenomen, op proteïne niveau, in MESSAGE 1&2. Het *grpE*-gen (glucose regulated protein E) codeert voor een heat shock proteïne waarvan de expressie wordt geïnitieerd door sub-lethale omgevingsstress zoals nutritionele, osmotische, oxidatieve en temperatuurstress [93]. Het bacterieel aceton carboxylase (*acx*) katalyseert de ATP-afhankelijke carboxylatie van aceton tot acetoacetaat met de productie van AMP en twee anorganische fosfaten. Aceton is een toxisch molecuul dat geproduceerd wordt tijdens de fermentatie van sommige anaërobe bacteriën. Een grote groep van zowel aërobe als anaërobe bacteriën zijn in staat te groeien gebruik makend van aceton als primaire koolstof- en energiebron. De genen coderend voor de aceton carboxylase subeenheden zijn gegroepeerd in operons bestaande uit de genen *acxABC* coderend voor respectievelijk de  $\beta$ ,  $\alpha$ , en  $\gamma$ -

subeenheden van het enzym [94]. *R. metallidurans* is in staat aceton te gebruiken als koolstof- en energiebron en brengt in aanwezigheid van aceton het *acx*-complex 200x meer tot expressie (Leys, niet gepubliceerde data). Zowel in ruimte-omstandigheden als in gesimuleerde micrograviteit werd geen aceton aan het medium gevoegd noch kon aceton gedetecteerd worden na de ruimtevlucht. Dit kan wijzen op een nieuwe, onbekende functie van het *acx*-proteïne, mogelijks als respons op condities met een lage graviteit.

Het *msrA1*-gen behoort tot de groep van de genen die verband houden met nutritionele, oxidatieve en mechanische stress in *R. metallidurans*. Hoewel verwacht werd dat een omgeving met een lage wrijving een verlaging van de expressie van de stress-genen tot gevolg zou hebben, werd een overexpressie waargenomen in gesimuleerde micrograviteit en in schudincubatie. Opmerkelijk is dat zowel *grpE* als *msrA1* verband houden met stress en tot een lagere expressie komen in de controle RWV. Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat er in deze conditie minder stress heerst. In dit opzicht kunnen de cellen in de 1g conditie beschouwd worden als stationair, of licht centrifugaal in tegenstelling tot de SMG en schudculturen waar de cellen respectievelijk kleine cirkels (en bijgevolg constant bewegen) en grote bewegingen maken.

Het feit dat de waarnemingen in mRNA-expressie niet dezelfde zijn over de verschillende groeifasen is te wijten aan het feit dat er op RNA-niveau gewerkt wordt. mRNA is zeer onstabiel in tegenstelling tot rRNA, tRNA en DNA en zal snel na de aanmaak degraderen. Hierdoor gebeurt de translatie van mRNA tot proteïne in prokaryoten meestal onmiddellijk. In tegenstelling tot mRNA, zijn de meeste proteïnen stabiel. Na de vorming behouden deze hun functie en worden vaak ook doorgegeven bij de celdeling. Eenmaal het proteïne gevormd zal er bijgevolg vaak geen supplementair mRNA gevormd moeten worden tenzij er een constante inductie plaatsvindt. Hierdoor is het dus belangrijk om op het juiste tijdstip stalen te nemen voor het meten van de genexpressie met Q-PCR om de aanmaak van het mRNA niet te mislopen.

In dit onderzoek werden 4 genen geanalyseerd waarvan de analogen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium een gewijzigde expressie kenden in gesimuleerde micrograviteit. Er kon geen gelijkaardige observatie gedaan worden voor zowel de overgeëxprimeerde als de down-gereguleerde analogen in *R. metallidurans*.

Zoals eerder vermeld werd elk geselecteerd tijdstip van de groeicurve slechts in tweevoud geanalyseerd tijdens de Q-PCR. Dit leverde vaak grote spreidingen op waardoor de geobserveerde tendensen niet statistisch konden bevestigd worden. Een herhaling van het experiment met een groter aantal stalen per tijdstip dient bijgevolg plaats te vinden om deze tendensen te bevestigen. De meest opvallende bevinding was voor het *dpsA*-gen. Tijdens de exponentiële fase kwam dit gen ongeveer 3x meer tot expressie in SMG omstandigheden, de inductie vond enkel in deze fase plaats. Dit proteïne kwam ook tot overexpressie in de ruimte tijdens de MESSAGE experimenten. Op het maximum van de groeicurve was de *dpsA*-expressie gelijk in beide RWV's terwijl er een drievoudige overexpressie plaatsvond in de schudculturen. *dpsA* (DNA-binding proteïn from starved cells) is een niet-specifiek DNA-bindend proteïne van uitgehongerde cellen, het is het meest voorkomend proteïne in stationaire fase *E. coli* cellen. *DpsA* beschermt de cellen tegen oxidatieve stress tijdens de exponentiële fase terwijl het tijdens de stationaire fase het chromosoom organiseert tot een hoog geordend stabiel nucleoproteïne complex (biokristal). Dit beschermt de cel tegen zowel oxidatieve stress, UV en gamma-straling, thermische stress, zure en basische schok. Dit multifunctioneel proteïne zou deel uitmaken van diverse cellulaire processen en zijn werking uitoefenen via verschillende mechanismen. Vooreerst beschermt het proteïne het DNA via directe *DpsA*-DNA interacties hetgeen leidt tot een hoog stabiel biocrystal complex. *DpsA* zou ook rechtstreeks het DNA beschermen door te fungeren als alternatief doelwit voor reactieve stoffen. Ten tweede reduceert het proteïne de productie van oxidatieve radicalen door het

opvangen en mineraliseren van metaalionen, voornamelijk ijzer. Ten derde kan *dpsA* toxische peroxiden neutraliseren via zijn ferroxidase activiteit [95].

Opvallend voor de groeicurves van de cellen gekweekt in de schudincubator, is de plotselinge afname van het celaantal na het bereiken van het maximum. De cellen lijken geen stationaire fase te kennen en gaan meteen over in de afstervingsfase. Wanneer men het oog richt op de ruwe data van het gluconaatverbruik (zonder modelering van de curves) merkt men op dat het gluconaat in het medium volledig wordt opgebruikt tijdens de exponentiële fase voor de schudculturen. Het celaantal in beide RWV's blijft ongeveer constant tijdens de stationaire fase en meer dan 10% van de oorspronkelijke gluconaatconcentratie blijft aanwezig in het medium. Hieruit kan afgeleid worden dat de schudculturen zich, na het bereiken van het maximaal celaantal, in hongersnood bevonden terwijl de cellen in beide RWV's op elk ogenblik van de groei voldoende koolstofbron ter beschikking hadden. Het tekort aan gluconaat na het bereiken van het maximum voor de schudculturen kan in overeenstemming zijn met de afsterving van de cellen en de overexpressie van *dpsA*.

Voor wat betreft de proteïne-expressie, werden 5 proteïnen in het maximum van de groeifase en 4 proteïnen in de stationaire fase differentieel tot expressie gebracht wanneer SMG en controle condities met elkaar vergeleken werden. Beide fasen hadden één proteïne gemeenschappelijk. Identificatie van deze proteïnen met massaspectrometrie (MALDI-TOF) zal toelaten een hypothese te formuleren over hun mogelijke rol.

Dit is de eerste keer dat de effecten van gesimuleerde micrograviteit getest werden op het modelorganisme *R. metallidurans*. In dit eerste screeningsexperiment werden verschillen waargenomen in groei, genexpressie, metabolisme en proteïne-expressie tussen cultivatie in SMG en 1 x g controle. De drie genen die tot overexpressie kwamen in de ruimte tijdens het MESSAGE-experiment vertoonden eveneens een verhoogde expressie in gesimuleerde micrograviteit. Dit kan wijzen op het feit dat de gereduceerde graviteit zowel in ruimtevaartomstandigheden als in de verticaal roterende bioreactor een rol speelt in de expressie van deze genen. De hypothese dat *R. metallidurans* een verlaagde mechanische stress zou ondervinden in de roterende bioreactor werd niet bevestigd in dit onderzoek.

Vermits de constructie en het testen van een DNA-chip voor *R. metallidurans* momenteel plaatsvindt, zal binnenkort een micro-array uitgevoerd kunnen worden. Deze techniek neemt alle genen van *R. metallidurans* in beschouwing en laat een vergelijkende analyse toe van de genexpressie tussen SMG – en controlecondities. Additionele parameters zoals de morfologie, de membraanpermeabiliteit, de membraanpotentiaal evenals de resistentie aan stressfactoren (o.a. antibiotica, osmotische stress, temperatuur-, zure- en basische schok) zullen in de toekomst bepaald en vergeleken worden voor de drie testcondities. Eenmaal de respons op gesimuleerde micrograviteit gekend is voor het welgekende modelorganisme *R. metallidurans*, kan de studie plaatsgrijpen voor micro-organismen die een werkelijke bedreiging kunnen vormen voor ruimte-missies zoals *Staphylococcus*, *Micrococcus* en *Bacillus* species.

Het samenbrengen van al deze gegevens zal toelaten te zoeken naar de oorzakelijke factoren voor de geobserveerde wijzigingen. Bacteriën zijn tijdens hun levenscyclus namelijk blootgesteld aan een variëteit van fysische en mechanische krachten gaande van hydrostatische druk gradiënten en vloeibare wrijvingsstress tot constante krachten ondervonden door de graviteit. Wijzigingen in deze krachten resulteren in dynamische modificaties in de functie en het fenotype van microbiële cellen. Er is echter beperkte informatie beschikbaar over 'hoe' deze mechanische signalen worden vertaald naar biologische responsen. De studie van de bacteriële respons bij het wijzigen van deze mechanische en fysische krachten geeft bijgevolg inzicht in de sleutelmechanismen die verantwoordelijk zijn voor de cellulaire respons op stimuli uit de omgeving.

Deze studie laat toe de gevaren in te schatten van microbiële aanwezigheid en groei tijdens ruimtevluchten en maatregelen te ontwikkelen om microbiële risico's tot een minimum te beperken.

APS	Ammonium persulfaat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BgG	Bovine Gamma Globuline
Bp	Basepaar
C50	Tijd waarbij 50% van het substraat verbruikt is
cDNA	Complementair DNA
CHAPS	3-[(3cholamido-propyl)-dimethylammonio]-propaan-sulfonaat
C <sub>T</sub>	Cycle treshold
dsDNA	Dubbelstrengig DNA
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ESA	European Space Agency
GTC	Guanidine thiocynaat
g-vector	Gravitationiele vector
IEF	Iso-Elektrische Focussing
ISS	International Space Station
LSMMG	Low Shear Modeled Microgravity
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Desorption/Ionization-Time of Flight
MELiSSA	Micro-Ecological Life Support System Alternative
MESSAGE	Microbial Experiments in the Space Station about Gene Expression
MG	Moleculair gewicht
mRNA	Messenger RNA
M-waarde	Genexpressie stabiliteitswaarde
NASA	National Aeronautics and Space Administration
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	Isoelektrisch punt
Q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribosomaal RNA
RT	Reverse Transcriptase
RWV	Rotating Wall Vessel
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMG	Simulated MicroGravity
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Boorzuur EDTA
TBP	Tributyl phosphine
TEMED	NNN'N'-tetramethylethylenediamine
TGS	Tris glycine SDS
tRNA	Transfer RNA
UNG	Uracil-N-glycosylase

1. Klintworth, R. and H.J. Reher, Biological induced corrosion of materials II: new test methods and experiences from Mir station. *Acta Astronautica*, 1999. **44**(7-12): p. 569-578.
2. Pierson, D.L., M.R. McGinnis, and A.N. Viktorov, Microbiological Contamination. *Space biology and Medicine, Life support and Habitability* Washington, DC: American Institute of Aeronautics and Astronautics, 1994. **II**: p. 77-93.
3. Novikova, N.D., Review of the knowledge of microbial contamination of the Russian manned spacecraft. *Microbial Ecology*, 2004. **47**(2): p. 127-132.
4. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*. 2000. 774-783.
5. Burge, H.A., et al., Dynamics of airborne fungal populations in a large office building. *Current Microbiology*, 2000. **40**(1): p. 10-16.
6. Mishra, S., et al., Environmental mycology and its importance to public health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1992. **30**(1): p. 287-305.
7. Pierson, D.L., et al., Preflight and postflight microbiological results from space shuttle crews. SAE Technical Paper Series no.932139. Warrendale, Pennsylvania: Society of Automotive Engineers, 1993.
8. Stowe, R.P., C.F. Sams, and S.K. Mehta, Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *Journal of Leukocyt Biology*, 1999. **65**(2): p. 179.
9. Gmünder, F.K., et al., A ground-based model to study the effects of weightlessness on lymphocytes. *Biology of the Cell*, 1990. **70**(1-2): p. 33-38.
10. Gmünder, F.K., et al., Cellular immunity in cosmonauts during long duration space flights on board the orbital Mir-station. *Journal of Aviation, Space & Environmental Medicine*, 1994. **65**(5): p. 419-423.
11. Konstantinova, I., et al., Immune changes during long-duration missions. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993. **54**(3): p. 189-201.
12. Konstantinova, I.V. and B.B. Fuchs, *The Immune System in Space and Other Extreme Conditions*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1991.
13. Voss, E.W., Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science*, 1984. **225**(4658): p. 214-215.
14. Ferguson, J.K., G.R. Taylor, and B.J. Mieszkuc, Microbiological investigations. *Biomedical results of Apollo*, 1975: p. 83-103.
15. Pierson, D.L., *Microbiology. Space Physiology and Medicine*, 3rd edition Philadelphia, Pennsylvania: Lea and Febiger, 1993: p. 157-166.
16. Payne, D.A., et al., Epstein-Barr virus in astronaut saliva before, during and after space flight. *Journal of Aviation, Space and Environmental Medicine*, 1999. **70**: p. 1211-1213.
17. Mehta, S.K., et al., Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *Journal of Infectious Diseases*, 2000. **182**(6): p. 1761-1764.
18. Stowe, R.P., et al., Stress-induced reactivation of Epstein-Barr virus in astronauts. *Neuromodulation*, 2000. **8**(2): p. 51-58.
19. Taylor, G.R., et al., Changes in the immune system during and after spaceflight. *Advances in Space Biology and Medicine*, 1997. **6**: p. 1-32.
20. Borchers, A.T., C.L. Keen, and M.D. Gershwin, Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. *Nutrition*, 2002. **18**(10): p. 889-898.
21. Putcha, L. and N.M. Cintron, Pharmacokinetic Consequences of Spaceflight. *Ann. N.Y. SCI.*, 1990. **618**: p. 615.

22. Rodgers, E.B., Ecology of microorganisms in a small closed system: potential benefits and problems for space station. National Aeronautics and Space Administration, Technical Memorandum-86563, Washington, DC, 1987.
23. Viktorov, A.N., Microflora of cabins of manned space objects and the problem of biological damage to the structural materials used in them. *Biologiya Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina*, 1992. **26**(3): p. 41-48.
24. Gu, J., et al., The role of microbial biofilms in deterioration of space station candidate materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998. **41**(1): p. 25-33.
25. Ahearn, D.G., et al., Fungal colonization of synthetic substrates for use in spacecraft. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995. **14**(1): p. 26-30.
26. Zaloguyev, S.N. and A.N. Viktorov, Results of microbiological studies performed during the use of Salyut-6 Space Station. *Kosmicheskaya Biologiya i Aviakosmicheskaya Meditsina*, 1985. **3**: p. 64-66.
27. Lattenmayer, C., Preliminary evaluation of growth kinetics with ammonium as nitrogen source in the photoautotrophic compartment of MELiSSA. ESA/EWP-2127, 2001.
28. Pierson, D.L., Microbial contamination of the spacecraft. *Gravitational Space Biology Bulletin*, 2001. **14**(2): p. 1-6.
29. Kacena, M.A., et al., Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999. **51**(2): p. 229-234.
30. Kacena, M.A., et al., Low gravity and inertial effects on the growth of *E. coli* and *B. subtilis* in semi-solid media. *Journal of Aviation, Space & Environmental Medicine*, 1997. **68**(12): p. 1104-1108.
31. Kacena, M.A. and P. Todd, Growth characteristics of *E. coli* and *B. subtilis* cultured on an agar substrate in microgravity. *Microgravity Science and Technology*, 1997. **1**: p. 58-62.
32. Mattoni, R.H., Space flight effects and gamma radiation interaction on growth and induction of lysogenic bacteria: a preliminary result. *Bioscience*, 1968. **18**: p. 602-608.
33. Klaus, D.M., M.W. Luttgies, and L.S. Stodieck, Investigation of space flight effects on *Escherichia coli* growth. SAE technical paper series, SAE 941260, 1994.
34. Klaus, D.M., et al., Investigation of space flight effects on *E. coli* and a proposed model of underlying physical mechanisms. *Microbiology*, 1997. **143**(2): p. 449-455.
35. Mennigmann, H.D. and M. Lange, Growth and differentiation of *Bacillus subtilis* under microgravity conditions. *Naturwissenschaften*, 1986. **73**: p. 415-417.
36. Kacena, M.A., B. Manfredi, and P. Todd, Effects of space flight and mixing on bacterial growth in low volume cultures. *Microgravity Science and Technology*, 1999. **12**(2): p. 74-77.
37. Bouloc, P. and R. D'Ari, *Escherichia coli* metabolism in space. *Journal of Genetic Microbiology*, 1991. **137**: p. 2839-2843.
38. Gasset, G., et al., Growth and division of *Escherichia coli* under microgravity conditions. *Research in Microbiology*, 1994. **145**(2): p. 111-120.
39. Mattoni, R.H., et al., The experiments of Biosatellite 2. NASA SP, 1971. **104**: p. 304-324.
40. Kordium, V.A., L.V. Polidova, and A.L. Mashinsky, Space flight effects on developing organisms. Kiev: Nonkova Dunka Publishers, 1978: p. 64-68.
41. Thévenet, D., R. D'Ari, and P. Bouloc, The SIGNAL experiment in Biorack: *Escherichia coli* in microgravity. *Journal of Biotechnology*, 1996. **47**(2-3): p. 89-97.
42. Mennigmann, H.D. and M. Heise, Proceedings of the 5th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 1994: p. 83-87.



43. Richoilley, G., et al., Preliminary results of the "paramecium" experiment. *Naturwissenschaften*, 1986. **73**: p. 404-406.
44. Tixador, R., et al., Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions. *Journal of Aviation, Space and Environmental Medicine*, 1994. **65**(6): p. 551-556.
45. Todd, P., Gravity dependent processes and intracellular motion. *American Society for Gravitational and Space Biology*, 1991. **4**(2): p. 35-39.
46. Berg, H.C. and L. Turner, Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *Escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering. *Biophysical Journal*, 1990. **58**(4): p. 919-930.
47. Barford, J.P., N.B. Pamment, and R.J. Hall, Microbial population dynamics, 1982: p. 56-87.
48. Nanninga, N. and C.L. Woldringh, Cell growth, genome duplication, and cell division. *Molecular Cytology of Escherichia coli*, 1985: p. 259-318.
49. Lams, K.S., et al., The effects of space flight on the production of monorden by *Humicola fuscoatra* WC5157 in solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1998. **49**(5): p. 579-583.
50. Tixador, R., et al., Study of minimal inhibitory concentration of antibiotics on bacteria cultivated in vitro in space (Cytos 2 Experiment). *Journal of Aviation, Space & Environmental Medicine*, 1985. **56**(8): p. 748-751.
51. Mishra, S. and D.L. Pierson, Space flight: effects on microorganisms. J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of microbiology*, vol. 4. Academic press, Inc. San Diego, Calif. 1992. 53-60.
52. Lapchine, L., et al., Antibiotic activity in space. *Drugs Experiments and Clinical Research*, 1986. **12**: p. 933-938.
53. Kacena, M.A. and P. Todd, Gentamicin: Effect on *E. coli* in Space. *Microgravity Science and Technology*, 2000. **XII**(3-4).
54. Juergensmeyer, M.A., E.A. Juergensmeyer, and J.A. Guikema, Long-term exposure to spaceflight conditions affects bacterial response to antibiotics. *Microgravity Science and Technology*, 1999. **XII**(1): p. 41.
55. Taylor, G.R. and S.N. Zaloguev, Methods for microbiological and immunological studies of space flight crews. NASA-TM-X-58185, 1978.
56. Volz, P.A., Mycology studies in space. *Mycopathologia*, 1990. **109**(2): p. 89-98.
57. Mehta, S.K., et al., Stress-induced subclinical reactivation of *Varicella zoster* virus in astronauts. *Journal of Medical Virology*, 2004. **72**(1): p. 174-179.
58. Leys, N., et al., Gene expression in *Ralstonia metallidurans* CH34 in space flight. *European Symposium on Environmental Biotechnology, ESEB 2004 - Verstraete* (ed), 2004.
59. Schwarz, R.P., D.A. Wolf, and T. Trinh, Rotating cell culture vessel. U.S. patent 5,026,650, 1991.
60. Hammond, T.G. and J.M. Hammond, Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *American Journal of Physiology and Renal Physiology*, 2001. **281**(1): p. F12-F25.
61. Klaus, D.M., Clinostats and bioreactors. *Gravitational Space Biology Bulletin*, 2001. **14**(2): p. 55-64.
62. Tianqing, L., et al., Analysis on forces and movement of cultivated particles in a rotating wall vessel bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2004. **18**: p. 97-104.
63. Klaus, D.M., P. Todd, and A. Schatz, Functional weightlessness during clinorotation of cell suspensions. *Advanced Space Research*, 1998. **21**(8-9): p. 1315-1318.
64. Nickerson, C.A., et al., Low-shear modeled microgravity: a global environmental regulatory signal affecting bacterial gene expression, physiology and pathogenesis. *Journal of Microbiological Methods*, 2003. **54**(1): p. 1-11.

65. Fang, A., et al., Gramicidin S production by *Bacillus brevis* in simulated microgravity. *Current Microbiology*, 1997. **34**(4): p. 199-204.
66. Demain, A.L. and A. Fang, Secondary metabolism in simulated microgravity. *The Chemical Record*, 2001. **1**(4): p. 333-346.
67. Fang, A., et al., Secondary metabolism in simulated microgravity: beta-lactam production by *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1997. **18**(1): p. 22-25.
68. Fang, A., et al., Effect of simulated microgravity and shear stress on microcin B17 production by *Escherichia coli* and on its excretion into the medium. *Applied Environmental Microbiology*, 1997. **63**(10): p. 4090-4092.
69. Fang, A., et al., Growth of *Streptomyces hygroscopicus* in rotating-wall bioreactor under simulated microgravity inhibits rapamycin production. *Applied Microbiological Biotechnology*, 2000. **54**(1): p. 33-36.
70. Fang, A., et al., Relief from glucose interference in microcin-B17 biosynthesis by growth in a rotating-wall bioreactor. *Letter of Applied Microbiology*, 2000. **31**(1): p. 39-41.
71. Gao, Q., et al., Shear stress enhances microcin B17 production in a rotating wall bioreactor, but ethanol stress does not. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001. **56**(3-4): p. 384-387.
72. Neidhardt, F.C., et al., Environmental regulation of virulence gene expression in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella*. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd edition, volume 2. ASM Press, Washington, D.C., 1996.
73. Wilson, J.W., et al., Low-shear modeled microgravity alters the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium stress response in an *rpoS*-independent manner. *Applied Environmental Microbiology*, 2002. **68**(11): p. 5408-5416.
74. Wilson, J.W., et al., Microarray analysis identifies *Salmonella* genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(21): p. 13807-13812.
75. Hengge-Aronis, R., The general stress response in *Escherichia coli*. G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, D.C., 2000: p. 161-178.
76. Loewen, P. and R. Hengge-Aronis, The role of sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annual Reviews Microbiology*, 1994. **48**: p. 53-80.
77. Fang, A., et al., The alternative sigma factor *KatF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(24): p. 11978-11982.
78. Coynault, C., V. Robbe-Saule, and F. Norel, Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the *rpoS* (sigma S) regulon. *Molecular Microbiology*, 1996. **22**(1): p. 149-160.
79. Coynault, C. and F. Norel, Comparison of the abilities of *Salmonella typhimurium* *rpoS*, *aroA* and *rpoS aroA* strains to elicit humoral immune responses in BALB/c mice and to cause lethal infection in athymic BALB/c mice. *Microbial Pathology*, 1999. **26**(6): p. 299-305.
80. Nickerson, C.A. and R. Curtiss, Role of sigma factor *rpoS* in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infection and Immunology*, 1997. **65**(5): p. 1814-1823.
81. Lynch, S.V., E.L. Brodie, and A. Matin, Role and regulation of sigma S in general resistance conferred by low-shear simulated microgravity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2004. **186**(24): p. 8207-8212.
82. Baker, P.W. and L. Leff, The effect of simulated microgravity on bacteria from the Mir space station. *Microgravity Science and Technology*, 2004. **15**(1): p. 35-41.

83. Nickerson, C.A., et al., Microgravity as a novel environmental signal affecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infection and immunity*, 2000. **68**(6): p. 3147-3152.
84. Fox, G.E., et al., The effect of simulated microgravity on microbial gene expression. <http://www.isso.uh.edu/publications/A2001/pdf/104-fox.pdf>, 2002.
85. Johanson, K., et al., *Saccharomyces cerevisiae* gene expression changes during rotating wall vessel suspension culture. *Journal of Applied Physiology*, 2002. **93**(6): p. 2171-2180.
86. Vandamme, P. and T. Coenye, Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004. **54**(6): p. 2285-2289.
87. Zwietering, M.H., et al., Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990. **56**(6): p. 1875-1881.
88. Vandesompele, J., et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 2002. **3**(7).
89. Perikles, S., Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics Applications Note*, 2003. **19**(11): p. 1439-1440.
90. Lynch, S.V. and A. Matin, Travails of microgravity: man and microbes in space. *Biologist*, 2005. **52**(2).
91. England, L.S., M. Gorzelak, and J.T. Trevors, Growth and membrane polarization in *Pseudomonas aeruginosa* UG2 grown in randomized microgravity in a high aspect ratio vessel. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003. **1624**(1-3): p. 76-80.
92. Brown, B., D.M. Klaus, and P. Todd, Effects of space flight, clinorotation and centrifugation on the substrate utilization efficiency of *E. coli*. *Microgravity Science and Technology*, 2002. **XIII**(4): p. 24-29.
93. Gawande, P.V. and M.W. Griffiths, Effects of environmental stresses on the activities of the *uspA*, *grpE* and *rpoS* promoters of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 2004. **99**(1): p. 91-98.
94. Boyd, J.M., H. Ellsworth, and S.A. Ensign, Bacterial acetone carboxylase is a manganese-dependent metalloenzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(45): p. 46644-46651.
95. Nair, S. and S. Finkel, *Dps* protects cells against multiple stresses during stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 2004. **186**(13): p. 4192-4198.

## DANKWOORD

---

Vooreerst had ik het onderzoekscentrum SCK•CEN, mijn promotor Prof. Frank Deconinck en Dr. Max Mergeay, hoofd van het laboratorium Radiobiologie en Microbiologie, willen bedanken om me de mogelijkheid te geven dit laatstejaarsproject te vervullen.

In het bijzonder dank ik mijn stagebegeleider, Dr. Patrick De Boever, die me kennis en inzicht heeft bijgebracht, me heeft gestuurd en begeleid in dit onderzoek om te evolueren tot een geboeid zelfstandig wetenschapper.

Ook gaat mijn waardering uit naar iedereen van het labo Radiobiologie en Microbiologie aan het SCK•CEN voor de aangeleerde technieken, me wegwijs te maken in het labo, de hulpverlening bij problemen en vragen en de erg aangename sfeer. Dank aan Natalie, Ilse, Annik, Larissa, Benny, Felice, Louis, Joris, Sébastien, Hanane, Marcella, Sarah, Werner, Rafi, Arlette, Paul&Paul, Jasmine, Iris, Greet, Joyce en Monica.

Voor de gluconaatanalysen dank ik Jean Wannijn van het labo Radio Ecologie.

Verder wens ik Dr. Ruddy Wattiez, Prof. Paul Falmagne en het "Proteomics team" in Bergen te bedanken om de kans gekregen te hebben proteïne analyses aan te leren en uit te voeren. Dank aan Catherine, Benoît, Caroline, Benjamin, ...

Tot slot, maar zeker niet te onderschatten, gaat mijn dank uit naar mijn ouders, mijn vriend en vriendenkring. Zij hebben me gesteund en gemotiveerd tijdens de wat moeilijkere momenten die wetenschap en onderzoek met zich meebrachten en mijn enthousiasme gedeeld tijdens talrijke positieve ervaringen.