

Technische Universität München
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

**Hochdruckinduzierte Stressantwort bei
Lactobacillus sanfranciscensis DSM 20451^T**

Sebastian Georg Hörmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst-Christian Langowski
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Rudi F. Vogel
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Walter Staudenbauer, i.R.

Die Dissertation wurde am 08.11.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.12.2007 angenommen.

NATURA IN MINIMIS MAXIMA
(Unendlich groß ist die Rolle des unendlich Kleinen in der Natur)

Louis Pasteur (1822 – 1895)

Mein Dank:

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts „Einfluss von Hochdruck auf molekulare und zelluläre Systeme in Lebensmitteln“ (Förderungsnummer:358-2). Für die finanzielle Unterstützung sei herzlichst gedankt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Rudi Vogel danke ich ganz besonders für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in sein Team und die überdurchschnittlich angenehme und kooperative Arbeitsatmosphäre an seinem Lehrstuhl.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Staudenbauer und Herrn Prof. Dr. Eberhard Geiger bedanke ich mich, dass sie sich als Prüfer und Prüfungsvorsitzender zur Verfügung stellen.

Herrn PD Dr. Matthias Ehrmann möchte ich ganz herzlich für die gute Betreuung während meiner Arbeit, die hilfreichen Tipps und die fruchtbaren Diskussionen danken. Einen sympathischeren und besseren Betreuer konnte ich mir Dank seiner bayerischen Gelassenheit kaum wünschen.

Allen KollegInnen und MitarbeiterInnen am Lehrstuhl danke ich für eine lehrreiche, schöne und sehr lustige Zeit am Lehrstuhl. Vor allem Melanie, Jürgen, Susanne, Clarissa und Noline, sowie Moni und Angela, danke ich für die kooperative und harmonische Zusammenarbeit.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die ständige Unterstützung und Hilfe. Ohne sie wäre es niemals soweit gekommen, dass ich jetzt diese Danksagung schreiben darf.

Schließlich danke ich Sandra für ihr Verständnis, ihre Hilfsbereitschaft und ihre bis zuletzt anhaltenden Motivationshilfen. Aber auch die Ablenkungen und Zerstreuungen waren immer sehr willkommen.

Wissenschaftliche Beiträge:

- Vorträge:** Hörmann S., M. Ehrmann, und R. F. Vogel. „Hochdruck-Stressantwort bei Bakterien: Molekularbiologie“. Gemeinsames Statusseminar von BMBF-, DBU- und DFG-geförderten Forschungsprojekten, „Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln“, Berlin, Oktober 2003.
- Vogel R.F., M. Pavlovic, S. Hörmann and M. Ehrmann. „High pressure sensitive gene expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*“. 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology”, Rio de Janeiro, Brazil, September 27-30, 2004.
- Ehrmann M., S. Hörmann, M. Pavlovic und R.F. Vogel. „Hochdruckinduzierte Genexpression in *Lactobacillus sanfranciscensis*“. DFG Statusseminar "Hochdruck-Lebensmitteltechnologie und –Bioverfahrenstechnik", Freising, Oktober 2004.
- Hörmann S., M. Ehrmann and R.F. Vogel. „Proteome answer of *Lactobacillus sanfranciscensis* to high pressure and other stresses“. EU-COST D30/007/04 WG Meeting 2004, “High pressure tuning of biochemical processes: Macromolecular interaction and cellular physiology” Freising, November 04–06, 2004.
- Poster:** Hörmann S., M. Ehrmann and R.F. Vogel. "Identification of high pressure sensitive promoters in *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.53". XLII EHPRG Meeting (European High Pressure Research Group) on “Advances in High Pressure Research” Lausanne, Switzerland, September 1-4, 2004.
- Pavlovic M., S. Hörmann, M. Ehrmann and R.F.Vogel. „Effect of sublethal high pressure on the transcriptom of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.53”. 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology” Rio de Janeiro, Brazil, September 27–30, 2004.
- Hörmann S., M. Ehrmann and R.F. Vogel. „Construction of a reporter-system for identification of high pressure sensitive promoters in lactic acid bacteria”. 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology” Rio de Janeiro, Brazil, September 27–30, 2004.
- Hörmann S., M. Ehrmann and R.F. Vogel. “Development and construction of a reporter system based on the *melA* gene to study the NaCl dependent *dnaK*-promoter activity of *Lactobacillus sanfranciscensis*”. (C004) FEMS Meeting 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, Netherlands, August 28 – September 1, 2005.
- Hörmann S., M. Ehrmann and R.F. Vogel. “Development of a high pressure regulated expression system in *Lactobacillus sanfranciscensis*” (K011) FEMS Meeting 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, Netherlands, August 28 – September 1, 2005.
- Publikationen:** Scheyhing C.H., S. Hörmann, M. Ehrmann and R.F. Vogel. “Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T”. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 39(3):284-9.
- Hörmann S., M. Pavlovic, M. Ehrmann and R.F. Vogel. „Comparative proteome approach to characterize the high pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T”. *Proteomics* 2006; 6(6):1878-85.
- Hörmann S., R.F. Vogel and M. Ehrmann. “Construction of a new reporter system to study the NaCl dependent *dnaK*-promoter activity of *Lactobacillus sanfranciscensis*”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 70(6):690-697.
- Vogel R.F., M. Pavlovic, S. Hörmann and M. Ehrmann. „High pressure sensitive gene expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*“. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005; 38:1247-1252
- Pavlovic M., S. Hörmann, M. Ehrmann, and R.F.Vogel. „Transcriptome analysis of pressure sensitive genes in *Lactobacillus sanfranciscensis*”. *Arch. Microbiol.* 2005; 184(1):11-7.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Alternative Konservierungsmethoden	1
1.2 Hochdruckpasteurisierung	1
1.3 Mikroorganismen und Hochdruck	6
1.3.1 Piezophile Mikroorganismen und Hochdruck.....	6
1.3.2 Mesophile Mikroorganismen und Hochdruck.....	10
1.3.3 Letale Wirkung von Hochdruck auf Mikroorganismen	12
1.3.4 Resistenz, Adaptation und Stressantwort	14
1.5 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	22
2.1.2 Medien und Medienzusätze.....	22
2.1.3 Bakterienstämme	24
2.1.4 Plasmide	25
2.1.5 Oligonukleotide.....	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Physiologische Methoden	28
2.2.1.1 Kultivierung	28
2.2.1.2 Stammhaltung.....	29
2.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte und Wachstumsrate	29
2.2.1.4 Letale und subletale Stressbehandlung	29
2.2.1.5 Messung von Adaptation und Kreuzresistenz.....	32
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.2.1 Herstellung von Proteinrohextrakten	32
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.2.2.2.1 Coomassie Blue Protein Assay (Bradford, 1976)	33
2.2.2.2.2 Photometrische Bestimmung.....	33
2.2.2.2.3 Bestimmung mittels SDS-PAGE	34
2.2.2.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.2.3.1 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension).....	36
2.2.2.3.2 Äquilibrierung	37
2.2.2.4 Färbung und Analyse von Polyacrylamidgelen	39
2.2.2.4.1 Silberfärbung (Blum <i>et al.</i> , 1987 modifiziert).....	39
2.2.2.4.2 Färbung mit Roti-Blue [®]	40
2.2.2.4.3 Färbung mit Coomassie-Blau.....	40
2.2.2.5 Proteinsequenzierung	41
2.2.2.6 Nachweis von α -Galactosidase	42
2.2.2.7 Überexpression rekombinanter Proteine	42
2.2.2.8 Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	43
2.2.2.9 Nachweis bestimmter Enzymaktivitäten.....	44
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	46
2.2.3.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Milchsäurebakterien.....	46
2.2.3.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien	47
2.2.3.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus Bakterien.....	47
2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung und Analyse von DNA und RNA Lösungen.....	47

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	48
2.2.3.6 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA.....	49
2.2.3.7 DNA-Modifikationen.....	49
2.2.3.8 Transformation von Bakterien.....	50
2.2.3.8.1 Herstellen kompetenter Zellen.....	50
2.2.3.8.2 Elektroporation.....	50
2.2.3.8.3 Transformation mit Hitzeschock.....	51
2.2.3.9 Sequenzierung von DNA.....	51
2.2.3.10 Amplifikation von DNA mittels PCR.....	51
2.2.3.10.1 Standardmethode.....	51
2.2.3.10.2 Inverse PCR.....	52
2.2.3.10.3 TA-Klonierung.....	53
2.2.3.10.4 Kolonie-PCR.....	53
2.2.3.11 Reverse Transkription.....	53
2.2.3.12 RealTime-PCR.....	54
2.2.3.13 Nukleinsäuretransfer und Hybridisierungsversuche.....	55
2.2.3.13.1 Southern-Blot.....	55
2.2.3.13.2 Northern-Blot.....	55
2.2.3.13.3 RNA-Dot-Blot.....	56
2.2.3.13.4 DIG markierte DNA-Sonden.....	57
2.2.3.13.5 Immunologischer Nachweis.....	57
3 Ergebnisse.....	60
3.1 Bestimmung der Stressparameter.....	60
3.2 Adaptation und Kreuzresistenz.....	61
3.3 Charakterisierung der Stressantwort auf Proteomebene.....	64
3.4 Proteinidentifizierung.....	69
3.5 Identifizierung und Charakterisierung ausgewählter Gene und Proteine.....	72
3.5.1 Ribokinase / Ribose-5P-Isomerase (P1).....	73
3.5.2 ATP-abhängige ClpL Protease (P2).....	82
3.5.3 DnaK (P8).....	84
3.5.4 GroEL (P9).....	84
3.5.5 ClpX (P6).....	86
3.5.6 CtsR-ClpC.....	87
3.6 Promotoraktivitäten unter Hochdruckstress.....	90
3.6.1 Konstruktion und Etablierung eines Reportergensystems.....	91
3.6.2 Etablierung der RealTime PCR für <i>L. sanfranciscensis</i>	100
3.6.3 Charakterisierung ausgewählter Promotorsequenzen.....	102
3.6.3.1 <i>rbsK/rpi</i> (<i>p1</i>) Promotor.....	102
3.6.3.2 <i>mdh</i> Promotor.....	106
3.6.3.3 <i>clpL</i> Promotor.....	107
3.6.3.4 <i>clpX</i> Promotor.....	108
3.6.3.5 <i>ctsR</i> Promotor.....	109
3.6.3.6 <i>dnaK</i> Promotor.....	111
3.6.3.7 <i>groESL</i> Promotor.....	113
3.6.3.8 <i>cps1D</i> Promotor.....	115
3.6.3.9 <i>xpk</i> Promotor.....	116
3.6.3.10 <i>fusA</i> Promotor.....	117
4 Diskussion.....	119
4.1 Bestimmung der Stressparameter.....	119

4.2 Adaptation und Kreuzresistenz	120
4.3 Charakterisierung der Stressantwort auf Proteomebene.....	122
4.4 Proteinidentifizierung	124
4.5 Charakterisierung ausgewählter Gene und Proteine	125
4.5.1 Ribokinase / Ribose-5P-Isomerase (P1).....	125
4.5.2 ClpL (P2).....	132
4.5.3 DnaK (P8)	140
4.5.4 GroEL (P9).....	143
4.5.5 ClpX (P6)	146
4.5.6 Thioredoxin Reduktase (P4).....	151
4.5.7 Trehalose/Maltose Hydrolase (P5).....	152
4.5.8 Unbekannte Funktion (P3)	153
4.5.9 hypothetisches Protein (P7).....	153
4.5.10 CtsR und ClpC	153
4.6 Analyse von Promotoraktivitäten unter Hochdruckstress.....	159
4.6.1 Konstruktion und Etablierung eines Reportergensystems	160
4.6.2 Etablierung der RealTime PCR für <i>L. sanfranciscensis</i>	163
4.6.3 Charakterisierung ausgewählter Promotorsequenzen	165
4.6.3.1 <i>rbsK</i> / <i>rpi</i> Promotor	168
4.6.3.2 <i>mdh</i> Promotor	170
4.6.3.3 <i>clpL</i> Promotor.....	171
4.6.3.4 <i>clpX</i> Promotor	172
4.6.3.5 <i>ctsR-clpC</i> Promotor	173
4.6.3.6 <i>dnaK</i> Promotor	174
4.6.3.7 <i>groESL</i> Promotor.....	176
4.6.3.8 <i>cps1D</i> Promotor.....	177
4.6.3.9 <i>xpk</i> Promotor	179
4.6.3.10 <i>fusA</i> Promotor.....	180
5 Zusammenfassung	182
6 Referenzen.....	184

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BLAST	Biological Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CIRCE	Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidintri-phosphat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
dUTP	Desoxyuridintri-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GTP	Guanosintri-phosphat
HHP	hoher hydrostatischer Druck
H ₂ O _{deion/bidest}	deionisiertes Wasser, zweimal destilliertes Wasser
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IR	inverted repeat
kb	Kilobasenpaar
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kVh	Kilovoltstunden
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
N	beliebiges Nukleotid innerhalb einer Sequenz
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
RBS	Ribosomenbindestelle
RNase	Ribonuklease
RNS / RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SAP	alkalische Phosphatase aus Garnelen (Shrimps)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Standard Saline Citrat (Natriumcitrat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse/Volumen
X	beliebige Aminosäure innerhalb einer Sequenz
X- α/β -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-D- α/β -galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Alternative Konservierungsmethoden

Aufgrund des gestiegenen Gesundheitsbewusstseins in den Industrienationen der so genannten ersten Welt wächst der Bedarf an qualitativ hochwertigen und nutritiv wertvollen Nahrungsmitteln seit einigen Jahren kontinuierlich an. Anzeichen dafür sind die ständig wachsende Nachfrage nach biologisch erzeugten Lebensmitteln, der gestiegene Bedarf an Ernährungsberatung oder der erhöhte Konsum von Lebensmitteln mit gesundheitlichem Zusatznutzen (functional food). Da der Kunde dabei zu keiner Zeit auf die gewohnte Vielfalt und ständige Verfügbarkeit der verschiedensten, möglichst frischen Nahrungsmittel verzichten will, ist eine optimale Konservierung, bei der neben der Haltbarkeit vor allem die Qualität im Vordergrund steht, unverzichtbar. Dabei sollen die Produkte und deren Inhaltsstoffe möglichst schonend und ohne die Zugabe von Konservierungsstoffen haltbar gemacht werden. Die Lebensmittelindustrie ist daher bestrebt, schonendere Alternativen zu den heute meist verwendeten thermischen Verfahren für die Lebensmittelkonservierung zu entwickeln. Neben der Behandlung mit hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung wird auch der Einsatz starker Lichtimpulse, konduktiver Erwärmung, ionisierender Bestrahlung oder von UV-Bestrahlung und Ultraschallbehandlung diskutiert (Ulmer *et al.* 2002a, Port *et al.* 2003, Ross *et al.* 2003, Kim *et al.* 2004, Gomez-Lopez *et al.* 2005). Die momentan vielversprechendste alternative Methode zur thermischen Konservierung von Lebensmitteln scheint die Behandlung mit hohem hydrostatischem Druck (HHD) zu sein (Farr 1990, Cheftel 1995, Knorr 1993, 1996, 1999, Smelt 1998, San Martin *et al.* 2002, Senorans *et al.* 2003, Ross *et al.* 2003).

1.2 Hochdruckpasteurisierung

Einsatzgebiete der Hochdrucktechnologie

Neben der grundlagenorientierten Hochdruckforschung vor allem in den Fächern Physik und Chemie interessieren sich seit einigen Jahren immer mehr Biologen, Biotechnologen, Biochemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Lebensmitteltechnologe für eine gezielte Anwendung der Hochdrucktechnologie in ihren jeweiligen Bereichen (Silva *et al.* 1996, Abe und Horikoshi 2001, Masson *et al.* 2001). HHD wird dabei nicht nur zur gerichteten Veränderung und Denaturierung von Proteinen und Protein-Polysaccharid Gemischen zu homogenen Emulsionen (Masson und Clery 1996), zur chemischen Modifikation von Makromolekülen und zur Optimierung gewünschter Enzym-katalysierter Reaktionen unter

Hochdruck verwendet (Kunugi 1992, Butz und Tauscher 2000), sondern auch für die Entwicklung neuer Impfstoffe (Perche *et al.* 1997, Chen *et al.* 2001, Silva *et al.* 2001), für die HHD induzierte Genexpression bzw. Metabolitproduktion (Allen und Bartlett 2002, Martin *et al.* 2002) und für die Inaktivierung biologischen Materials (Jurkiewicz *et al.* 1995) mittels Hochdruckpasteurisierung eingesetzt.

Vor- und Nachteile der Hochdruckpasteurisierung

Während die meisten Vitamine, natürlichen Farb- und Aromastoffe sowie andere wertvolle Inhaltsstoffe wie z.B. pharmakologisch aktive Moleküle nach einer Hochdruckbehandlung weitgehend erhalten bleiben, können unerwünschte Enzyme und Mikroorganismen inaktiviert werden (Ogawa 1990, Parish 1997, Tonello 1997, Hendrickx *et al.* 1998, Smelt 1998; Knorr, 1999; Sancho *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 2001, Harte *et al.* 2002, Krebbers *et al.* 2002, Senorans *et al.*, 2003). Im Vergleich zum thermischen Verfahren wird durch die Hochdruckpasteurisierung die natürliche Qualität der konservierten Lebensmittel deutlich gesteigert. Da für eine effiziente Hochdruckbehandlung nur ein Bruchteil der Energie benötigt wird, die für ein vergleichbares thermisches Verfahren eingesetzt werden müsste, und Energie in Form von Druck sehr einfach für einen nachfolgenden Prozess „recycelt“ werden kann, ist der Gesamtenergiebedarf weitaus geringer als beim thermischen Verfahren, bei dem die komplette Energie in Form von Wärme beim Abkühlprozess der Lebensmittel verloren geht. Aufgrund des relativ geringen Energieverbrauchs stellt die Hochdruckpasteurisierung daher ein sehr sparsames und umweltschonendes Verfahren dar. Aufgrund der von Größe und Beschaffenheit unabhängigen, gleichmäßigen Druckverteilung im gesamten Sterilisiergut (isostatisches Prinzip) sind die Sterilisationszeiten im Vergleich zum thermischen Verfahren, bei welchem das Erreichen der erforderlichen Kerntemperatur und das anschließende Abkühlen abgewartet werden muss, mit 3 bis 5 Minuten sehr niedrig. Diesen Energie und Zeit sparenden Vorteilen stehen allerdings die sehr hohen Investitionskosten für eine industriell nutzbare Hochdruckanlage gegenüber.

Ein weiterer Nachteil der Hochdruckpasteurisierung ist die beschränkte Anwendung. So sind für dieses Verfahren nur komprimierbare, Wasser enthaltende Lebensmittel ohne Lufteinschlüsse geeignet. Vor allem frische und vitaminhaltige Fruchtzubereitungen wie Gelees, Marmeladen, Mus oder Säfte kommen somit für eine Hochdruckpasteurisierung in Frage. Bei diesen Lebensmitteln werden die Vorteile einer Hochdruckbehandlung gegenüber dem thermischen Verfahren besonders deutlich. Aber auch andere Nahrungsmittel wie verschiedene Getränke, Milch und Milchprodukte, Guacamole, Austern oder Schinken, sowie

kosmetische und pharmazeutische Produkte wie Salben und Cremes können mittels Hochdruck schonend konserviert werden und sind zum Teil bereits auch im Handel erhältlich.

Hochdruckpasteurisierung aus Behördensicht

Das Center for Food Safety and Applied Nutrition der U.S. Food and Drug Administration (FDA) hat im Juni 2000 in der Publikation „Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies – High Pressure Processing“ eine Zusammenfassung zur Geschichte, Theorie und Technologie, zum benötigten Equipment und den verschiedenen, möglichen Verfahren für die Hochdruckpasteurisierung von Lebensmitteln veröffentlicht (<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>). Im Mittelpunkt steht dabei die effektive und sichere Abtötung verschiedener Mikroorganismen durch eine Hochdruckbehandlung. Darüber hinaus wird aber auch auf noch offene Fragen z. B. zur Resistenzbildung, zum genauen Abtötungsmechanismus oder synergistische Effekte mit anderen Umweltparametern hingewiesen. In diesem Zusammenhang hat auch die Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zur Bewertung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) eine Stellungnahme zur Sicherheitsbewertung der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln abgegeben (direkter Link online unter: http://www.dfg.de/aktuelles_presse/reden_stellungnahmen/2004/download/sklm_hochdruck_2004.pdf).

Industrielle Anwendung der Hochdruckpasteurisierung

Seit 1990 kommt die Hochdruckpasteurisierung von Lebensmitteln vor allem in Japan und den USA, seit 1995 auch in Europa mit steigendem Interesse zur Anwendung. Auch in Deutschland gibt es seit Anfang dieses Jahres ein Unternehmen, welches rohen Schinken mit Hilfe von Hochdruck konserviert und nach USA exportiert. Derzeit gibt es auf dem Europäischen Markt aber noch keine nach der Novel Food Verordnung zugelassenen, hochdruckbehandelten Lebensmittel. Die ursprüngliche Idee der Hochdruckpasteurisierung ist aber schon weit älter und wurde bereits vor über 100 Jahren zum ersten Mal anhand der durch Hochdruck erreichten Keimzahlreduzierung in Milch wissenschaftlich untersucht und beschrieben (Hite 1899, Hite *et al.* 1914). Dass sich die Hochdruckpasteurisierung damals nicht durchsetzen konnte lag an den technischen Schwierigkeiten bei der Konstruktion und dem Bau geeigneter Autoklaven für eine wirtschaftliche und industriell interessante Anwendung. Auch heute ist der Investitionsaufwand für die Inbetriebnahme einer industriellen Hochdruckanlage im Vergleich zu herkömmlichen thermischen Anlagen relativ hoch. Bis sich die großtechnische Hochdruckkonservierung am Markt etabliert, werden mittels HHD konservierte Lebensmittel aufgrund der hohen Investitionskosten immer etwas teurer als

herkömmlich konservierte Nahrungsmittel sein. In USA wird auf diesen Produkten daher mit dem Slogan „Fresher under Pressure“ geworben, um die Kundschaft zum Kauf der qualitativ höherwertigen Ware zu animieren.

Sicherheit der Hochdruckpasteurisierung

Die entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer neuen Konservierungsmethode spielt letztendlich aber immer die Sicherheit für den Verbraucher. Trotz der vorgeschriebenen Hygienestandards sind nach Schätzungen von Epidemiologen in der EU ca. 75% aller Lebensmittelvergiftungen auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen (CAC 2003). Daher spielt bei der Etablierung der Hochdruckpasteurisierung als Verfahren zur Lebensmittelkonservierung die Erforschung des Einflusses und der Wirkung von Hochdruck auf Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Solange nicht bekannt ist, ob und wie pathogene Mikroorganismen eine Hochdruckbehandlung überleben bzw. sie sich an diese adaptieren können, besteht die Gefahr, dass resistente Stämme in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben angereichert und auf Lebensmittel übertragen werden. Gerade für so schonende Verfahren wie der Hochdruckpasteurisierung ist es unerlässlich, eine effektive und verlässliche Abtötung bzw. Inaktivierung lebensmittelvergiftender oder -verderbender Mikroorganismen und deren Ruhestadien sowie die Vermeidung des Auftretens resistenter Stämme zu gewährleisten. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anwendung von HHD zur wirksamen Abtötung und Inaktivierung lebensmittelrelevanter vegetativer Keime und auch zahlreicher Viren geeignet ist (Patterson *et al.* 1995, Benito *et al.* 1999, Gervilla *et al.* 2000, O'Reilly *et al.* 2000, McClements *et al.* 2001, Kingsley *et al.* 2004, Calci *et al.* 2005, Fioretto *et al.* 2005, Patterson 2005). Auch wenn die Inaktivierung von Bakterien, Pilzen, Hefen und Viren bei Drücken zwischen 200 und 800 MPa möglich ist, variiert die Resistenz gegenüber einer Hochdruckbehandlung zwischen den verschiedenen Spezies, Arten und sogar zwischen verschiedenen Stämmen einer Art sehr stark (Cheftel 1995, Knorr 1996). Darüber hinaus spielt das Wachstumsstadium der jeweiligen Kultur, Umwelteinflüsse wie Temperatur oder pH-Wert, die Dauer der Druckbehandlung (Haltezeit) und das umgebende Medium eine entscheidende Rolle (Cheftel 1995, Gervilla *et al.* 1997, Kalchayanand *et al.* 1998, Lanza *et al.* 2004). Im Gegensatz zu Pilzsporen erweisen sich die Endosporen von Bazillen und Clostridien auch gegenüber sehr hohen Drücken von über 1000 MPa als besonders resistent und können auch bei längeren Druck-Haltezeiten nicht immer komplett inaktiviert werden („tailing“) (Sale *et al.* 1970, Mills *et al.* 1998, San Martin *et al.* 2002, Margosch *et al.* 2004a, 2004b). Aus diesem Grund ist die Hochdruckpasteurisierung

hauptsächlich für Produkte mit hohem Säureanteil wie die bereits erwähnten Fruchtzubereitungen, Fruchtsäfte und einige Milchprodukte gut geeignet, da durch den niedrigen pH-Wert die Auskeimung bakterieller Endosporen unterdrückt wird. Für weniger saure Lebensmittel wie Gemüse, Fleisch oder Milch ist die Hochdruckbehandlung für eine sichere Konservierung zwar nicht optimal geeignet, sie kann aber die Haltbarkeit und Frische solcher Produkte bei entsprechender Kühlung signifikant verlängern und trägt dazu bei das Risiko einer Kontamination mit pathogenen Organismen wie *E. coli*, Salmonellen oder Listerien zu minimieren.

Hochdruck als Bestandteil eines Hürdenkonzepts

Unumstritten stellt die Hochdruckbehandlung ein interessantes Werkzeug in dem von Lothar Leistner (1978) entwickelten Hürdenkonzept („hurdle technology“) dar. Das Prinzip des Hürdenkonzepts beruht dabei auf der gezielten Kombination mehrerer schonender Verfahren, die verschiedene Mechanismen zur Abtötung von Mikroorganismen nutzen („multitarget preservation“). Dieses Konzept hat sich in ähnlicher Weise auch in der Medizin z.B. bei der Bekämpfung von Tuberkulose als so genanntes „multidrug attack“ bewährt (Leistner 2000, Leistner und Gould 2002). In beiden Fällen wird durch den gleichzeitigen Angriff auf verschiedene zelluläre Ziele wie z.B. Transkription, Translation oder die Membranintegrität eine synergistische Wirkung bei der Bekämpfung von Mikroorganismen erreicht und eine Resistenzentwicklung erheblich erschwert. Schonende Behandlungsmethoden, die für sich alleine keine oder nur eine geringe Inaktivierung der im Lebensmittel vorhandenen Mikroorganismen bewirken, können so in Kombination mit anderen schonenden Verfahren eine effiziente Inaktivierung sicherstellen. Empirische Untersuchungen zeigen, dass eine Hochdruckbehandlung besonders in Kombination mit einer Ansäuerung, mit der Zugabe antimikrobieller Substanzen oder mit thermischen Verfahren wie Kühlung unter den Gefrierpunkt oder einer mäßigen Wärmezufuhr unter Ausnutzung der adiabatischen Erwärmung wirksam ist (Hayakawa *et al.* 1998, Alpas *et al.* 2000, Morgan *et al.* 2000, Garcia-Graells *et al.* 2003, Ross *et al.* 2003, Perrier-Cornet *et al.* 2005, Diels *et al.* 2005, Rodriguez *et al.* 2005). Auch die Abtötung resistenter Endosporen ist durch eine gleichzeitige Behandlung mit Hochdruck und einem weiteren schonenden Konservierungsverfahren möglich (Wuytack und Michiels 2001, Lopez-Pedemonte *et al.* 2003, Clery-Barraud *et al.* 2004, Van Opstal *et al.* 2004, Margosch *et al.* 2004a / 2004b).

Um die Hochdruckkonservierung im Rahmen eines Hürdenkonzeptes möglichst effektiv anwenden und mit anderen Verfahren sinnvoll kombinieren zu können, ist es unabdingbar die

Wirkung von Hochdruck auf Mikroorganismen zu kennen. Nur mit diesem Wissen ist es möglich die Angriffspunkte und Abtötungsmechanismen von Hochdruck zu verstehen bzw. Wechselwirkungen mit Medienbestandteilen und anderen Verfahren, welche zu Adaptation und Kreuzresistenzen führen können, zu vermeiden. Dann erst kann durch intelligente Kombination von Hochdruck und weiteren geeigneten Methoden ein schonender und gleichzeitig sicherer Konservierungsprozess etabliert werden.

1.3 Mikroorganismen und Hochdruck

1.3.1 Piezophile Mikroorganismen und Hochdruck

Es wird vermutet, dass die zahlenmäßige Mehrheit aller Mikroorganismen Habitate besiedelt, die unter hohem Druck stehen (Whitman *et al.* 1998). Verschiedenste Bakterien konnten aus dem Erdinneren, aus tiefen Seen und vom Meeresgrund isoliert werden (Karl *et al.* 1999, Szewzyk *et al.* 1994). Bei der Besiedlung von Lebensräumen spielt der Umgebungsdruck als thermodynamische Größe eine entscheidende Rolle. In der Biosphäre variiert der Druck zwischen ca. 0.1 MPa (1 bar) auf Höhe des Meeresspiegels und über 100 MPa (1000 bar) in den größten Tiefen der Ozeane. Da über 70% der Erdoberfläche mit Wasser bedeckt sind und die durchschnittliche Tiefe bei 3800 Meter liegt, steht ein Grossteil der Erdoberfläche daher ständig unter hohem hydrostatischem Druck (Abe *et al.* 1999).

Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Tiefseemikrobiologie

Die Erforschung dieser Lebensräume ist extrem schwierig und kostenintensiv und wird daher erst seit wenigen Jahren betrieben. Besonders zu erwähnen sind dabei Chiaki Kato vom „Japan Marine Science and Technology Center“ (JAMSTEC) in Japan und Douglas Bartlett vom „Center for Marine Biotechnology and Biomedicine“ des „Scripps Institution of Oceanography“ in den USA, die Pionierarbeiten bei der Erforschung der mikrobiellen Vielfalt in der Tiefsee geleistet haben (Bartlett 1992, Kato 1995). Auch wenn bereits 1949 zum ersten Mal der Begriff „barophil“ (heute: „piezophil“) erwähnt wurde (ZoBell und Johnson 1949) und 1957 die ersten Hinweise auf piezophile Mikroorganismen aus Tiefseesedimenten gefunden wurden (ZoBell and Morita 1957), gelang es erst 1979 eine piezophile Reinkultur zu isolieren (Yayanos *et al.* 1979). Seit dieser Zeit wird über die entscheidenden Eigenschaften diskutiert, die einen Mikroorganismus piezophil (optimales Wachstum unter HHD), piezotolerant (Überleben bzw. suboptimales Wachstum unter HHD) oder piezosensitiv (Absterben unter HHD) machen (Abbildung 1.1; Abe und Horikoshi 2001).

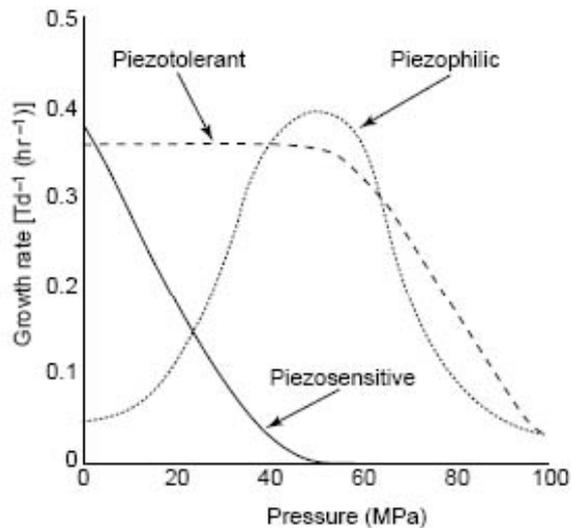


Abbildung 1.1 Einteilung von Lebewesen in Abhängigkeit ihrer Wachstumsrate bei verschiedenen hohen Umgebungsdrücken (aus Abe und Horikoshi, 2001).

Wirkung von Hochdruck auf die Zellmembran

Da Hochdruck in Abhängigkeit seiner Höhe verschiedene Effekte auf Mikroorganismen besitzt, haben piezophile Organismen Mechanismen entwickelt, um sich an diese Umweltbedingungen zu adaptieren. Neben den Auswirkungen auf Transkriptions- und Translationsprozesse, Enzymaktivitäten und auf spontane chemische Reaktionen ist die Fähigkeit eine funktionsfähige Zellmembran aufrechtzuerhalten ein sicherlich entscheidendes Kriterium für die Anpassung an verschiedene Druckverhältnisse (Somero 1992, Bartlett und Bidle 1999). Da Druck ebenso wie Kälte die Fluidität der bakteriellen Zellmembran reduziert, besitzen piezophile Bakterien die Fähigkeit das Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren in ihrer Membran zu erhöhen und so die Membranfunktionalität auch unter Druck aufrecht zu erhalten (DeLong und Yayanos 1985, Kamimura *et al.* 1993, Wirsen *et al.* 1987, Allen *et al.* 1999, Kato und Hayashi 1999, Bartlett 2002, Balny *et al.* 2002). Untersuchungen an *Photobacterium profundum* SS9 haben gezeigt, dass mit zunehmendem Druck sowohl einfach, als auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren in die Zellmembran eingelagert werden (Bartlett 2002, Allen *et al.* 1999, DeLong und Yayanos 1985 und 1986). Vor allem die unerwartet hohen Konzentrationen an Omega-3-Fettsäuren in verschiedenen psychrophilen und piezophilen Tiefseebakterien könnten aus ernährungsphysiologischer Sicht interessant sein (Yano *et al.* 1997). Wie Versuche mit mutierten Stämmen von *P. profundum* SS9 gezeigt haben, besitzen im Gegensatz zu einfach ungesättigten Fettsäuren, mehrfach ungesättigte Fettsäuren aber keine Auswirkung auf die Kälte- und Druckresistenz der Bakterien (Allen *et al.* 1999). Noch ist unklar, weshalb die Bildung einfach ungesättigter Fettsäuren für eine Hochdruckadaptation essentiell ist (Allen und Bartlett 2000) und warum die Konzentration

mehrfach ungesättigter Fettsäuren ebenfalls erhöht ist, obwohl diese unter Druck anscheinend keinen Einfluss auf die Adaptation haben (MacDonald und Cossins 1985, Van de Vossenberg *et al.* 1995, Bartlett 2002).

Wirkung von Hochdruck auf die Biosynthese von Membranproteinen

Neben der Zusammensetzung der Membran konnten auch einige Membranproteine und deren Gene identifiziert werden, deren Expression bzw. Proteinbiosynthese durch HHD beeinflusst wird. Besonders zu erwähnen ist die bei *P. profundum* SS9 konträre, Druck abhängige Synthese der Membranproteine OmpH (unter Druck erhöht) bzw. OmpL (unter Druck erniedrigt), welche verschieden große Porine bilden (Bartlett *et al.* 1989, Welch und Bartlett 1996). Die Expression von *ompH* und *ompL* wird über zwei weitere Membranproteine ToxR und ToxS reguliert (Welch und Bartlett 1998). ToxR und ToxS wurden zum ersten Mal in *Vibrio cholera* beschrieben, wo sie in Abhängigkeit der Osmolarität, der Temperatur, des pH-Wertes bzw. der Konzentration bestimmter extrazellulärer Aminosäuren die Expression von Virulenzgenen und anderen Genen regulieren (Skorupski und Taylor 1997). Während ToxS die Aktivität von ToxR beeinflusst, bindet ToxR als Oligomer mit seiner zytoplasmatischen Domäne direkt an die Operatoren bestimmter Gene und aktiviert bzw. reprimiert deren Transkription. Für das ToxR/ToxS System von *P. profundum* SS9 wird die Funktion als Drucksensor (Piezometer) diskutiert, der den physikalischen Zustand der inneren Membran bestimmt (Abe *et al.* 1999, Bartlett 1991, Bartlett 2002). Durch den Einsatz lokaler Anästhetika ist es möglich die Membranfluidität unter Hochdruck so weit zu erhöhen, dass die vom ToxR/ToxS System abhängige Synthese der Porin-Proteine OmpH und OmpL identisch mit der unter atmosphärischen Druck ist (Welch und Bartlett 1998). Zusätzlich zu OmpH und OmpL können alle bisher identifizierten Genprodukte, die unter der Kontrolle von ToxR stehen in zwei Kategorien eingeordnet werden. Entweder sind sie an der Veränderung der Membranstruktur oder an der Stressantwort während der stationären Phase beteiligt. Letzteres ist sicher auch in der nährstoffarmen Tiefsee von Bedeutung. Es wird vermutet, dass die meisten dieser Gene auch noch durch weitere Faktoren reguliert werden (Bartlett 2002). So konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ompH* unter Hochdruck nicht nur von ToxR, sondern auch vom alternativen σ -Faktor RpoE reguliert wird (Chi und Bartlett 1995).

Wirkung von Hochdruck auf Proteine der Atmungskette

In Tiefseebakterien wie *Shewanella benthica* und *Shewanella violacea* konnte ebenfalls eine veränderte Synthese von Membranproteinen unter erhöhten Druckbedingungen festgestellt werden (Tamegai 2005, Qureshi *et al.* 1998a und 1998b). So wurde ein unter

HHD induziertes Gen, welches hohe Homologie zu *cydD* aus *E. coli* besitzt, identifiziert. CydD wird für die Zusammenlagerung des Cytochrom *bd* Komplexes in der Membran benötigt. *E. coli* Zellen mit defekten *cydD* besitzen eine erhöhte Sensitivität gegenüber HHD. Durch Einfügen von *cydD* aus *Shewanella sp.* DSS12 kann dieser Defekt aber komplementiert werden. Der Cytochrom *bd* Proteinkomplex ist bei *Shewanella sp.* DSS12 nur in Zellen, die unter Druck gewachsen sind, nachweisbar (Tamegai *et al.* 1998). Die Tatsache, dass die Bildung von Cytochromen druckabhängig ist, veranlassten Tamegai *et al.* (2005) die Regulation der Biosynthese von Cytochrom *bd* in diesem Stamm genauer zu untersuchen. Auch die Zusammensetzung anderer Cytochrome verschiedener *Shewanella* Stämme wurde in Abhängigkeit des Drucks genauer analysiert. *Shewanella benthica* DB172F besitzt zwei Typen von Cytochrom C, wovon eines im Zytoplasma und eines in der Membran lokalisiert ist (Qureshi *et al.* 1998b). Dabei wird der in der Membran gebundene Typ nur unter HHD gebildet. Außerdem wurde eine *ccb* Quinoloxidase identifiziert, deren Synthese unter Druck stark induziert wird (Qureshi *et al.* 1998a). Die gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass piezophile Bakterien auf eine Druckerhöhung mit einer signifikanten Änderung des Aufbaus ihrer Atmungskette reagieren und somit die bioenergetischen Eigenschaften ihrer Zellmembran beeinflussen können (Bartlett 2002).

Diversität der Tiefseeflora

Erstaunlich ist die Vielfalt der mikrobiologischen Flora, die aus bis zu 11000 Metern Tiefe isoliert werden konnte. Die meisten der bisher identifizierten piezophilen Bakterien, die hauptsächlich zur γ -Untergruppe der Proteobakterien zählen, wachsen nur bis zu einer Temperatur von maximal 20°C und werden daher auch gleichzeitig zu den Psychrophilen gezählt (Kato und Bartlett 1997a, Bartlett 2002). Daneben existieren aber auch halophile, alkaliphile und thermophile Vertreter unter den zum Teil obligat piezophilen Mikroorganismen (Yayanos 1995, Takami 1997, Kato *et al.* 1998, Abe *et al.* 1999). Die bisher identifizierten piezophilen Archaeen sind dagegen alle auch hyperthermophil mit einem Temperaturoptimum von über 60°C und wurden ausschließlich in der Nähe von hydrothermalen Tiefseequellen isoliert (Bartlett 2002). Takami *et al.* (1997) identifizierten mittels 16S rDNA Sequenzierung zahlreiche Isolate aus dem Mariannengraben in 10.897 Metern Tiefe. Neben verschiedenen extremophilen Bakterien fanden sie dabei auch eine Vielzahl nicht-piezophiler bzw. piezotoleranter Mikroorganismen der verschiedensten Taxa. Es konnte gezeigt werden, dass viele Mikroorganismen, die an Druckverhältnisse von 0,1 MPa angepasst sind, piezotolerante Eigenschaften besitzen und auch unter den hohen

Druckverhältnissen der Tiefsee in einer Art Ruhestadium überleben können. Um die Diversität der mikrobiellen Tiefseeflora erklären zu können, sollten daher neben den Adaptationsmechanismen der piezophilen Arten zusätzlich auch die Überlebensstrategien nicht-piezophiler Organismen untersucht werden (Kato *et al.* 1997, Abe *et al.* 1999, Bartlett 1999). Während sich Tiefseemikrobiologen weiterhin mit den speziellen Eigenschaften piezophiler Bakterien beschäftigen, mit modernsten, molekularbiologischen Methoden Genom, Proteom und Metabolom erforschen (Kato und Horikoshi 1996, Kato und Qureshi 1999, Abe *et al.* 1999, Nakasone *et al.* 1998, 2002, Tamegai *et al.* 2005, Campanaro *et al.* 2005) und so vor kurzem das erste komplette Genom eines piezophilen Bakteriums entschlüsselten (Vezi *et al.* 2005), interessieren sich Lebensmittelmikrobiologen vor allem für Untersuchungen über die Auswirkungen von Hochdruck auf lebensmittelrelevante, mesophile Mikroorganismen.

1.3.2 Mesophile Mikroorganismen und Hochdruck

Das Wachstum nicht-piezophiler Mikroorganismen ist zwischen Drücken von 20 und 130 MPa reduziert. Höhere Drücke zwischen 130 und 800 MPa führen in der Regel zum Zelltod (Abee und Wouters 1999). Wie bereits erwähnt variiert die Toleranz gegenüber einer Hochdruckbehandlung sehr stark und hängt von Art und Stamm (Alpa *et al.* 1999, Benito *et al.* 1999, Pagan und Mackey 2000), aber auch von der momentanen Wachstumsphase und den jeweiligen Umwelteinflüssen wie Temperatur, pH-Wert oder Medienbestandteile ab (Cheftel 1995, Abee und Wouters 1999, Pagan und Mackey 2000, ZoBell 1970). Im Allgemeinen sind Hefen und Pilze sensitiver gegenüber HHD als Bakterien, wobei Gram positive Bakterien in der Regel resistenter als Gram negative Bakterien sind. Ähnlich wie bei vielen anderen letalen Umwelteinflüssen reagieren Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase deutlich empfindlicher auf HHD als in der stationären Phase (Pagan und Mackey 2000).

Wirkung von Hochdruck auf die Zellmembran

Man kann davon ausgehen, dass die meisten Prozesse, die in einer Zelle ablaufen, durch eine Druckveränderung beeinflusst werden (Bartlett 2002). Auch wenn bei nicht-piezophilen Mikroorganismen bisher noch keine druckabhängige Regulation der Membranfluidität festgestellt werden konnte, scheint sie wie auch bei piezophilen Organismen hinsichtlich der Druckresistenz eine Rolle zu spielen. Casadei *et al.* (2002) konnten zeigen, dass bei 10°C gewachsene *E. coli* Zellen einen höheren Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran besitzen als Zellen, die bei 37°C angezogen wurden. In der exponentiellen Phase sind diese

Zellen vermutlich aufgrund der höheren, durch Kälte induzierten Membranfluidität gegenüber einer Druckbehandlung resistenter als die entsprechenden Kontrollzellen (Casadei *et al.* 2002). Da in der stationären Phase dieser Effekt trotz derselben Fettsäurezusammensetzung nicht beobachtet werden konnte, muss aber davon ausgegangen werden, dass eine durch Kälte induzierte Stressantwort für die erhöhte Hochdruckresistenz mitverantwortlich sein könnte. Eine solche Stressantwort ist von den Autoren aber nicht berücksichtigt worden.

Enzymatische Reaktionen und morphologische Veränderungen unter Hochdruck

Neben der bereits erwähnten Membranfluidität spielen während einer Druckbehandlung auch enzymatische Reaktionen eine wichtige Rolle. So werden z.B. Stoffwechselaktivitäten wie der Maltose Metabolismus von *L. sanfranciscensis* bei subletaler Erhöhung des Drucks inhibiert (Korakli *et al.* 2002). Auch die F_1F_0 -ATPase aus *E. coli* und *L. plantarum* bzw. die H^+ -ATPase aus *S. cerevisiae* wird unter HHD inhibiert (Marquis und Bender 1987, Abe und Horikoshi 1998, Wouters *et al.* 1998, Molina-Gutierrez *et al.* 2002). Darüber hinaus wurden auch morphologische Veränderungen von Zellen in Abhängigkeit des Drucks beobachtet. Sowohl bei *E. coli* (ZoBell und Cobet 1962 und 1963, ZoBell 1970, Aertsen *et al.* 2005), als auch bei *L. lactis* (Molina-Hoppner *et al.* 2003) ist unter Hochdruck die Bildung von Filamenten erkennbar. In diesen Organismen scheint im Gegensatz zum Zellwachstum, die Zellteilung stärker durch HHD inhibiert zu sein. Die fehlende Fragmentierung der einzelnen Zellen kann auf eine reduzierte Assemblierung und Ringbildung von FtsZ zurückgeführt werden (Sato *et al.* 2002, Ishii *et al.* 2004, Kawarai *et al.* 2004, Molina-Hoppner *et al.* 2003). FtsZ ist ein GTP spaltendes, Tubulin ähnliches Protein, das in einem frühen Stadium der Teilung, in der Zellmitte zu einem Ring polymerisiert (Ericson und Stoffler 1996). Während im Anschluss an eine Druckbehandlung bei *E. coli* eine Fragmentierung der filamentösen Zellen erfolgt (Ishii *et al.* 2004, Kawarai *et al.* 2004), bleiben die Filamente bei *L. lactis* auch unter atmosphärischem Druck erhalten (Molina-Hoppner *et al.* 2003). Allgemein gilt, dass Reaktionen, die in einer Volumenzunahme resultieren, unter HHD energetisch ungünstig sind und daher inhibiert werden. Reaktionen, die zu einer Volumenabnahme führen sind hingegen energetisch günstig und werden unter HHD eher beschleunigt (Somero 1992). Obwohl an *in vitro* Studien gezeigt worden ist, dass die Polymerisierung von FtsZ mit einer Volumenzunahme verbunden und daher unter Druck energetisch ungünstig ist (Morlid *et al.* 1981), dürfte dieser Effekt bei den hier verwendeten subletalen Drücken keinen messbaren Einfluss haben. Auch bei piezophilen Bakterien wurde die Bildung von Filamenten unter suboptimalen Druckverhältnissen beobachtet. Dabei wird die Zellteilung auch bei suboptimal

niedrigen Drücken inhibiert (Yayanos und DeLong 1987, Jannasch 1987), was die Annahme unterstützt, dass die Polymerisierung der FtsZ Proteine nicht aufgrund einer energetisch ungünstigen Volumenzunahme unter HHD gehemmt wird. Viel wahrscheinlicher erscheint eine gestörte Synthese der FtsZ Proteine, bzw. eine veränderte Hydratisierung der einzelnen Monomere („preferential hydration“) unter suboptimalen Druckverhältnisse, so dass dadurch die Assemblierung der FtsZ Monomere gestört ist und so die Fragmentierung der Zellen gehemmt wird.

1.3.3 Letale Wirkung von Hochdruck auf Mikroorganismen

Die Pasteurisierung mittels Hochdruck von bis zu 1000 MPa stellt, wie bereits erwähnt, eine schonende Alternative zum thermischen Verfahren dar. Lebensmittel, aber auch andere thermolabile Substanzen wie bestimmte Pharmazeutika und Kosmetika können auf diese Weise schonend und ohne die Zugabe chemischer Substanzen konserviert werden. Da Proteine unter Hochdruck denaturieren, wird dieses Verfahren auch als „kaltes Kochen“ bezeichnet. Dabei werden aufgrund der relativ geringen Energiezufuhr nur schwache chemische Bindungen wie die hydrophoben Wechselwirkungen oder ionische Bindungen, nicht aber stabile kovalente Bindungen beeinflusst. Während die Primärstruktur von Proteinen bei einer HHD Behandlung erhalten bleibt (Mozhaev *et al.* 1994), werden Sekundärstrukturen (hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen) und Tertiärstrukturen (hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen und ionische Interaktionen) mit zunehmendem Druck beeinflusst. Je nach Druckhöhe, Umweltbedingungen und Art der Proteine und Enzyme führt dies zu einer irreversiblen Denaturierung (Balny und Masson 1993). Die Quartärstruktur komplexer Proteine und Enzyme wird bereits bei Drücken unter 150 MPa aufgelöst (Penniston 1971). Im Gegensatz zu den zahlreichen Untersuchungen über den Einfluss von HHD auf einzelne Proteine (Groß und Jaenicke 1994, Heremans und Smeller 1998, Desai *et al.* 1999) und Membranen (Mentre *et al.* 1999, Kato und Hayashi 1999), sowie über Abtötungskinetiken mikrobieller Organismen und deren Sporen sowohl in gepufferten Medien, als auch in verschiedenen Lebensmitteln (Cheftel 1995, Ritz *et al.* 2000), ist die Wirkung von Druck auf komplexe biologische Systeme und Lebewesen und somit der eigentliche Wirkmechanismus der Hochdruckpasteurisierung bisher kaum erforscht und nur unzureichend verstanden. Es existieren dazu bisher nur wenige Untersuchungen.

Einfluss von Hochdruck auf die Zellhülle

Sowohl bei *E. coli*, als auch bei *L. lactis* bewirkt HHD neben der Störung der Zellteilung auch eine Schädigung der Zellhülle, was zur Freisetzung von RNA und intrazellulären Proteinen,

bis hin zur kompletten Lyse der Zelle führen kann (Malone *et al.* 2002, Manas 2004). Zusammen mit der veränderten Membranfluidität und der Inaktivierung von Membranproteinen und verschiedenen ATP-abhängigen Transportern wird diese Schädigung als Hauptursache für die Inaktivierung von Mikroorganismen durch HHD diskutiert (Wouters *et al.* 1998, Gänzle und Vogel 2001, Ulmer *et al.* 2002b). Je nach umgebendem Medium ist es der Zelle nicht mehr möglich das osmotische Gleichgewicht, den intrazelluläre pH-Wert bzw. das zur Energiegewinnung nötige Transmembranpotential aufrechtzuerhalten. Dies führt entweder direkt zum Tod der Zelle oder verringert die natürliche Resistenz gegen ansonsten tolerierbare Umwelteinflüsse und ist somit indirekt für den Zelltod verantwortlich. Subletale Stressbedingungen wie Hitze, Kälte, ein niedriger pH-Wert (Garcia-Graells *et al.* 1998, Alpas *et al.* 2000, Pagan *et al.* 2001, Molina-Gutierrez 2002, Perrier-Cornet *et al.* 2005), antimikrobielle Substanzen (Masschalck *et al.* 2001a 2001b, Van Opstal *et al.* 2003, Rodriguez *et al.* 2005) oder osmotischer Stress (Ulmer *et al.* 2000, Wuytak *et al.* 2003) können so durch Druck vorgeschädigte Zellen abtöten. Die durch HHD hervorgerufene Abnahme der Resistenz gegenüber verschiedenen subletalen Stresseinwirkungen spiegelt das bereits beschriebene Hürdenkonzept wider.

Einfluss von Hochdruck auf die Synthese von RNA, DNA und Proteinen

Mittels radioaktiver Markierung von Thymidin, Uracil und Leucin konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die DNA-Synthese ab 50 MPa, die RNA-Synthese ab 77 MPa und die Proteinbiosynthese bereits ab 48 MPa inhibiert wird (Landau 1967, Yayanos und Pollard 1969, Groß *et al.* 1993). Vor allem die Funktion der Ribosomen scheint durch eine Hochdruckbehandlung erheblich gestört zu sein. Die daraus resultierende Inhibierung der Proteinbiosynthese gilt als Hauptursache für ein reduziertes Wachstum nicht-piezophiler Organismen schon bei moderaten Druckanstiegen (Pope und Berger 1973). *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass Ribosomen in Kombination mit mRNA und tRNA bei Drücken von über 100 MPa stabil sind, freie Ribosomen hingegen schon bei Drücken unter 60 MPa in ihre Untereinheiten zerfallen (Groß *et al.* 1993). Schwarz und Landau (1972a) fanden heraus, dass in *E. coli* eine komplette Inhibierung der Translation bei 67 MPa stattfindet. Als Ursache dafür kann eine verringerte Bildung von Aminoacyl-tRNAs (aa-tRNA), die Membranpermeabilität für Aminosäuren, die Stabilität der Polysomen und die Ausbildung der Peptidbindungen ausgeschlossen werden (Schwarz und Landau 1972a). Es wird vielmehr vermutet, dass ein Schritt zwischen der Bildung der aa-tRNA und der Ausbildung der Peptidbindung durch Hochdruck betroffen ist. Sowohl die Translokation, als auch die

Bindung der aa-tRNA ans Ribosom kommen hierfür in Frage. In *in vitro* Versuchen war die Quantifizierung dieser verringerten Bindung zwischen aa-tRNA und Ribosom unter Druck identisch mit der gemessenen Abnahme der Proteinbiosynthese in lebenden Zellen (Schwarz und Landau 1972b, Pande und Wishnia 1986). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Bindung der aa-tRNA an die 30 S Untereinheit des Ribosoms eine Konformationsänderung verursacht, welche eine Zunahme des Volumens bewirkt und somit bei steigendem Druck inhibierend auf den Translationsprozess wirkt (Smith *et al.* 1975, Arnold und Albright 1971, Schulz *et al.* 1976, Groß *et al.* 1992 und 1993). Eine gestörte Translation führt aber nicht nur zu einer verlangsamten Proteinbiosynthese, auch die Fehlerrate der Translation kann durch eine Hochdruckbehandlung erhöht sein (Hardon und Albright 1974). So ist bei *E. coli* und *Listeria monocytogenes* die Funktion der Ribosomen unter Druck soweit beeinträchtigt, dass der Translationsprozess nicht nur extrem verlangsamt ist, sondern die Anhäufung fehlerhafter Proteine für die Zellen zu hohem Stress, bis hin zum Zelltod führen kann (Isaacs *et al.* 1995, Pavlovic 2006).

1.3.4 Resistenz, Adaptation und Stressantwort

Wie mehrfach erwähnt, werden innerhalb der Zelle durch HHD beinahe alle Bestandteile wie Proteine, Lipide und Membranen, sowie wichtige physiologische und biochemische Vorgänge wie Zellteilung, Replikation, Transkription, Translation und der allgemeine Metabolismus in Abhängigkeit der Druckänderung beeinflusst. Aus diesem Grund ist es schwierig die entscheidenden Kriterien zu bestimmen, die für die Abtötung und Inaktivierung mesophiler Mikroorganismen verantwortlich sind. Aber erst mit dem Verständnis über den Mechanismus der Abtötung können Aussagen über die enorme Variabilität von Hochdruckresistenzen innerhalb der verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen getroffen bzw. die unterschiedlichen und oft mehrphasigen Inaktivierungskinetiken von Bakterien erklärt werden (Xiong *et al.* 1999, Mafart *et al.* 2002, Kilimann 2005). Aufgrund des mangelnden Wissens über die Wirkung von HHD auf Zellen ist auch die Reaktion von Mikroorganismen auf eine subletale Hochdruckeinwirkung, die Bildung von Adaptation und Resistenzen bzw. die Induktion einer spezifischen Stressantwort bisher nur ungenügend untersucht.

Resistenz durch protektive Substanzen

Verschiedene Substanzen im Medium können während einer Druckbehandlung protektiv für die Zellen wirken. So ist z. B. in Medium mit einer Saccharose-Konzentration von 1,5 M bzw. einer NaCl-Konzentration von 4 M die Inaktivierung von *L. lactis* während einer HHD Behandlung mit 600 MPa bzw. 400 MPa deutlich reduziert (Molina-Höppner 2004). Auch für

andere Bakterien und verschiedene Hefen konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Konzentration verschiedener Ionen wie Ca^{2+} , Li^+ oder Na^+ die Hochdruckresistenz signifikant erhöhen kann (Takahashi *et al.* 1993, Hauben *et al.* 1998, van Opstal *et al.* 2003, Aertsen *et al.* 2003). Der Mechanismus dieser Schutzfunktion ist bisher zwar noch nicht geklärt, aber es wird vermutet, dass durch den reduzierten a_w -Wert eine Dehydrierung der Zelle stattfindet, die Membran dicker wird und die Zellgröße bei zunehmender Druckresistenz abnimmt (Palou *et al.* 1997). Fujii *et al.* konnten zeigen, dass verschiedene Saccharide sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* schützende Funktionen gegen HHD und Hitze besitzen. Vor allem die Stabilisierung von Proteinen und Makromolekülen scheint dabei eine Rolle zu spielen und hängt wahrscheinlich direkt von der Verfügbarkeit bestimmter OH-Gruppen der verschiedenen Zucker ab (Fujii *et al.* 1996). Die Solute können aber auch für ein osmotisches Gleichgewicht sorgen, so dass Zellen mit geschädigter Zellhülle stabil bleiben und eine vorübergehende Hochdruckbehandlung überleben können.

Resistenz durch Mutation

Zusätzlich zum passiven Schutz können Mikroorganismen aber auch aktiv Resistenzen gegenüber einer HHD Behandlung ausbilden. So existieren z. B. mutierte Stämme, die sich an Hochdruck adaptiert haben. Ein Ansatz zur Charakterisierung solcher Mutanten besteht darin, hochdruckresistente mit hochdrucksensitiven Stämmen der gleichen Art zu vergleichen. Wenn signifikante Unterschiede gefunden und durch entsprechende genetische Experimente bestätigt werden können, sind Aussagen über potentielle Angriffspunkte von HHD auf solche Mikroorganismen möglich. So konnten zum Beispiel Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert werden, die sich im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm noch bei 25 MPa vermehren können und zusätzlich auch eine höhere Wachstumsrate bei niedrigen Temperaturen besitzen. Der Grund dafür liegt in einer gesteigerten Expression von *tat2*, ein Gen, das für eine hoch affine Tryptophan-Permease kodiert (Abe und Horikoshi 2000). Da das Aktivierungsvolumen für die Aufnahme von Tryptophan über die Membran mit $+46 \text{ ml mol}^{-1}$ sehr hoch ist, wird der, unter HHD energetisch ungünstige Vorgang mit steigendem Druck gehemmt und das Wachstum von *S. cerevisiae* wahrscheinlich deswegen inhibiert. Der mutierte Stamm kann aufgrund der hohen Konzentration an Tat2 trotz gestörter Funktion des Enzyms aber noch genug Tryptophan in die Zelle transportieren und so auch unter erhöhtem Druck noch wachsen. Ähnliche Beobachtungen, bei denen die Substrataufnahme unter HHD gehemmt und somit das Wachstum inhibiert ist, konnten auch bei *Enterococcus faecalis* und einer Reihe mariner Bakterien gemacht werden (Jannasch und

Taylor 1984, Matsumura und Marquis 1978). Mutationen, die die Regulation der Katabolit Repression stören oder die Aktivität der Arginin Deiminase steigern und somit die Konzentration an Ammonium innerhalb der Zelle erhöhen, ermöglichen ein Wachstum von *E. faecalis* bei Drücken von bis zu 100 MPa (Marquis und Bender 1980). Beide Mutationen können für ein Wachstum unter Druck eine entscheidende Rolle spielen. Während die Anreicherung von Ammonium zur Neutralisierung des unter Druck erniedrigten intrazellulären pH-Werts genutzt werden kann, stehen durch Mutationen in der Katabolit Repression zusätzliche katabolische Enzyme zur ATP-Gewinnung bereit. Diese Energie könnte für eine erhöhte Translokation von Protonen über die Membran durch die bereits erwähnten, Druck sensitiven F₁F₀-ATPasen zur Verfügung stehen und so dazu beitragen, den optimalen intrazellulären pH-Wert zu erhalten (Matsumura und Marquis 1977).

Neben den beschriebenen Mutationen, die einem piezosensitiven Organismus piezophile Eigenschaften verleihen, treten auch Mutationen auf, die zu piezotoleranten Eigenschaften führen. Solche Mutanten besitzen unter subletalen Hochdruckbedingungen die selbe reduzierte Wachstumsrate wie die Wildtyp Stämme, die Überlebensrate der piezotoleranten Mutanten nach einer letalen Hochdruckbehandlung ist dafür aber signifikant erhöht. Daraus kann man folgern, dass die jeweiligen Mechanismen für Wachstum und Überleben unter HHD verschieden sind. Durch Mutation erworbene piezophile und piezotolerante Eigenschaften lebensmittelrelevanter Mikroorganismen spielen im Hinblick auf einen sicheren Konservierungsprozess eine absolut wichtige Rolle bei der Etablierung der Hochdruckpasteurisierung. So konnten z. B. mutierte *E. coli* Stämme isoliert werden, deren Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp während einer letalen Hochdruckbehandlung um ein Vielfaches höher war (Hauben *et al.* 1997, Benito *et al.* 1999, Alpas *et al.* 1999). Die genetische Charakterisierung einer dieser piezotoleranten Mutanten zeigte eine erhöhte Aktivität des von *rpoS* kodierten alternativen Sigma-Faktors σ^S (Robey *et al.* 2001). Die veränderte Aktivität von RpoS, der wichtigste Regulator der Stressantwort bei verschiedenen Arten von Enterobakterien (*E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*) ist vermutlich auf die Heterogenität der *rpoS* Allele in den verschiedenen Stämmen zurückzuführen. RpoS reguliert die Transkription von weit über 40 Genen, die überwiegend unter Stressbedingungen wie niedriger pH-Wert, osmotischer Druck, oxidativer Stress oder Hungerstress exprimiert werden (Small *et al.* 1994, Abee und Wouters 1999, Hengge-Aronis 1996 und 2002).

Piezotolerante Mutanten konnten auch bei *Listeria monocytogenes* identifiziert werden (Karatzas und Bennik 2002). Resistente Stämme dieser Art besitzen gleichzeitig auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Hitze, Säure und H₂O₂. Im Gegensatz zum Wildtyp sind die

mutierten Zellen länger, besitzen keine Flagellen und ihre Wachstumsrate ist unter optimalen Bedingungen bei atmosphärischem Druck leicht reduziert. Die genetische Charakterisierung zeigte, dass für den resistenten Phänotyp die Deletion eines einzelnen Kodons im *ctsR* Gen verantwortlich ist (Karatzas *et al.* 2003). CtsR wirkt bei Gram positiven Bakterien als Repressor der als „Stressgene der Klasse 3“ („Class three stress gene Repressor“) bekannten Gene (Derre *et al.* 1999, Varmanen 2000). Dazu zählen vor allem verschiedene Clp-ATPasen, die als Peptidasen, Chaperone oder in Kombination mit ClpP auch als spezifische Proteasen aktiv sein können (Maurizi *et al.* 1990, Wickner *et al.* 1994, Gottesman *et al.* 1998). Durch die Mutation ist vermutlich die Funktion von CtsR als Repressor verloren gegangen, so dass im Vergleich zum Wildtyp die durch CtsR regulierten Stressproteine stark erhöht sind und auch durch Hitzestress nicht weiter induziert werden (Karatzas *et al.* 2003).

Resistenz durch Stressantwort

Wie eben gezeigt, können Mutationen von Aktivatoren oder Repressoren zu erhöhten Konzentrationen einer ganzen Reihe spezifischer und allgemeiner Stressproteine in der Zelle und somit zu einer Steigerung der Resistenz gegenüber HHD und anderen Stressarten führen (Kreuzresistenz). Zellen können aber auch mittels einer gezielten Überexpression einzelner Stressgene wie *groES* und *groEL* die Stresstoleranz erhöhen (Desmond *et al.* 2004).

Somit kann die Stresstoleranz von Mikroorganismen nicht nur durch Mutationen oder gentechnische Veränderungen gesteigert werden. Wie aus einer Vielzahl von Arbeiten bekannt ist, besitzt jedes Lebewesen das Potential durch die Ausbildung einer Stressantwort aktiv auf subletale Umwelteinflüsse zu reagieren. Bei Bakterien sind eine Reihe solcher Stressantworten wie zum Beispiel auf Veränderungen der Temperatur oder des pH-Wertes bereits ausführlich untersucht (Abee und Wouters 1999, Lengeler *et al.* 1999a). Durch die Ausbildung einer mehr oder weniger spezifischen Stressantwort kann sich ein Organismus nicht nur an den auslösenden Stress adaptieren, sondern gleichzeitig auch andere, dem Organismus bisher noch unbekannt Stressbedingungen besser tolerieren (Hecker 1998). Die Ausbildung einer so genannten Kreuzresistenz kann sich vor allem bei der Hochdruckpasteurisierung von Lebensmitteln negativ auswirken. Wenn in Mikroorganismen durch die Vorgeschichte der Lebensmittel wie eine moderate und daher subletale Erwärmung, Kühlung, niedriger pH-Wert oder hohe Salzkonzentration eine Stressantwort induziert wird, kann dies auf die Resistenz gegenüber einer folgenden Hochdruckbehandlung Auswirkungen haben. So konnte gezeigt werden, dass *E. faecalis* durch die Induktion einer Stressantwort während der stationären Phase gegen eine Vielzahl anderer Stressarten erhöhte Resistenz

aufweist (Giard *et al.* 1996). Diese Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebenen Untersuchungen an hochdruckresistenten Mutanten von *E. coli*, bei denen die Konzentration des alternativen Sigma-Faktors σ^S erhöht sind und somit zahlreiche Stressproteine auch in der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt synthetisiert werden (Robey *et al.* 2001). Untersuchungen an Bakterien und Hefen zeigten, dass eine Vorinkubation unter verschiedenen subletalen Bedingungen die Resistenz gegenüber einer folgenden Hochdruckbehandlung signifikant erhöhen kann. Ein aus Meerwasser isolierter *Vibrio* Stamm besitzt in der stationären Phase eine höhere Druckresistenz als in der exponentiellen Phase (Novitsky und Morita 1978). *Micrococcus roseus*, ein ebenfalls aus dem Meer isoliertes Bakterium besitzt nach einer Vorinkubation in Medium mit verschiedenen hohen NaCl Konzentrationen ebenfalls eine erhöhte Hochdruckresistenz (Tanaka *et al.* 2001). Experimente mit lebensmittelrelevanten Bakterien zeigten, dass bei *L. monocytogenes* (Wemekamp-Kamphuis 2002) und *Staphylococcus aureus* (Noma und Hayakawa 2002) eine Vorinkubation bei niedrigen Temperaturen, bei *E. coli* hingegen eine Vorinkubation bei einer erhöhten Temperatur von 50°C die Hochdruckresistenz stark erhöht (Aertsen *et al.* 2004). Auch bei *S. cerevisiae* nimmt die Hochdruckresistenz nach einer Inkubation bei 43°C zu (Iwahashi *et al.* 1991, Obuchi *et al.* 1992). Neuere Untersuchungen zeigen, dass in diesem Organismus der gleiche Effekt auch durch eine Vorinkubation bei einer Temperatur von nur 10°C, einer Ethanol Konzentration von 6% oder einer H₂O₂ Konzentration von 0,4 mM erreicht wird (Palhano *et al.* 2004b). Neben dem Auftreten von Kreuzresistenzen können auch Adaptationen beobachtet werden. So kann die Hochdruckresistenz von *E. coli* durch eine Vorinkubation unter subletalem Hochdruck deutlich gesteigert werden (Gao *et al.* 2001). Darüber hinaus kann eine subletale Hochdruckbehandlung auch selbst zu Kreuzresistenzen gegenüber anderen letalen Stresszuständen führen. So ist die Überlebensrate einer Population von *L. rhamnosus* während einer Hitzebehandlung bei 60°C deutlich höher, wenn sie zuvor für 10 min bei einer Temperatur von 37°C und einem subletalen Druck von 100 MPa inkubiert wurde (Ananta und Knorr 2003). Ananta und Knorr (2004) zeigten, dass eine funktionierende Protein *de novo* Synthese für diesen Effekt notwendig ist und *L. rhamnosus* somit eine HHD induzierte Stressantwort zu besitzen scheint, die eine erhöhte Resistenz gegenüber einer anschließenden letalen Hitzebehandlung verleiht.

Bisher existieren mehrere Untersuchungen zur hochdruckinduzierten Stressantwort bei Mikroorganismen. Allerdings sind diese aufgrund der verschiedenen physikalischen Parameter (Druckhöhe, Druckzeit, Temperatur, Medium), der Wachstumsphase und der unterschiedlichen Physiologie der verschiedenen Zellen nur sehr schwer miteinander

vergleichbar. Die ausführlichsten Daten sind für den Modellorganismus *E. coli* vorhanden. Neben Ergebnissen verschiedener Proteomstudien mittels 2D-Gelelektrophorese (Welch *et al.* 1993, Groß *et al.* 1994, Aertsen *et al.* 2004a) gibt es auch Resultate auf Ebene des Transkriptoms mittels DNA-Microarray (Ishii *et al.* 2005) und anderer Methoden (Kato *et al.* 1994, Nakashima *et al.* 1995, Sato *et al.* 1995 und 1996, Kato und Horikoshi 1996, Aertsen *et al.* 2004b, 2005). Es kann beobachtet werden, dass HHD keine spezifische Stressantwort bei *E. coli* induziert. Stattdessen besitzt die hochdruckinduzierte Stressantwort Elemente aus verschiedenen Stressantworten wie sie unter anderem nach oxidativem Stress oder Hitzestress auftreten. Auch eine SOS-Antwort kann durch Hochdruck bei *E. coli* ausgelöst werden. Neben Stressproteinen wie GroEL und DnaK können auch typische Kältestressproteine und ribosomale Proteine detektiert werden. In Analogie zu piezophilen Tiefseebakterien ist auch bei *E. coli* die Synthese von äußeren Membranproteinen, die Porine bilden können durch HHD beeinflusst. Außerdem wird eine Induktion von CydD, das für die Zusammenlagerung des Cytochrom BD-Komplexes der Atmungskette wichtig ist, als Anpassung an steigenden Druck beobachtet.

Ähnlich umfangreiche Untersuchungen stehen sonst nur noch für die Hefe *S. cerevisiae* zur Verfügung. Ausführliche Transkriptionsanalysen beschreiben das Verhalten unter letalen und subletalen Hochdruckeinwirkungen von 10 bis 200 MPa (Odani *et al.* 2002, Iwahashi *et al.* 2002, 2003 und 2005, Abe 2004, Palhano *et al.* 2004a, Fernandes *et al.* 2004, Fernandes 2005). Auch bei diesem Organismus findet man verschiedene Stressproteine, wobei je nach Druckhöhe deutliche Unterschiede festzustellen sind. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass bei 75 MPa die Synthese des Hitzeschockproteins Hsp104 induziert wird (Tamura *et al.* 1998). Auch bei verschiedenen eukaryotischen Zellen menschlichen Ursprungs wird unter anderem die Synthese eines Hitzeschockproteins (Hsp70) unter HHD induziert (Takahashi *et al.* 1996, Elo *et al.* 2000, Kaarniranta *et al.* 2000).

Alle weiteren bisher durchgeführten Studien zur Genexpression bzw. Proteinsynthese unter Druck mit den verschiedensten Organismen wie *Methanococcus thermolithotrophicus* (Jaenicke *et al.* 1988), *Rhodospiridium sphaerocarpum* (Groß *et al.* 1994), *L. monocytogenes* (Wemekamp-Kamphuis *et al.* 2002) oder *L. sanfranciscensis* (Drews *et al.* 2002, Scheyhing 2002) sind miteinander nicht vergleichbar. *L. monocytogenes* und *L. sanfranciscensis* sind die einzigen Vertreter Gram positiver Bakterien. Für *L. monocytogenes* existieren Daten lediglich für Versuche mit einem kurzen letalen Druck von 200 MPa. Eine klassische Stressantwort ist bei dieser Druckhöhe in der Zelle nicht zu erwarten. Dennoch wird eine Erhöhung der

Konzentration von zwei Kälteschockproteinen in der Zelle beobachtet (Wemekamp-Kamphuis *et al.* 2002).

In der von Drews *et al.* durchgeführten Proteomanalyse wird die Veränderung des Proteinmusters bei *L. sanfranciscensis* nach einer einstündigen Inkubation bei optimaler Wachstumstemperatur und verschiedenen hohen Drücken von 25 MPa (subletal) bis 200 MPa (letal) untersucht (Drews *et al.* 2002). Die resultierenden Ergebnisse bilden eine gute Grundlage für einen tieferen Einblick in die hochdruckinduzierte Stressantwort bei *L. sanfranciscensis*.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit, die im Rahmen der interdisziplinären DFG-Forschergruppe „Einfluss von Hochdruck auf molekulare und zelluläre Systeme in Lebensmitteln“ angefertigt wurde, war die Charakterisierung der durch subletalen Hochdruck induzierten Stressantwort bei *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451^T. Das stäbchenförmige, heterofermentative Milchsäurebakterium ist ein typischer Vertreter und Leitorganismus im Sauerteig, aus dem es auch erstmals isoliert wurde (Kline und Sugihara 1971, Gobetti *et al.* 1996, Hammes *et al.* 1996, Gobetti und Corsetti 1997). Aufgrund der zahlreichen und zum Teil unter Hochdruck durchgeführten biochemischen und stoffwechselphysiologischen Arbeiten und der Etablierung wichtiger molekularbiologischer Methoden ist *L. sanfranciscensis* als Modellorganismus für die Untersuchung der Wirkungen von HHD auf Gram positive Bakterien geeignet (Gobetti *et al.* 1996, Gänzle *et al.* 1998, Ehrmann und Vogel 1998, De Angelis *et al.* 2001, Korakli *et al.* 2001, 2002, 2003, Vermeulen *et al.* 2005). Die auf die Ergebnisse von Scheyhing (2002) aufbauende Arbeit soll unter Berücksichtigung der Daten von Drews *et al.* (2002) zusammen mit den Studien zur Transkriptionsanalyse unter Hochdruck bzw. der Charakterisierung hochdruckresistenter Stämme (Pavlovic 2006) einen umfangreichen Einblick in die hochdruckinduzierte Stressantwort bei *L. sanfranciscensis* geben. Neben den Daten für die Modellorganismen *S. cerevisiae* (Hefen) und *E. coli* (Gram negative Bakterien) sollten erstmals auch detaillierte Ergebnisse für einen Vertreter der Gram positiven Bakterien erarbeitet werden. Erkenntnisse über das Verhalten von Vertretern der wichtigsten lebensmittelrelevanten Gruppen von Mikroorganismen unter Druck geben Aufschluss über die Wirkung von HHD auf die verschiedenen Organismen. Dies wiederum ist essentiell für eine sichere Anwendung der Hochdruckpasteurisierung bzw. für die Etablierung eines sinnvollen Hürdenkonzepts unter Beteiligung von HHD.

Zu Beginn dieser Arbeit sollen die bereits existierenden physiologischen Experimente zu Adaptation und Kreuzresistenz mit verschiedenen anderen, in Lebensmittel relevanten Stressarten wie Hitze-, Kälte-, Säure-, Salz- oder Hungerstress bestätigt und erweitert werden (Scheyhing 2002). Dabei sollte zusätzlich geklärt werden, ob eine *de novo* Proteinbiosynthese für den Effekt der Hochdruckadaptation nötig ist. Diese Ergebnisse sind nicht nur für die Etablierung der Hochdruckpasteurisierung im Sinne des Hürdenkonzepts von Interesse, sondern können im umgekehrten Fall auch für eine Optimierung der Präparation von Starterkulturen nützlich sein.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte unter Einbeziehung der von Scheyhing und Drews bereits generierten Daten (Scheyhing 2002, Drews *et al.* 2002) mittels hoch auflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese die hochdruckinduzierte Stressantwort von *L. sanfranciscensis* ausführlich auf Proteomebene untersucht werden, um Einblicke in die Wirkungsweise von HHD auf den Organismus zu bekommen. Die Proteine, deren Konzentrationen in der Zelle als Antwort auf eine Hochdruckbehandlung verändert werden, sollten anschließend unter den oben genannten Stressbedingungen untersucht, charakterisiert und miteinander verglichen werden. Unbekannte Proteinspots sollten mittels massenspektrometrischer Verfahren analysiert und identifiziert werden.

Mit den Methoden der reversen Genetik sollen ausgehend von einzelnen Peptidsequenzen die kompletten Gene der durch HHD induzierten Proteinspots gefunden und charakterisiert werden. Nach Aufklärung kompletter Aminosäuresequenzen soll versucht werden einige Proteine näher zu analysieren.

Besonderes Interesse bei der Genanalyse sollte auch den jeweiligen Promotorsequenzen gewidmet werden. Mittels Northern Blot Analyse kann die Transkriptionsrate der jeweiligen Gene bestimmt und so die Aktivität ihrer Promotoren charakterisiert werden. Für eine genaue Quantifizierung der Promotoraktivitäten sollte ein neues Reportersystem für *L. sanfranciscensis* konstruiert und anhand des NaCl-abhängigen *dnaK*-Promotors verifiziert und etabliert werden. Die gewonnenen Daten sollten dann mittels semiquantitativer RealTime-PCR überprüft werden. Dazu ist zunächst die Etablierung eines konstitutiv exprimierten und unter HHD nicht regulierten Referenzgens aus *L. sanfranciscensis* notwendig. Abschließend sollten die ermittelten Werte mit denen des DNA-Microarrays aus der Dissertation von Melanie Pavlovic verglichen werden (Pavlovic 2006).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle für die Reproduzierbarkeit der Arbeit benötigten Materialien werden in den folgenden Kapiteln beschrieben. Die Beschreibung spezieller Geräte erfolgt bei Bedarf in den entsprechenden Kapiteln des Methodenteils.

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Gerbu (Gaiberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Enzyme zur Restriktion, Ligation oder anderen Modifikationen von DNA, sowie Enzyme zur Amplifizierung bzw. reversen Transkription von DNA und RNA stammen von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Hybaid-AGS (Heidelberg), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) und Promega (Mannheim). Weitere Enzyme wie z.B. Lysozym wurden darüber hinaus auch von der Firma Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) gekauft.

2.1.2 Medien und Medienzusätze

Alle Medien wurden falls nicht anders erwähnt 20 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und dem abgekühlten Medium aseptisch zugegeben. Zur Verfestigung wurde den Medien ein Anteil von 1,5% an Agar-Agar (Difco, Augsburg) zugesetzt.

SOC-Medium [AUSUBEL *et al.*, 1987]:

Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)	20,0 g	
Hefeextrakt	5,0 g	
NaCl (10 ml; 1M Stammlösung)	10 mM	
KCl (2,5 ml; 1M Stammlösung)	2,5 mM	
Aqua _{deion}	ad 980 ml,	pH 7,0

Nach Autoklavieren Zugabe von:

Glucose (10 ml einer sterilfiltrierten 2 M Stammlösung)	20 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (10 ml einer sterilfiltrierten Stammlösung, jeweils 1 M)	10 mM

LB-Medium [SAMBROOK *et al.*, 1989]:

Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)	10,0 g	
Hefeextrakt	5,0 g	
NaCl	10,0 g	
Aqua _{deion}	ad 1000 ml,	pH 7,2

MRS-Medium [DE MAN *et al.*, 1960 (mod.):

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	10,0 g	
Fleischextrakt	5,0 g	
Hefeextrakt	5,0 g	
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	2,6 g	
Kaliumdihydrogenphosphat	4,0 g	
Ammoniumchlorid	3,0 g	
Cystein-HCl	0,5 g	
Tween 80 [®]	1 ml	
Aqua _{deion}	ad 800 ml,	pH 6,5

Nach Autoklavieren Zugabe von:

Maltose	10,0 g
Fructose	10,0 g
Aqua _{deion}	ad 200 ml,
(separat autoklaviert)	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	100 mg
Mangansulfat-Tetrahydrat	50 mg
(1 ml einer sterilfiltrierten Stammlösung mit 100 g/l bzw. 50 g/l)	

Medienzusätze:**Ampicillin**

Die Stammlösung von 50 mg/ml wurde mit Aqua_{deion} hergestellt, sterilfiltriert und in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Erythromycin

Die Stammlösung von 20 mg/ml wurde in Ethanol hergestellt, sterilfiltriert und in einer Endkonzentration von 5 µg/ml für *L. sanfranciscensis* bzw. 20 µg/ml für *E. coli* zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Chloramphenicol

Die Stammlösung von 34 mg/ml wurde in Ethanol hergestellt, sterilfiltriert und in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Die Stammlösung von 2 00mg/ml wurde in Aqua_{deion} gelöst, sterilfiltriert und in einer Endkonzentration von 40 µg/ml dem Medium zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranoside (X-α-Gal) (ICN Biomedicals, USA)

Die Stammlösung von 2 mg/ml wurde in Dimethylformamid (DMF) hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in Dunkelheit. 250 µl wurden auf einer Agarplatte ausplattiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Analog wurde mit X-β-Gal verfahren. Alternativ wurde hier vor dem Gießen der Agarplatten 1 ml einer Stammlösung (20 mg/ml DMF) in das abgekühlte, noch flüssige Medium gegeben.

2.1.3 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Zu charakterisierender Mikroorganismus:

Lactobacillus sanfranciscensis TMW 1.53 (DSM20451^T); dieser Stamm besitzt keine α -Galactosidase-Aktivität (α -Gal-Aktivität: „-“)

Tabelle 2.1 Milchsäurebakterien für das Screening auf α -Galactosidase-Aktivität. Die α -Galactosidase-Aktivität der einzelnen Stämme wurde qualitativ im Rahmen dieser Arbeit bestimmt und entsprechend angegeben („-“ = keine Aktivität „+++“, „++“, „+“ = sehr starke, starke, Aktivität)

Stamm	α -Gal-Aktivität	Stamm	α -Gal-Aktivität
<i>Lactobacillus brevis</i> TMW 1.6	+++	<i>Lactobacillus hildegardii</i> TMW 1.45	++
<i>Lactobacillus pentosus</i> TMW 1.30	++	<i>Lactobacillus alimentarius</i> TMW 1.62	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> TMW 1.58	++	<i>Lactobacillus viridescens</i> TMW 1.70	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> TMW 1.187	+	<i>Lactobacillus buchneri</i> TMW 1.75	+++
<i>Lactobacillus johnsonii</i> TMW 1.189	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TMW 1.63	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> TMW 1.9	-	<i>Lactobacillus pontis</i> TMW 1.84	+++
<i>Lactobacillus pentosus</i> TMW 1.10	-	<i>Lactobacillus plantarum</i> TMW 1.64	+
<i>Lactobacillus alimentarius</i> TMW 1.11	-	<i>Lactococcus lactis</i> TMW 1.1085	-
<i>Lactobacillus casei</i> TMW 1.14	+	<i>Pediococcus acidilactici</i> TMW 2.1	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TMW 1.18	-	<i>Pediococcus inopinatus</i> TMW 2.2	++
<i>Lactobacillus suebicus</i> TMW 1.44	+	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TMW 2.6	-
<i>Leuconostoc lactis</i> TMW 2.330	-		

Tabelle 2.2 Verwendete *E. coli* Stämme zur Durchführung von Klonierungen und zur heterologen Expression von Proteinen

<i>E. coli</i> Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
DH5-alpha	Stratagen	F-, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk+), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>del(lacZYA-argF)U169</i> , (Phi80 <i>lacZ</i> delM15)	Klonierung
XL1-Blue	Stratagen	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> , F'[<i>proAB</i> , <i>lacIqZdelM15</i> , Tn10]	Klonierung
BL21 (DE3)pLysE	Novabiochem	F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB-mB-), <i>gal</i> , (LambdaDE3), (pLysE)	Heterologe Expression
TOP 10	Invitrogen	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Klonierung / Heterologe Expression

2.1.4 Plasmide

Tabelle 2.3 Bereits verfügbare Plasmide:

Plasmid	Referenz	Genotyp	Verwendung
pLP3537	Posno <i>et al.</i> (1991)	p353-2, <i>amp</i> ⁺ , <i>ery</i> ⁺	<i>E. coli</i> / <i>Lactobacillus</i> Shuttle-Vektor Ursprung für Reporter-System
pSP72	Promega	<i>amp</i> ⁺ , multiple cloning site (MCS), SP6 und T7 binding sites	Klonier- und Sequenziervektor
pGEM [®] -3Zf(+)	Promega	<i>amp</i> ⁺ , MCS, SP6 und T7 binding sites, <i>lacZ</i> ⁺	Klonier- und Sequenziervektor Blau-Weiss-Screening (<i>lacZ</i>)
pET3a 6xHis	Novagen	<i>amp</i> ⁺ , pBR322 <i>ori</i> , T7 promotor, C-terminal 6xHis-tag	Klonierung und heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> Induktion mit IPTG
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen	<i>amp</i> ⁺ , <i>kan</i> ⁺ , MCS, pUC <i>ori</i> , f1 <i>ori</i> , <i>lacZ</i> ⁺	TOPO TA Cloning [®] Kit, direkte Klonierung von PCR-Fragmenten, Blau-Weiss-Screening (<i>lacZ</i>)
pBAD/ <i>Myc</i> -His A	Invitrogen	<i>amp</i> ⁺ , pBR322 <i>ori</i> , <i>myc</i> -epitope, <i>araC</i> ORF, <i>araBAD</i> -Promotor, C-terminal 6xHis-tag	Klonierung und heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> Induktion mit Arabinose
pGEX 4T-1	GE-Healthcare	<i>amp</i> ⁺ , MCS, <i>gst</i> ⁺ , <i>tac</i> promotor, <i>lac</i> operator, coding region for thrombin cleavage	Klonierung und heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System
pSTBlue-1 = pAccepTor (linearisiert)	Novagen	<i>amp</i> ⁺ , <i>kan</i> ⁺ , MCS, SP6 und T7 binding sites, pUC <i>ori</i> , f1 <i>ori</i> , <i>lacZ</i> ⁺	direkte Klonierung von PCR-Fragmenten, Blau-Weiss-Screening (<i>lacZ</i>)

Tabelle 2.4 In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide, die auch für weitere Studien verwendet wurden (Plasmide für Hilfskonstruktionen, Sequenzierreaktionen oder für Experimente zur Überexpression von Proteinen sind nicht aufgeführt):

Plasmid	Genotyp	Verwendung
pSH85350	pLP3537 (Shuttle-Vektor) + <i>mela</i> Reportergen-Kassette ohne Promotorsequenz, Ribosomen-bindestelle und ATG-Startkodon; up- und downstream der Kassette befinden sich Terminatorsequenzen	Ausgangsvektor für Klonierungen von Promotoren vor das <i>mela</i> -Reportergen
pSH85351	pSH85350 + <i>dnaK</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>dnaK</i> -Promotors
pSH85352	pSH85350 + <i>rbsK</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>rbsK</i> -Promotors
pSH85353	pSH85350 + <i>mdh</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>mdh</i> -Promotors
pSH85354	pSH85350 + <i>clpL</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>clpL</i> -Promotors
pSH85355	pSH85350 + <i>ctsR</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>ctsR</i> -Promotors
pSH85356	pSH85350 + <i>cpsID</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>cpsID</i> -Promotors
pSH 85357	pSH85350 + <i>xpk</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>xpk</i> -Promotors
pSH85358	pSH85350 + <i>fusA</i> -Promotorsequenz	Analyse des <i>fusA</i> -Promotors

2.1.5 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle werden nur die wichtigsten Oligonukleotide dieser Arbeit aufgeführt, die zur Reproduktion einzelner Ergebnisse benötigt werden und nicht ohne weiteres aus den vorliegenden Informationen ermittelt werden können. Die zum Teil degenerierten Oligonukleotide für inverse PCR Reaktionen, die ausschließlich zur Identifizierung und Sequenzierung der in dieser Arbeit untersuchten Gene verwendet wurden, sind in dieser Aufstellung nicht berücksichtigt. Da die entsprechenden (Partial-) Sequenzen der beschriebenen Gene in dieser Arbeit abgebildet sind, sind diese Oligonukleotide nicht weiter von Bedeutung. Auch einzelne Oligonukleotide, die z.B. zur Klonierung von Genen in Expressionsvektoren verwendet wurden sind nicht aufgeführt.

Tabelle 2.5 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Kursiv dargestellte Sequenzen sind nicht komplementär zu den jeweiligen Gensequenzen und stellen in der Regel zusätzlich angefügte Restriktionsschnittstellen dar. Die Bezeichnung der Primer setzt sich zusammen aus einem Kürzel des entsprechenden Gens, bei Bedarf der hauptsächlichen Verwendung (L = LightCycler; S = DIG markierte Sonde) und der Orientierung (f = forward; r = reverse).

Bezeichnung	Sequenz	Referenz / Kapitel
MelA_f	ATATGCCGGCACGTTGCAGCAAACCTTTAATTG	3.6.1 (Reporter gen)
MelA_r	ATATAAGCTTCCGCTGATCAAGACATTGACTTC	3.6.1 (Reporter gen)
MalTer_f	ACATTAAGCTTCAGAAAATGTCATTGGATTGG	3.6.1 (Terminator)
MalTer_r	AATATGCCGGCAAATGTTAATTAACAAC	3.6.1 (Terminator)
DnakPr_f	ATATGCCGGCGTAACTTTTGGGGATCATAATCCG	3.6.1 (Testpromotor)
DnakPr_r	ATATGCCGGCGTAACTTTTGGGGATCATAATCCG	3.6.1 (Testpromotor)
Dnak-S_f	CAAACCTCTGCAGTTGCTG	3.6.2, 3.6.1
Dnak-S_r	ATACCTAATGACAATGGAG	3.6.2, 3.6.1
Dnak-L_f	AGCGGTTGCTTTAGGTGCTG	3.6.3.6
Dnak-L_r	CCATTGGACGTTACCTTGT	3.6.3.6
16S-S_f	AAGGGTTTCGGCTCGTAAAA	3.6.2, 3.6.1
16S-S_r	TTAGATTGGCAGAAGATGTC	3.6.2, 3.6.1
Xpk-S_f	TCACCAAGATCCAGGTCT	3.6.2, 3.6.1
Xpk-S_r	TTATTTGTAAAGTGGTTCC	3.6.2, 3.6.1
Xpk-L_f	CACCCCTCGTCCACAATGG	3.6.3.9
Xpk-L_r	CGAATCTTCATTTCTGGG	3.6.3.9
Xpk-Pr_f	TGAATGCCGGCTTCTTTTACCAAGATCC	3.6.3.9
Xpk-Pr_r	TGTAATCGCCGGCCATGCAATAAACTCC	3.6.3.9
MelA-S_f	AGAACAACCTGTCTTTCACCTG	3.6.2, 3.6.1
MelA-S_r	CGGTAAATTCCTGAGAACC	3.6.2, 3.6.1
Rbsk-Pr_f	ATATGCCGGCCTCCTCTTAAATATAATTTATATAGTTAC	3.6.3.1
Rbsk-Pr_r	ATATGCCGGCCATCTTTGTAGCCTCCTCTTTTC	3.6.3.1
Rbsk-S_f	CAGACGGAATGAATATTGAC	3.6.3.1
Rbsk-S_r	CATTGGCTAACATCGATGTT	3.6.3.1
RbsK-L_f1	ATTATTGTCGTCGGTTCCG	3.6.3.1
RbsK-L_f2	GAATCAGAAGCAGCAACC	3.6.3.1
RbsK-L_r1	CCATCATTTTCGCATCTTC	3.6.3.1
RbsK-L_r2	GCAAGAGAACCAATAAAGG	3.6.3.1
Mdh-Pr_f	ATATGCCGGCCATAATAGATCTCCTCTTA	3.6.3.2
Mdh-Pr_r	TTTTGGCCGGCATGATAGGCTTTGGCCCA	3.6.3.2
ClpL-Pr_f	TTATGCCGGCATCTTTATAAGCACTATC	3.6.3.3

ClpL-Pr_r	ATATGCCGGCCATTGTATAATCCTTCTTCC	3.6.3.3
ClpL-S_f	TGGTGCTACTGCTGGTTAC	3.6.3.3
ClpL-S_r	GTTACGGTATTCGTCTTGAG	3.6.3.3
ClpL-L_f1	ACCCCTACTCAAGCAAAAC	3.6.3.3
ClpL-L_f2	GAAACACCAGTTGCTAAACC	3.6.3.3
ClpL-L_r1	AAACCTTCAACGATAGCAG	3.6.3.3
ClpL-L_r2	TTACCGTCATCAAAACCAG	3.6.3.3
CtsR-Pr_f	TCGGGAGCCGGCTCAGCTAGGTAGAGCAC	3.6.3.5
CtsR-Pr_r	TATGGCCGGCCATATTATCATCTCATCTCTG	3.6.3.5
GroESL-S_f	ATTTTCTGATGACGCCCG	3.6.3.7
GroESL-S_r	GGCAATGAAATTGCACGAG	3.6.3.7
Cps1D-Pr_f	TAATTGCCGGCTTTTTTCTTAAAATTAAAG	3.6.3.8
Cps1D-Pr_r	ATATGCCGGCCATTTTTTTCATTAAATTATCG	3.6.3.8
FusA-Pr_f	AGTGGCCGGCTCGCTAAAGAAATTATTG	3.6.3.10
FusA-Pr_r	ATTTGCCGGCCATTATTAACCTCTTTTAAA	3.6.3.10

2.2 Methoden

2.2.1 Physiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agar über Nacht bei einer Temperatur von 37°C. Zur Selektion von Stämmen, die ein Plasmid tragen, wurden dem Medium entsprechende Antibiotika bzw. chromogene Substanzen beigefügt. LB-Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und je nach Verwendungszweck unterschiedlich lange bei 37°C auf dem Schüttler aerob bebrütet. Die heterologe Expression in exponentiell wachsenden *E. coli* Kulturen wurde je nach Expressionssystem durch Zugabe von IPTG oder Arabinose in unterschiedlichen Konzentrationen induziert.

Die Zellen von *L. sanfranciscensis* und anderen Milchsäurebakterien wurden in mit mMRS Bouillon randvoll gefüllten Röhrchen und fest verschlossenem Deckel bei optimaler Temperatur von 30°C bis 37°C kultiviert. Die Bebrütung auf mMRS Agarplatten erfolgte anaerob im Anaerobiertopf oder im Brutschrank mit definierter Gasatmosphäre (80% N₂, 20% CO₂).

2.2.1.2 Stammhaltung

Zur langfristigen Konservierung wurden frische Übernachtskulturen (ca. 10 ml) abzentrifugiert und in ca. 800 µl frischem Medium und 800 µl sterilem Glycerin (80%) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen gefüllt und bei -76°C gelagert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte und Wachstumsrate

Zur Bestimmung der Zelldichte, bzw. zur Bestimmung der Wachstumsphase und der Wachstumsrate wurde die optische Dichte einer Kultur im Vergleich zum unbeimpften Medium (Referenz) gemessen. Die Messung wurde bei 590 nm in einem Spektralphotometer (NovaspecII; Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Bei Extinktionswerten >1,0 erfolgte vor der Messung eine Verdünnung der Kultur.

Die Wachstumsrate einer Kultur wurde anhand der Veränderung der optischen Dichte in Abhängigkeit der Zeit ermittelt. Die Messungen erfolgten dabei in bestimmten zeitlichen Intervallen. Die Wachstumsrate einer Kultur unter verschiedenen Umweltbedingungen (Stressbedingungen) konnte anhand dieser Daten sowohl graphisch, als auch rechnerisch ermittelt werden.

Eine Zellzahlbestimmung erfolgte durch Ausplattieren von 100 µl einer Zellsuspension auf Agarmedium (Doppelbestimmung). Zur Auswertung wurden nach der Bebrütung nur Platten mit einer Zellzahl von 30 bis 300 KBE herangezogen. Bei unbekanntem und höheren Zelldichten wurden zuvor Verdünnungsreihen in 0,86%-iger NaCl-Lösung hergestellt. Das Ausplattieren erfolgte entweder mittels Drygalski-Spatel oder eines Spiralplaters (EddyJet 1.2 IUL Instruments, Königswinter).

2.2.1.4 Letale und subletale Stressbehandlung

Die Streßexperimente wurden in flüssigem Nährmedium durchgeführt. Hierzu wurde eine frische Übernachtskultur von *L. sanfranciscensis* ca. 1%-ig in 30°C warmes mMRS Medium überimpft. Das Einbringen von Sauerstoff wurde dabei möglichst vermieden. Bis zum Beginn der Streßbehandlung wurde die Kultur bei optimaler Wachstumstemperatur bebrütet. Falls nicht anders angegeben begann die Stressbehandlung in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von OD₅₉₀ zwischen 0,4 und 0,6. Dazu wurden die Kulturen auf Röhrchen verteilt und die Zellen mit möglichst geringer Umdrehungszahl pelletiert. Während die Kontrollkultur in temperiertem mMRS Medium vorsichtig resuspendiert wurde, erfolgte bei den zu testenden Kulturen die Zugabe des jeweiligen Stress-Mediums (verschiedene NaCl-Konzentrationen, vorgekühltes oder vorgewärmtes Medium,...). Die anschließende

Bebrütung erfolgte dann unter den entsprechenden Stressbedingungen. Während der Bebrütung konnte dann die Wachstumsrate bestimmt werden. Außerdem konnten nach Inkubation für ein bis drei Stunden die Zellen zur Herstellung eines Proteinrohextraktes für die Proteomanalyse geerntet werden.

2.2.1.4.1 Ermittlung der Stressbedingungen

Zur Ermittlung definierter, subletaler Stressbedingungen für *L. sanfranciscensis* wurden die Wachstumsraten bei verschiedenen Stressbedingungen bestimmt und mit der Wachstumsrate unter optimalen Bedingungen verglichen. Für alle Stressversuche wurden die Bedingungen dann so gewählt, dass die Wachstumsrate unter Stress auf 10% der optimalen Wachstumsrate reduziert ist. Auf diese Weise ist die Höhe der jeweiligen Stressbedingung für verschiedene Stressarten identisch und kann miteinander verglichen werden. Kulturen, deren Stressantwort mittels Kreuzresistenzversuchen, Proteomanalyse oder Promotorstudien untersucht wurden, mussten daher unter den jeweils definierten, subletalen Stressbedingungen inkubiert werden.

Die letalen Stressparameter für die Versuche zur Entwicklung von Kreuzresistenzen wurden anhand von Erfahrungswerten und durch weitere Versuche ermittelt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Stressintensitäten nicht so hoch waren, dass alle Zellen (auch adaptierte Zellen oder Zellen mit erworbener Kreuzresistenz) abgetötet wurden, gleichzeitig aber hoch genug waren, dass Effekte erworbener Resistenzen oder veränderter Sensitivitäten erkannt werden konnten.

2.2.1.4.2 Untersuchte Stressarten

Temperaturstress

Zur Festlegung der subletalen Stressbedingungen für Kälte und Hitze wurde eine exponentiell wachsende 10 ml Kultur geteilt, und abzentrifugiert. Die einzelnen Zellpellets wurden in unterschiedlich temperiertem mMRS Medium resuspendiert (10 ml) und bei den jeweiligen Temperaturen weiter inkubiert. Durch Bestimmung der Wachstumsraten in Abhängigkeit der Temperatur des Mediums konnte durch Vergleich mit der optimalen Wachstumsrate der Wert für die subletale Inkubationstemperatur (10% der optimalen Wachstumsrate bei 30°C) bestimmt werden.

Für die Festlegung letaler Temperaturen wurde die Prozedur leicht abgewandelt. Für Hitzestress erfolgte die Ermittlung der letalen Temperaturen analog zur Festlegung der subletalen Temperaturen. Obwohl bei Kältestress die Zellen ab einer bestimmten Temperatur das Wachstum zwar einstellen, findet keine Abtötung der Zellen statt. Da somit kein letaler

Kältestress möglich ist, wurden die Zellen in diesem Fall einem letalen Einfrier-Auftau-Zyklus bei -20°C unterzogen.

Salzstress

Wie beim Temperaturstress wurde eine ursprüngliche Ausgangskultur geteilt und abzentrifugiert. Anstatt in verschiedenen temperierte Medien wurden die einzelnen Kulturen in 30°C vorgewärmtes mMRS mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen resuspendiert und weiter bei 30°C inkubiert. Es wurde die Salzkonzentration bestimmt, die die Wachstumsrate auf 10% der optimalen Wachstumsrate reduziert, bzw. einen signifikant letalen Effekt besitzt.

Säurestress

Die Ermittlung der Parameter für den Säurestress war identisch mit dem Verfahren zum Salzstress. Anstelle des Mediums mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen wurde in diesem Fall 30°C warmes Medium verwendet, dessen pH-Wert zuvor mit steriler HCl (0,1 N) angesäuert und eingestellt wurde. Auch hier wurden die entsprechenden letalen und subletalen Parameter ermittelt.

Hochdruckstress

Da bei der Anwendung von Hochdruck die Wachstumsrate einer Kultur aufgrund der Kompressions- und Dekompressions-Phasen nicht wie bei den anderen Stressarten durch die einfache aseptische Entnahme eines Aliquots und anschließender Messung der optischen Dichte bestimmt werden konnte, musste in diesem Fall ein anderes Vorgehen gewählt werden. Eine exponentiell wachsende Ausgangskultur wurde in 2 ml Plastikröhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert. Die Pellets wurden in vorgewärmten (30°C) mMRS Medium resuspendiert. Die Röhrchen wurden anschließend mit Silikonstopfen verschlossen. Dabei sollten Lufteinschlüsse im Röhrchen vermieden werden. Zur Sicherheit wurden die Röhrchen noch mit Parafilm umwickelt. Jeweils zwei Röhrchen wurden in einer bei 30°C temperierten und mit Öl gefüllten Druckkammer versenkt. Zur Kontrolle wurde für jedes Röhrchen eine gleich behandelte Probe in einem Wasserbad bei 30°C inkubiert. Für verschiedene Druckhöhen von 20 MPa bis 300 MPa wurde jeweils eine spezifische Wachstumsrate ermittelt. Dazu wurden bei einer bestimmten Druckhöhe nach verschiedenen Druckhaltezeiten immer die beiden Parallelansätze sowohl aus der Druckkammer, als auch aus dem Wasserbad entnommen. Durch Bestimmung der optischen Dichte erfolgte die Bestimmung der Wachstumsraten bei verschiedenen Drückhöhen. Somit konnten die subletalen und letalen Druckparameter ermittelt werden. Die Zeit bis zum Erreichen der jeweiligen Drücke (Rampe)

war dabei immer unabhängig von der eingestellten Druckhöhe und betrug konstant 90 Sekunden.

Hungerstress

Um den Einfluss verbrauchter Nährstoffe und die Anreicherung von Stoffwechselprodukten im Medium zu untersuchen, wurden Experimente mit Zellen in der stationären Wachstumsphase (Hungerstress) durchgeführt. Um einen signifikanten Effekt erkennen zu können, sollte die Zellsuspension dabei eine optische Dichte OD₅₉₀ von mindestens 1,3 besitzen.

2.2.1.5 Messung von Adaptation und Kreuzresistenz

Der Einfluss subletaler Stressbehandlungen auf die Überlebensrate während einer anschließenden Inkubation unter letalen Stressbedingungen wurde ebenfalls untersucht. Dabei wurde zunächst eine Ausgangskultur geteilt und die Zellen der einzelnen Subkulturen wurden bei niedriger Umdrehungszahl pelletiert. Danach wurden sie wie unter Punkt 2.2.1.4.2 beschrieben bei den verschiedenen subletalen Stressbedingungen inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Subkultur unter optimalen Bedingungen bei 30°C in mMRS Medium inkubiert. Nach dieser Vorbehandlung wurde allen Kulturen ein Aliquot zur Keimzahlbestimmung entnommen. Anschließend wurden die vorbehandelten Zellen und die Kontrollkulturen erneut abzentrifugiert und in Medium, welches den entsprechenden, vorher bestimmten letalen Bedingungen entspricht, resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation unter den letalen Stressbedingungen wurden wiederum die Keimzahlen bestimmt. Durch Vergleich der Keimzahlen vor und nach einer letalen Stressbehandlung konnte dann der Einfluss einer Vorinkubation unter subletalen Stressparametern im Vergleich zu einer Kontrollkultur festgestellt werden. Auf diese Weise konnte herausgefunden werden, ob eine Stressantwort auf eine bestimmte subletale Stressart die Zellen von *L. sanfranciscensis* resistenter gegenüber letalen Stress der gleichen Art (Adaptation) oder einer anderen Art (Kreuzresistenz) macht. Auch eine mögliche Zunahme der Sensitivität könnte so festgestellt werden.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Proteinrohextrakten

PBS-Puffer: 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄; 0,20 g/L KCl; 8 g/L NaCl; pH 7,4

SDS-Puffer: 100 mM Tris-HCl; 1% (w/v) SDS

Zur Herstellung von Proteinextrakten für die Analyse einer durch subletalen Stress induzierten Stressantwort mittels 2D-Gelelektrophorese wurden die einzelnen Kulturen (50 ml) nach Inkubation unter den entsprechenden Bedingungen (Stress und Kontrolle) abzentrifugiert (5 min bei 8000 x g; 30°C) und zweimal mit 50 ml PBS-Puffer (30°C) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl SDS-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß transferiert. Die Suspension wird auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte mittels Ultraschallbehandlung in drei Zyklen zu je 30 Pulsen der Zellaufschluss (HD-70, Bandelin Electronics, Berlin; Einstellung: Cycle 30%, Power 90%). Um die Proben vor Erwärmung zu schützen, wurden sie die ganze Zeit über in einem eisgekühlten Metallblock fixiert und zwischen den Zyklen Pausen von jeweils 60 s eingehalten. Danach wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (30 min bei 14000 x g; 4°C), der Überstand wurde in ein neues Kryoröhrchen transferiert und bei -76°C tiefgefroren.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.2.2.1 Coomassie Blue Protein Assay (Bradford, 1976)

Coomassie-Lösung: Bio-Rad Protein Assay Stammlösung (BioRad, München)

Proteinstandard: Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) (BioRad, München)

Die Proteinbestimmung wurde in dieser Arbeit grundsätzlich nach der Methode von Bradford (1976) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzsubstanz durchgeführt. Die Methode beruht dabei auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs in saurer Lösung von 465 nm auf 595 nm, die durch die Stabilisierung der anionischen Form des Farbreagens durch hydrophobe und ionische Interaktion nach der Zugabe von Proteinen erfolgt. Der Farbstoff reagiert dabei hauptsächlich mit Arginin-, Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninresten (Stoschek 1990). Die Stammlösung wurde 1:5 mit Aqua_{dest} verdünnt. 990 µl dieser Lösung wurden mit 10 µl der Probe bzw. einer Standardlösung versetzt und ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegenüber einem Blindwert (Lösung + Aqua_{dest}) gemessen. Bei Werten außerhalb des linearen Meßbereichs der BSA-Eichkurve mussten die Probenlösungen mit Aqua_{dest} entsprechend verdünnt werden.

2.2.2.2.2 Photometrische Bestimmung

Aufgrund der Absorption von Proteinen bei 280 nm (Stoschek 1990) kann eine schnelle und ungefähre Bestimmung der Proteinkonzentration auch nach folgender Formel photometrisch ermittelt werden:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 1,55 \times A_{280 \text{ nm}} - 0,76 \times A_{260 \text{ nm}}$$

Da Nukleinsäuren nicht nur bei 260 nm, sondern zusätzlich auch bei 280 nm stark absorbieren, muss zur genaueren Bestimmung von Zellrohextrakten, die neben Proteinen auch DNA und RNA enthalten, zusätzlich die Absorption bei 260 nm bestimmt und der Wert entsprechend korrigiert werden. Die Messung und Berechnung erfolgte bei Verwendung eines GeneQuant Gerätes (Pharmacia, Freiburg) in Kombination mit Quarzglas-Küvetten in dieser Arbeit automatisch.

2.2.2.3 Bestimmung mittels SDS-PAGE

Zur Abschätzung der Proteinkonzentration verschiedener Proteinrohextrakte für die Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, wurden die einzelnen Rohextrakte auf einem eindimensionalen SDS-Gel nach Laemmli (1970) analysiert. Auf diese Weise war es möglich zu überprüfen, ob in jeder Probe identische Gesamt-Proteinmengen vorhanden sind. Darüber hinaus diente die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in der eindimensionalen SDS-PAGE auch zur Analyse bei der heterologen Proteinexpression. In der Regel wurden hierzu die Proteinmuster vor und nach der Induktion, sowie einer Kontrolle des verwendeten Expressionsstammes ohne das heterologe Protein miteinander verglichen.

Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde die Acrylamidkonzentration im Trenngel gewählt. Je kleiner die Proteine sind, desto höher sollte die Konzentration an Acrylamid sein. Für ein Standard-Minigel nach Laemmli (1970) wurde folgende Rezeptur verwendet:

Sammelgel (4%):	<i>Aqua_{deion}</i>	6,1 ml
	1,5 M <i>Tris*HCl</i> , pH 8,8	2,5 ml
	25% (w/v) <i>SDS-Lösung</i>	40 µl
	<i>Acrylamid/Bisacrylamid (29/1)</i>	1,3 ml
	10% <i>Ammoniumpersulfat</i>	50 µl
	<i>TEMED</i>	5 µl
Trenngel (12%):	<i>Aqua_{deion}</i>	3,35 ml
	1,5 M <i>Tris*HCl</i> , pH 8,8	2,50 ml
	25% (w/v) <i>SDS-Lösung</i>	40 µl
	<i>Acrylamid/Bisacrylamid (29/1)</i>	4,0 ml
	10% <i>Ammoniumpersulfat</i>	50 µl
	<i>TEMED</i>	5 µl

Der Laufpuffer wurde als 5-faches Konzentrat mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

5×Laufpuffer:	<i>Tris*HCl</i>	9,0 g
	<i>Glycin</i>	43,2 g
	<i>SDS</i>	3,0 g
	<i>Aqua_{deion}</i>	ad 600 ml, pH 8,3

Die Proteinextrakte wurden 1:5 in Probenpuffer folgender Zusammensetzung verdünnt und für 10 min bei 95°C denaturiert:

Probenpuffer:	<i>0,5 M Tris*HCl, pH 6,8</i>	1,0 ml
	<i>87% Glycin</i>	0,92 ml
	<i>25% (w/v) SDS-Lösung</i>	0,7 ml
	<i>2-Mercaptoethanol</i>	0,4 ml
	<i>1% Bromphenolblau</i>	0,4 ml
	<i>Aqua_{deion}</i>	4,58 ml

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer „Mini-Protean III Electrophoresis Cell“ Gelkammer (BioRad, München) bei ca. 160 V, 100 mA für ca. eine Stunde. Als Größenstandard diente der „Precision Plus Protein“ Standard (BioRad, München).

Die Färbung der Gele erfolgte im Anschluss nach einer der im Kapitel 2.2.2.4 „Färben von Polyacrylamid-Gelen“ erwähnten Methoden.

2.2.2.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die hochauflösende 2-D Gelelektrophorese ist eine effektive Methode zur Analyse einzelner Proteine innerhalb komplexer Proteingemische. Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension mittels immobilisierter pH-Gradienten-Gele (IPG-Dalt, 18cm) erfolgte nach den Methoden von Görg *et al.* (1995, 1999, 2000). Dabei wurden die Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (siehe 2.2.2.3.1) aufgetrennt. Nach der Äquilibration (siehe 2.2.2.3.2) erfolgte in der zweiten Dimension die Trennung der Proteine nach ihrer Größe (siehe 2.2.2.3.3). Es können unterschiedliche Bereiche des Proteoms (basisch-sauer; klein-groß) analysiert werden. Dazu stehen für die isoelektrischen Fokussierung Polyacrylamidstreifen mit verschiedenen immobilisierten pH-Gradienten zur Verfügung. Proteine wandern in der Gelmatrix aufgrund des elektrischen Felds genau bis zu dem Punkt im pH-Gradienten, an dem ihr isoelektrischer Punkt (*pI*) dem pH-Wert des Gels entspricht. In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung in Abhängigkeit des Vernetzungsgrades des Polyacrylamidgels, welcher direkt von der Konzentration an Acrylamid im Gel abhängt.

2.2.2.3.1 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Quell-Lösung: 6 M Harnstoff
 2 M Thioharnstoff
 1% CHAPS
 0,4% DTT
 0,5% Pharmalyte 3-10

Inertes Öl: PlusOne Immobiline DryStrip Cover Fluid

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden IPG-Streifen (Amersham Biosciences, Freiburg) mit unterschiedlichen pH-Gradienten verwendet. Pro Versuchsreihe wurden 10 identische IPG-Streifen eingesetzt. Die getrockneten Gele wurden zum Rehydrieren zunächst im Immobiline DryStrip Reswelling Tray über Nacht mit der Gelseite nach unten auf 350 µl vorgelegte Quelllösung aufgelegt, anschließend mit 1,5 ml inertem Öl überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die gequollenen Streifen wurden mit Aqua_{bidest} gespült und auf eine auf 20°C temperierte Kühlplatte aufgelegt. Danach wurden die Probencups in der Nähe der Anode wie vom Hersteller beschrieben angebracht. Die IPG-Streifen inklusive der Probencups wurden abschließend mit Öl überschichtet.

Harnstoffpuffer: 7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% (w/v) CHAPS; 2% (w/v) DTT; 2% (v/v) Pharmalyte 3-10, pH=9,5

Die wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben hergestellten Proteinkonzentrate wurden vor der isoelektrischen Fokussierung 1:4 mit Harnstoffpuffer verdünnt, um die SDS-Konzentration auf maximal 0,25% zu verdünnen. Danach wurden die Proben in die Probencups unter das Öl pipettiert. Durch Anlegen des elektrischen Felds erfolgte der Start. Die Einstellung der Parameter des elektrischen Felds erfolgte in Abhängigkeit vom verwendeten pH-Gradienten bzw. von der Art der Untersuchung. Je nachdem ob es sich um ein analytisches Experiment mit geringer Proteinkonzentration oder ein präparatives Experiment mit höheren Konzentrationen handelte, mussten unterschiedliche Spannungen, Stromstärken und Fokussierzeiten gewählt werden (siehe Tabelle 2.6). Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen bei -80°C eingefroren oder direkt für die anschließenden Analysenschritte in der zweiten Dimension verwendet.

Tabelle 2.6 Parameter für die isoelektrische Fokussierung (IEF) der IPG-Streifen (18cm)

Analytische IEF	Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit
pH 3-10	150 V	0,5 A	50 W	1 h
	300 V	0,5 A	50 W	1 h
	600 V	0,5 A	50 W	1 h
	1.500 V	0,5 A	50 W	} 32.000 Vh
	3.500 V	0,5 A	50 W	
pH 4-7	150 V	0,5 A	50 W	1 h
	300 V	0,5 A	50 W	2 h
	600 V	0,5 A	50 W	2 h
	1.500 V	0,5 A	50 W	} 60.000 Vh
	3.500 V	0,5 A	50 W	
pH 5,5-6,7	150 V	0,5 A	50 W	1 h
	300 V	0,5 A	50 W	3 h
	600 V	0,5 A	50 W	1h
	1.500 V	0,5 A	50 W	} 84.000 Vh
	3.500 V	0,5 A	50 W	
Präparative IEF				
pH 4-7	50 V	0,5 A	50 W	10 h
	300 V	0,5 A	50 W	2 h
	600V	0,5 A	50 W	2 h
	1500 V	0,5 A	50 W	4 h
	3.500 V	0,5 A	50 W	18 h

2.2.2.3.2 Äquilibration

Nach der IEF bzw. vor der Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht müssen die Proteine zur Kaschierung ihrer Eigenladung unter denaturierenden Bedingungen mit negativer Ladung in Form von SDS-Molekülen umgeben werden. Die Streifen wurden dazu 15 min in einer denaturierenden Lösung mit Dithiothreitol (DTT) unter leichtem Schwenken inkubiert (Lösung 1). Danach erfolgte eine Behandlung für 15 min in einer Iodacetamid-haltigen Lösung, die eine Wiederherstellung von Cysteinbindungen verhindern sollte (Lösung 2).

Äquilibrationspuffer:

- 6 M Harnstoff
- 30 % Glycerol
- 2 % SDS
- 50 mM Tris*HCl, pH 8,8

Äquilibrationlösung 1:

Äquilibrationspuffer	100 ml
DTT	1 g

Äquilibrationlösung 2:

Äquilibrationspuffer	100 ml
Iodacetamid	4 g

2.2.2.3 Auftrennung nach Molekulargewicht (zweite Dimension)

Die benötigten 1,5 mm dicken Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe eines Gelgießstands „Hoefer Dalt Gel Caster“ (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers und in Abhängigkeit der Acrylamidkonzentration selbst hergestellt. Um Gellöung zu sparen, wurde zum Ausfüllen von Totvolumina im Gelgießstand eine Glycerinlösung verwendet. Während der Polymerisation für mindestens 12 h wurden die Gele mit Butanol überschichtet.

Glycerinlösung:	<i>Glycerin 87%</i>	<i>87 ml</i>
	<i>Bromphenolblau</i>	<i>1 ml</i>
	<i>Aqua_{deion}</i>	<i>62 ml</i>
Pufferlösung:	<i>Tris</i>	<i>90,83 g</i>
	<i>SDS</i>	<i>2,00 g</i>
	<i>In 300 ml Aqua_{bideist} lösen, pH 8,6 (HCl), filtrieren und auf 500 ml auffüllen.</i>	
Puffer gesättigtes Butanol:	<i>20 ml Puffer mit 3 ml 2-Butanol ausschütteln und 2-Butanol abdekantieren</i>	
Gellösung (12%):	<i>Acrylamidlösung (29/1)</i>	<i>389,5 ml</i>
	<i>Puffer</i>	<i>250 ml</i>
	<i>Aqua_{deion}</i>	<i>315 ml</i>
	<i>Glycerin</i>	<i>50,0 g</i>
	<i>TEMED</i>	<i>55 µl</i>
	<i>Ammoniumpersulfat (10%)</i>	<i>7,0 ml</i>

Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden zusammen mit einem auf einem Filterpapier aufgetragenen Protein-Größenstandard („Precision Plus Protein“, BioRad) luftblasenfrei auf je eines der Polyacrylamidgele der Größe 20 × 23 cm gelegt und mit Bromphenolblau versetzter Agarose fixiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer Vertikalapparatur „Hoefer DALT multiple Electrophoresis Tank“ (Amersham Biosciences, Freiburg). Der Tankpuffer wurde dabei ständig auf 15°C temperiert. Bis zum Einlaufen der Proteine in das Gel wurden für eine Stunde 80 mA bei 200 V angelegt. Danach wurde die Stromstärke auf 165 mA bei 200 V erhöht. Die Trennung lief solange bis die Bromphenolblau-Front aus dem Gel austrat (ca. 16 h).

Tankpuffer:	<i>SDS</i>	<i>19,9 g</i>
	<i>Glycin</i>	<i>299,6 g</i>
	<i>Tris</i>	<i>58 g</i>
	<i>Aqua_{deion}</i>	<i>19,9 l</i>
Agaroselösung:	<i>Agarose</i>	<i>250 mg</i>
	<i>Tankpuffer</i>	<i>49 ml</i>
	<i>Bromphenolblau</i>	<i>1 ml</i>

Nach dem Lauf wurden die Gekassetten geöffnet und die Gele je nach Verwendungszweck den jeweiligen Färbungen unterzogen.

2.2.2.4 Färbung und Analyse von Polyacrylamidgelen

Je nach Verwendungszweck wurden die Proteine in den Polyacrylamidgelen mittels verschiedener Färbemethoden sichtbar gemacht.

2.2.2.4.1 Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987 modifiziert)

Die Silberfärbung ist eine der sensitivsten Methode zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Nachweis von Proteinspots bis zu einer Menge von 1ng) und eignet sich daher besonders gut für die Proteomanalyse komplexer Proteingemische mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese. Aufgrund der Abhängigkeit der Farbintensität von der Dauer der Entwicklung ist bei dieser Methode eine gewisse Erfahrung nötig, um eine „Überfärbung“ der Gele zu vermeiden. Die quantitative Analyse erfolgte in dieser Arbeit daher nicht nur über die Spotintensität, sondern auch über die Spotfläche und wurde immer auf ein Referenzgel (Kontrolle) des gleichen Experiments bezogen. Ein Nachteil der Silberfärbung ist, dass sie nur für analytische, nicht aber für präparative Zwecke geeignet ist. Die Proteine können nach der Silberfärbung nicht mehr für eine klassische Proteinsequenzierung verwendet werden.

Für die Färbung ist zu beachten, dass nur frisch zubereitete Lösungen verwendet werden. Als Grundlage diente in allen Fällen Aqua_{bidest.}

Fixierlösung:	40% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)
Thiosulfatreagenz:	0,02% (w/v) Natriumthiosulfat
Silbernitratreagenz:	0,2% (w/v) Silbernitrat (Merck, Darmstadt) 0,02% (v/v) Formaldehyd (37%)
Entwickler:	3% (w/v) Natriumcarbonat 0,05% (v/v) Formaldehyd (37%) 0,0005% (w/v) Natriumthiosulfat
Stopreagenz:	0,5% (w/v) Glycin
Schrumpflösung:	30% Ethanol 12% (w/v) Glycerin

Entscheidend ist eine korrekte Entwicklungszeit. Dieser Schritt sollte ständig optisch verfolgt werden, um die Reaktion rechtzeitig stoppen zu können. Ein rasches Arbeiten vor allem bei

den Wasch- und Stop-Schritten ist ebenso unerlässlich. Folgendes Protokoll wurde für die Färbung verwendet.

<i>Fixieren:</i>	<i>3 Stunden</i>
<i>Waschen:</i>	<i>3 × 20 Minuten</i>
<i>Sensibilisieren:</i>	<i>1 Minute (Thiosulfat)</i>
<i>Waschen:</i>	<i>3 × 20 Sekunden</i>
<i>Silbern:</i>	<i>20 Minuten</i>
<i>Waschen:</i>	<i>2 × 20 Sekunden</i>
<i>Entwickeln:</i>	<i>ca. 5 Minuten (Prozess genau verfolgen!)</i>
<i>Waschen:</i>	<i>1 × 20 Sekunden</i>
<i>Stopreagenz:</i>	<i>5 Minuten</i>
<i>Waschen:</i>	<i>3 × 10 Minuten</i>
<i>Schrumpfen:</i>	<i>über Nacht</i>

Die Gele wurden eingescannt und digitalisiert. Zur weiteren Konservierung wurden sie danach feucht in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Gele durchliefen zunächst eine visuelle Qualitätskontrolle. Danach wurden die Daten vergleichbarer Gele mittels der Software Image Master II (Amersham Biosciences, Freiburg) analysiert und die einzelnen Proteinspots quantifiziert.

2.2.2.4.2 Färbung mit Roti-Blue®

<i>Roti-Blue Gebrauchslösung:</i>	<i>60 ml Aqua_{bidest}</i>
	<i>20 ml Methanol</i>
	<i>20 ml Roti-Blue 5x-Konzentrat</i>

Die Gele, aus denen Proteine für präparative Zwecke isoliert werden sollten, wurden über Nacht in einer, den Herstellangaben entsprechend verdünnten Lösung aus Roti-Blue (Carl-Roth) bei Raumtemperatur gefärbt. Eine Entfärbung war bei diesem Verfahren nicht nötig, so dass das Gel nur kurz mit Aqua_{bidest} abgewaschen werden musste. Da im Anschluss an diese Färbung im Allgemeinen eine Proteinanalyse durchgeführt wird, ist penibel auf eine saubere Arbeitsweise und reine Materialien und Geräte zu achten. Nur so können störende Kontaminationen mit Keratin und Proteasen verhindert werden.

2.2.2.4.3 Färbung mit Coomassie-Blau

<i>Coomassie-Färbelösung:</i>	<i>0,25 g/l Coomassie Brilliant Blue R250</i>
	<i>10% (v/v) Essigsäure</i>
	<i>50% (v/v) Ethanol</i>
<i>Coomassie-Entfärbelösung:</i>	<i>10% (v/v) Essigsäure</i>
	<i>50% (v/v) Ethanol in Aqua_{bidest}</i>

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad) färbt unspezifisch Proteine blau an. Polyacrylamidgele wurden ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung unter leichter Erwärmung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis der Hintergrund wieder entfärbt und die Proteine gut zu erkennen waren. Im Anschluss wurden die Gele eingescannt und digitalisiert.

2.2.2.5 Proteinsequenzierung

Da das Genom von *L. sanfranciscensis* zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht vollständig bekannt war, wurde für die Identifizierung eines Proteins die Aminosäuresequenz eines internen Peptidfragments benötigt. Die Bestimmung der Massespektren tryptisch verdauter Proteine mittels Maldi-TOF MS wurde in dieser Arbeit zwar durchgeführt, eine Identifizierung der Proteine war aufgrund der fehlenden Genominformationen für *L. sanfranciscensis* allerdings nicht möglich. Die Arbeiten zur Proteinsequenzierung wurden daher an externe Labors vergeben.

Die internen Sequenzierungen einiger elektrophoretisch getrennter Proteinspots wurden von der Firma TopLab (München) durchgeführt. Dazu wurde eine enzymatische Spaltung der aus dem Gel isolierten Proteine mit den Proteasen Trypsin, Lys-C oder Asp-N durchgeführt. Die einzelnen Peptide wurden über Kapillar-HPLC-Säule (Vydac RP18, LC Packings) getrennt. Nach Prüfung der gesammelten Fraktionen mittels MALDI-TOF MS wurden für die Sequenzierung geeignete Peptide mittels *N*-terminaler Sequenzierung nach der klassischen Methode des Edman-Abbaus mit Modifikationen von Hunkapiller *et al.* (1983) analysiert. Dazu wurde ein Aminosäuresequencer Procise 492 mit online PTH Analyser 140 C und UV Detektor 785 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

Die meisten Proteinspots wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Lars Israel vom Zentrallabor für Proteinanalytik der Medizinischen Fakultät der LMU München analysiert. Einzelne Peptide der zuvor tryptisch verdauten Proteine wurden dazu mittels HPLC aufgetrennt und danach in einem QSTAR[®]XL Massenspektrometer (Applied Biosystems, Weiterstadt) mittels nano-ESI-LC-MS/MS analysiert. Die Auswertung der resultierenden Spektren mit der Software Mascot[™] (Matrix Science) ergab pro Proteinspot mehrere Datenbanktreffer mit verschiedenen hohen Wahrscheinlichkeiten. Bei der Auswahl der Ergebnisse wurde neben der Wahrscheinlichkeit auch auf die Qualität der einzelnen Spektren geachtet, sowie die Übereinstimmung von molekularem Gewicht und isoelektrischem Punkt zwischen den Proteinen auf den 2D-Gelen und den homologen Proteinen aus den Datenbanken berücksichtigt.

2.2.2.6 Nachweis von α -Galactosidase

Der Nachweis von α -Galactosidase wurde analog dem β -Galactosidase Test aus *E. coli* durchgeführt (Miller 1972).

Der qualitative Nachweis erfolgte durch Zugabe von X- α -Gal in die Agarplatten. Bakterien, die α -Galactosidase Aktivität besitzen, konnten an einer Blaufärbung detektiert werden (Blau-Weiss-Screening).

Der quantitative Nachweis erfolgte leicht abgewandelt in Anlehnung an Miller (1972) mit dem chromogenen Substrat α -PNPG. Die optimalen Versuchsbedingungen werden in Kapitel 3.6.1 beschrieben. 10 ml einer Kultur wurden mittels Zentrifugation geerntet und zweimal mit kaltem McIlvaine Puffer (pH 5,3) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml kaltem Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin auf Eis für insgesamt 30 s mittels Ultraschall (UW2070 Ultrasonication Processor, Bandelin) aufgeschlossen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm wurden zu 50 μ l Lösung des Rohextraktes 25 μ l α -PNPG (4 mg/ml in McIlvaine Puffer) hinzugegeben und kurz gevortext. Die Mischung wurde für eine festgelegte Zeit oder bis zur Entwicklung einer leichten Gelbfärbung bei 32°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 925 μ l Na₂CO₃ gestoppt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zentrifugiert und die optische Dichte des klaren Überstands bei 420 nm und 550 nm bestimmt. Die Aktivität wurde gemäß unten stehender Formel berechnet und in Miller Units (MU) dargestellt:

$$\text{Aktivität in Miller Units} = [\text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})] / \text{OD}_{600} \times t_{[\text{min}]} \times V_{[\text{ml}]}$$

2.2.2.7 Überexpression rekombinanter Proteine

PBS-Puffer:

1,44 g/l Na ₂ HPO ₄	
0,24 g/l KH ₂ PO ₄	
0,20 g/l KCl	
8,00 g/l NaCl,	pH 7,4

In dieser Arbeit wurde die Expression heterologer Proteine in *E. coli* je nach Art des verwendeten Expressionssystems entweder mit Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) für den *lac*-Promotor oder mit Arabinose für den *araBAD*-Promotor induziert. Dazu wurde aus einer entsprechenden Übernachtskultur eine frische Tageskultur angeimpft (0,1%) und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 bis 0,5 bei optimalen Bedingungen und unter starkem Schütteln inkubiert. Nach Induktion wurde die Kultur weiter inkubiert und schließlich durch schnelles Abkühlen auf Eis

und anschließende Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden in PBS-Puffer gewaschen, anschließend darin resuspendiert und mittels mehrerer Zyklen (je 30 s) unter Ultraschall aufgeschlossen (Cycle 30%, Power 90%; HD-70 Ultrasonication Processor, Bandelin). Die Entstehung von Wärme musste dabei so gut wie möglich vermieden werden. Aus diesem Grund erfolgte der Aufschluss auf Eis mit mehreren Pausen zur Abkühlung. Danach wurden durch Zentrifugation für 45 min bei 4°C und 14000 g feste Zellreste und unlösliche Partikel abgetrennt. Der Überstand mit dem gelösten Proteinanteil wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Der für eine erfolgreiche Proteinexpression optimale Zeitpunkt für die Induktion (entspricht der Wachstumsphase der Kultur), sowie die optimalen Inkubationsbedingungen (Temperatur, Sauerstoffeintrag), die optimale Konzentration des Induktors und die optimale Inkubationsdauer nach der Induktion variieren zum Teil sehr stark und hängen sowohl vom verwendeten Expressionssystem (Expressionsvektor und -stamm), als auch vom jeweiligen heterologen Protein ab. Aus diesem Grund wurden in allen Fällen Vorversuche durchgeführt, um eine optimale Expressionsrate zu erzielen und eine Bildung von so genannten „Inclusion Bodies“ zu verhindern.

2.2.2.8 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Bindepuffer A, pH 8.0

*50 mM K₂HPO₄ x 3H₂O
10% Glycerin
100 mM NaCl
0.05% n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM)
10 mM Imidazol*

Elutionspuffer B, pH 7.0

*50 mM K₂HPO₄ x 3H₂O
10% Glycerin
100 mM NaCl
0.05% n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM)
300 mM Imidazol*

Die Aufreinigung von rekombinanten und mit einem Polyhistidin-Ende (His-tag) modifizierten Proteinen erfolgte mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Ni²⁺ als Bindungspartner. Dazu wurde die FPLC Anlage „Biologic HR Chromatography System“ (BioRad Laboratories, Hercules, USA) in Kombination mit 5 ml „HiTrap Chelating HP“ Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) und einer 5 ml Injektions-Schleife verwendet.

Zum Vorbereiten und Beladen des Säulenmaterials mit Nickel-Ionen wurde die Säule mit einer 0.1 M Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat Lösung (Merck, Darmstadt) gespült.

Vorbereitung:	Schritt	Medium	Flussrate	Zeit
	Waschen	<i>Aqua_{bidest}</i>	5 ml/min	1,5 min
	Beladen	0.1 M NiSO ₄	5 ml/min	1,5 min
	Waschen	<i>Aqua_{bidest}</i>	5 ml/min	1,5 min

Vor der eigentlichen Chromatographie musste die Säule mit Bindepuffer A äquilibriert werden. Danach konnte der durch Zentrifugation von Partikel befreite Proteinextrakt über die Säule gegeben werden. Anschließend wurde mit Bindepuffer A gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Proteine mit His-tag binden spezifisch an die Ni²⁺ beladene Säule und werden erst durch eine erhöhte Konzentration an Imidazol im Elutionspuffer B verdrängt. Die Elution mit einem linear steigenden Gradienten bewirkt, dass jedes spezifische Protein bei einer bestimmten Konzentration an Imidazol von der Säule verdrängt wird und somit in einzelnen Fraktionen gesammelt werden kann. Die verschiedenen Fraktionen können im Anschluss daran mittels SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.2.3) analysiert werden.

Chromatographie:	Schritt	Medium	Flussrate	Zeit
	Äquilibrieren	Puffer A	5 ml/min	10 min
	Probeninjektion	Puffer A	2 ml/min	4 min
	Waschen	Puffer A	4 ml/min	9 min
	Eluieren	Puffer A 100% => 0%	2 ml/min	5 min
	(linearer Gradient)	Puffer B 0% => 100%		
	Waschen	Puffer B	2 ml/min	5 min
	Äquilibrieren	Puffer A 0% => 100%	5 ml/min	10 min
	(linearer Gradient)	Puffer B 100% => 0%		
		Puffer A	2 ml/min	5 min

Am Ende wurden die Säulen für 10 min mit *Aqua_{bidest}* gespült (5 ml/min) und anschließend mit Ethanol 20% beschickt und bei Raumtemperatur gelagert. Auf diese Weise soll ein Aussalzen verhindert werden.

Die Aufreinigung von Proteinen mit einem Glutathion-S-Transferase-tag erfolgte mit speziellen Säulen nach vergleichbarem Prinzip gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

2.2.2.9 Nachweis bestimmter Enzymaktivitäten

Nachweis von Ribokinase-Aktivität

Für den semi-quantitativen Nachweis der Ribokinase-Aktivität wurde ein pH-Wert abhängiger photometrischer Nachweis in Wasser gewählt (modifiziert nach Andersson 2004). Da bei der Reaktion von Ribose mit ATP zu Ribose-5-P und ADP ein H⁺ freigesetzt wird, findet eine

Ansäuerung des Mediums statt. Durch Änderung der Farbe des pH-Indikators Phenolrot und somit durch eine Absorptionsänderung bei 448 nm kann die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Zeit gemessen werden. Nach Zusammensetzung des Reaktionspuffers (140 mM KCl, 10 mM Mg₂Cl, 5 mM ATP, Phenolrot) und Zugabe verschiedener Konzentrationen der Enzymlösung wurde direkt in der Reaktionsküvette mit NaOH der pH-Wert auf ca. 7,6 eingestellt. Die eigentliche Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe der Ribose (5 mM) als Substrat gestartet.

Zusätzlich wurde ein qualitativer, chromatographischer Nachweis mittels HPLC-Analyse durchgeführt, der die Phosphorylierung von Ribose zu Ribose-5-P nachweisen sollte (siehe „Nachweis von Ribose-5-P-Isomerase-Aktivität“).

Nachweis von Ribose-5-P-Isomerase-Aktivität

Da für die Messung der Ribose-5-P-Isomerase (Rpi) Aktivität keine geeignete quantitative Nachweismethode zur Verfügung stand, wurde hier nur der qualitative, chromatographische Nachweis mittels HPLC-Analyse durchgeführt. Dabei sollte versucht werden neben der Ribokinase-Aktivität die weitere Isomerisierung der Ribose-5-P zu Ribulose-5-P durch die Ribose-5-P-Isomerase nachzuweisen. Die einzelnen Zucker (Ribose, Ribose-5-P und Ribulose-5-P) wurden dazu als Standardsubstanzen gekauft und auf einer AminoPac PA10 Säule (2 x 250 mm) (Dionex, Sunnyvale, USA) aufgetrennt. Folgende Eluierlösungen wurden dazu verwendet: Deionisiertes Wasser (A), NaOH 250 mM (B) und Natriumacetat 1 M (C). Die Flussrate betrug 0,25 ml/min und die Säulentemperatur lag bei 30°C. Folgender Gradient wurde zur Trennung der Zucker eingestellt: 0 und 16 min: 80% A und 20% C; 32 und 40 min: 80% B, 20% C. Zum Entgasen der Proben wurde Helium verwendet. Zur Detektion kam ein RI-Detektor (Gynkotek, Germering) zum Einsatz. Vorversuche wurden mit einer reinen, 1:1000 verdünnten Riboselösung (100 mM Ausgangskonzentration) durchgeführt. Diese Substanz ergab dabei einen eindeutigen Peak nach ca. 11 min (vgl. Kapitel 3.5.1). Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz der benötigten Puffersubstanzen (KCl, Mg₂Cl, ATP), sowie des inaktivierten Enzyms zu keiner signifikanten Veränderung der Elutionszeit führt (vgl. Kapitel 3.5.1). Die anderen Zucker- und Probenlösungen wurden analog analysiert.

Nachweis der ClpL-Protease-Aktivität

Zum Nachweis der ClpL Protease (Caseinolytic protease) Aktivität sollte gezeigt werden, dass Casein in Gegenwart von ATP (10 mM) und des gereinigten Enzyms (verschiedene Konzentrationen) in PBS-Puffer (siehe 2.2.2.1) abgebaut werden kann. Dazu wurden zwei

Ansätze mit intaktem, bzw. als Negativkontrolle mit hitzedenaturiertem (10 min 85°C) Protein hergestellt. Nach vier Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze in einem SDS-Gel aufgetrennt und analysiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Milchsäurebakterien

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer):	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	100 mg/ml Lysozym (Roche, Mannheim) in Tris-EDTA-Puffer, pH 8,0
SDS-Lösung:	25% (w/v) Natriumdodecylsulfat (nicht autoklaviert)
NaCl-Lösung:	5 M NaCl
Tris-Puffer:	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5
Standard-Saline-Citrat (1×SSC):	0,150 M NaCl 0,015 M Trinatriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0
Natriumacetat-EDTA-Lösung:	3 M Natriumacetat 0,01 M EDTA, pH 7,0
Ribonuklease A-Lösung:	0,5 mg/ml RNase A (Merck, Darmstadt) in 2×SSC, pH 7,5
Proteinase K-Lösung:	10 mg/ml Proteinase K (Roche, Mannheim)

1000 ml einer exponentiell wachsenden Kultur wurden geerntet (10 min bei 5000g, 4°C). Die Zellen wurden anschließend zweimal in Tris-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in ca. 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Lysozym-Lösung pro 10 ml Zellsuspension wurde der Ansatz für ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte zur Vervollständigung der Lyse die Zugabe einer SDS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 2%. Der Ansatz wurde zur Inaktivierung von DNasen und zur weiteren Lyse für 10 min auf 65°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Durch Zugabe der 5 M NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 M NaCl wurden enthaltene Proteine gefällt. Nach Inkubation für 60 min auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (30 min, 5000g). Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß transferiert, mit 500 µl RNase A Lösung versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden durch Zugabe von 1 ml Proteinase K Lösung und Inkubation für 60 bis 120 min bei 55°C restliche Proteine abgebaut. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus gleichen Teilen Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt und nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur zur Phasentrennung 20 min bei 5000g zentrifugiert. Die

obere, wässrige Phase wurde einer weiteren Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) unterzogen. Im Anschluss daran wurde die DNA in der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/9 Volumenanteil der Natriumacetat-EDTA-Lösung und dem 2,5 fache Volumen an Ethanol (100%) durch vorsichtiges Schwenken gefällt. Die DNA konnte dann mit einem Glasstab aufgewickelt werden. Durch leichtes Schwenken in 75% Ethanol erfolgte eine Entsalzung und nach Trocknung konnte die DNA schließlich in LiChrosolv[®]-Wasser aufgenommen werden.

2.2.3.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem E.Z.N.A Plasmid Mini Kit (Peqlab, Erlangen) oder dem Qiagen Plasmid Mini oder Midi Kit (Qiagen, Hilden). Dabei wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren. Zur Isolierung von Plasmid DNA aus Laktobacillen wurde zum Resuspendierungspuffer zusätzlich eine Spatelspitze Lysozym gegeben und der Ansatz für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde im Protokoll mit Zugabe des SDS-Puffers fortgefahren.

2.2.3.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus Bakterien

Bei Arbeiten mit bakterieller RNA ist auf größte Sorgfalt zu achten, um eine Kontamination mit allgegenwertigen RNasen zu vermeiden. Alle Geräte wurden mehrfach autoklaviert, alle verwendeten Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNasen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser (0,1%) hergestellt (12 h bei 30°C inkubieren und danach autoklavieren). Zusätzlich wurde bei der Isolierung von RNA zum Schutz vor RNasen „Bacteria Reagent RNaprotect^{TMcc}“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Isolierung selbst erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®] Mini oder Midi Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Bei der Isolierung von RNA aus *L. sanfranciscensis* wurde bei Verwendung des RNeasy[®] Mini-Kits 0,5 ml einer Kultur mit OD_{600nm} von ca. 0,4 eingesetzt. Auch hier wurden wie bei der Isolierung von DNA zur Unterstützung der Lyse die Zellen in 100 µl TE-Puffer mit 10 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 10 min bei 37°C inkubiert.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung und Analyse von DNA und RNA Lösungen

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA kann spektralphotometrisch oder gelelektrophoretisch untersucht werden.

Die photometrische Bestimmung wurde im GeneQuant (Pharmacia, Freiburg) durch Messung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gegen die jeweilige Referenz (Wasser bzw. Puffer ohne RNA bzw. DNA) durchgeführt. Bei doppel- bzw. einzelsträngigen Nukleinsäuren entspricht

eine OD_{260nm} von 1 einer Konzentration von 50 bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$. Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Polysacchariden werden bei 280 nm bzw. bei 230 nm nachgewiesen. Gereinigte Nukleinsäurelösungen sollte ein Absorptionsverhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} von 1,8 bis 2,2 besitzen.

Durch elektrophoretische Auftrennung von RNA bzw. DNA im Agarosegel und anschließender Färbung im Ethidiumbromid-Bad kann mit Hilfe einer definierten Menge eines Größenstandards (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, Hybaid-AGS, Heidelberg) die ungefähre Konzentration der Probe bestimmt werden. Darüber hinaus können Verunreinigungen durch unterschiedlich große DNA und RNA Fragmente detektiert werden.

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer pH 8,2 (20-fach konzentriert)

890 mM Tris (Base)
890 mM Borsäure
20 mM EDTA

TAE-Puffer pH 8,2 (50-fach konzentriert)

2 M Tris (Base)
1 M Essigsäure
0,1 M EDTA

Probenauftragspuffer

0,25% (w/v) Bromphenolblau
20% (w/v) Saccharose

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und Reinigung von DNA und RNA verwendet. Agarose wurde dazu in 0,5 x TBE-Puffer (analytisch) bzw. in 1 x TAE-Puffer (präparativ) bis zum vollständigen Lösen gekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C in den Gelträger gegossen und ein Probenauftragskamm eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden Nukleinsäuren wurden Gele mit einer Konzentration von 0,8 bis 1,6% Agarose hergestellt. Der jeweils verwendete Puffer wurde auch für die eigentliche Elektrophorese benutzt. Je nach Größe des Gels wurde dazu eine Spannung von 90 V (14 x 11 cm) bzw. 180 V (26 x 20 cm) angelegt. Die zu trennenden Lösungen wurden vor dem Start mit ca. 5% Probenpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert.

Zum Färben wurden die Gele für ca. 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 $\mu\text{g/ml}$; Gibco BRL) inkubiert. Durch Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs werden Nukleinsäuren auf einem Transilluminator unter UV-Licht bei 320 nm sichtbar. Analytische Gele wurden fotografiert und in digitalisierter Form gespeichert. Bei präparativen Gelen wurden die entsprechenden Fragmente ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert und in einem geeigneten Volumen an Wasser eluiert.

2.2.3.6 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

Zur Entsalzung, Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA wurde der Ansatz mit 0,11 Volumen Natriumacetat vermischt und im 2,56-fachen Volumen 100% Ethanol gefällt. Plasmide und DNA-Fragmente wurden für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert, abzentrifugiert (1 h bei 12000 g; 4°C), zweimal mit Ethanol 75% gewaschen, getrocknet und in LiChrosolv® Wasser resuspendiert.

Alternativ zur Fällung wurde vor allem bei PCR-Produkten, Restriktions- und Ligationsansätzen vor der Sequenzierung oder Weiterverarbeitung eine Aufreinigung mittels PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Prinzip beruht dabei auf der Bindung der DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern. Nachdem die Verunreinigungen ausgewaschen sind, kann die gebundene DNA in der gewünschten Menge Wasser eluiert werden.

2.2.3.7 DNA-Modifikationen

Restriktion

Typ II Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen 4 bis 8 bp langen Erkennungsstellen und erzeugen dabei überhängende („sticky ends“) oder stumpfe („blunt ends“) Enden. Die Restriktionen wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers bei optimalen Temperaturen und optimalen Pufferbedingungen in einem Volumen von 20 bis 100 µl angesetzt.

Dephosphorylierung

Um die Effizienz der Ligation zwischen Vektor und Insert zu erhöhen, wird bei Plasmiden, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurden, das 5'-Ende mittels SAP (shrimp alkaline phosphatase, MBI Fermentas) dephosphoryliert. Eine Religation des Vektors wird so verhindert. Dazu wurden 100 µl des Restriktionsverdau mit ca. 5 Units SAP für ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C wurde der Ansatz gereinigt.

Ligation

In der Regel werden Liagtionen in einem Volumen von 10 bis 20 µl und einem ca. dreifach molaren Überschuss an Insert-DNA angesetzt. Pro 10 µl wurde 1 U T4-DNA-Ligase, 1 µl des entsprechenden 10 x Puffers inklusive der jeweiligen Mengen an ATP und DTT (1 bis 10 mM) (New England Biolabs; MBI Fermentas) verwendet. Die Ligation wurde über

Nacht in einem schmelzenden Eisbad inkubiert (Gradient von ca. 4°C bis 20°C). Nach Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C wird erfolgte eine Aufreinigung des Ansatzes.

2.2.3.8 Transformation von Bakterien

2.2.3.8.1 Herstellen kompetenter Zellen

In Abhängigkeit des Verfahrens für die Transformation (Elektroporation für *L. sanfranciscensis* und *E. coli* oder Hitzeschock für *E. coli*) mussten die Zellen unterschiedlich vorbereitet werden.

In allen Fällen war darauf zu achten, dass die Zellen während der gesamten Aufbereitung gekühlt werden (4°C) und auch nur mit vorgekühlten Lösungen behandelt werden. Aus einer frischen Übernachtskultur wurde eine Flüssigkultur 0,5%-ig angeimpft und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ 0,4 bis 0,5 unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert (für *L. sanfranciscensis* unter anaeroben Bedingungen in mMRS-Medium, für *E. coli* unter aeroben Bedingungen in LB-Medium). Die Zellen wurden nach der Inkubation möglichst schnell auf Eis abgekühlt und anschließend mittels Zentrifugation geerntet. Die anschließenden Waschschrte variierten je nach Transformationsmethode. Für die Elektroporation wurden die Zellen zweimal im gleichen und einmal im halben Volumen Aqua_{bidest} gewaschen und schließlich in einer geeigneten Menge 30% (v/v) Glycerin resuspendiert. Für die Methode mit Hitzeschock wurden die Zellen anstelle mit Wasser mit 100 mM MgCl₂ gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 mM CaCl₂ aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurden die Zellen in 50 mM CaCl₂ und 30% (v/v) Glycerin resuspendiert. In beiden Fällen wurden die Zellen entweder frisch zur Transformation verwendet oder Aliquots zu je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -76°C gelagert.

2.2.3.8.2 Elektroporation

100 µl der Zellen wurden in einer vorgekühlten Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand; BioRad, München) mit 0,5 bis 5 µl der Plasmidlösung bzw. des Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation mit dem „Gene-Pulser“ und dem „Pulse-Controller“ (BioRad, München). Für *E. coli* wurden folgende Parameter gewählt: 200 Ω, 2,5 kV, 25 µF. Für *L. sanfranciscensis* waren die Einstellungen wie folgt: 1000 Ω, 1,2 kV, 25 µF. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml SOC-Medium (für *E. coli*) bzw. mMRS-Medium (für *L. sanfranciscensis*) zu den Zellen transferiert und der Ansatz zur phänotypischen Expression bei optimalen Bedingungen

inkubiert (ca. 1h für *E. coli* bzw. 3h für *L. sanfranciscensis*). Danach wurden je 100 µl auf feste Nährmedien mit den entsprechenden Zusätzen an Antibiotika ausplattiert, die Platten kurz getrocknet und anschließend unter optimalen Bedingungen inkubiert. Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, konnten auf diesen Nährmedien nachgewiesen werden.

2.2.3.8.3 Transformation mit Hitzeschock

100 µl der *E. coli* Zellen wurden mit 0,5 bis 5 µl der Plasmidlösung bzw. des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 90 s in einem Wasserbad mit 42°C erwärmt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C zur phänotypischen Expression aerob inkubiert. Schließlich wurden je 100 µl auf LB-Agar mit entsprechender Antibiotika-Konzentration ausplattiert und bei optimalen Bedingungen inkubiert.

2.2.3.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde durch die Fima Sequivserve (Vaterstetten) durchgeführt. Dazu wurde der Sequenzierautomat ABI 373 stretch (Perkin Elmer, Weiterstadt) und der ABI Prism Dye Terminatorcycle sequencing ready reaction kit mit AmpliTaq Polymerase, FS (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet. Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten, die in den typischen Klonierungsvektoren integriert sind, wurden routinemäßig die Primer T7 und SP6 verwendet. Zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten aus genomischer DNA wurden jeweils spezifische und zum Teil degenerierte Primer verwendet. Die Sequenzdaten wurden unter Verwendung des BLAST (Biological Local Alignment Search Tool) Algorithmus von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oder EMBL (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2>) analysiert. So konnten Sequenzhomologien nicht nur auf DNA-, sondern auch auf Proteinebene gefunden werden.

2.2.3.10 Amplifikation von DNA mittels PCR

2.2.3.10.1 Standardmethode

Für die PCR wurde die *Taq*-Polymerase von Qiagen (Heidelberg) verwendet. Ein Standardansatz bestand aus 1 µl je Oligonukleotid (50 pmol/µl), 10 µl 10 x Reaktionspuffer, 2 µl Nukleotid-Lösung (je 10 mM ATP, GTP, TTP und CTP), 0,3 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl), 0,5 – 1 µl Template DNA-Lösung und steriles Aqua_{bidest} ad 100 µl. Durch Verdünnung des Reaktionspuffers ergab sich somit eine MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM.

Um Kreuzkontaminationen durch verschleppte DNA zu vermeiden, wurde in der Regel ein Master-Mix vorbereitet und die DNA immer zuletzt in den jeweiligen Ansatz pipettiert.

Die PCR wurde in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) oder Primus 96 Plus (MWG Biotech, Ebersberg) nach folgendem Ablauf durchgeführt:

1 Zyklus	initiale Denaturierung	2 - 5 min	96°C
30 – 35 Zyklen	a) Denaturierung	45 s	94°C
	b) Annealing	30 – 60 s	45 – 65°C
	c) Elongation	60 s pro kb	72°C
1 Zyklus	finale Elongation	5 min	72°C

Die optimale Annealing-Temperatur ist abhängig von Komplementarität und Länge der eingesetzten Oligonukleotide und liegt ca. 2°C unter der berechneten Schmelztemperatur T_s , die sich nach Suggs *et al.* (1981) annäherungsweise wie folgt berechnen lässt:

$$T_s [°C] = \{2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5\}.$$

Als Erfolgskontrolle wurde ein Teil jeder Probe (1 – 5 µl) mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bei Verwendung degenerierte Oligonukleotide ist darauf zu achten, dass die berechnete Annealing-Temperatur deutlich beeinflusst werden kann und dies entsprechend berücksichtigt werden muss. Dazu kann zum einen die $MgCl_2$ -Konzentration variiert werden (0,5 – 5 mM) und zum anderen an bestimmten Stellen die universell paarende Base Inosin verwendet werden.

2.2.3.10.2 Inverse PCR

Um unbekannte DNA Sequenzen amplifizieren und sequenzieren zu können, bedient man sich der inversen PCR (Ochman *et al.* 1993). Dazu wurde chromosomale DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten, gereinigt und in niedrigen Konzentrationen religiert. Die verwendeten Oligonukleotide wiesen dabei zunächst eine entgegengesetzte Orientierung auf. Nach der Ligation einzelner Fragmente konnte dann mit diesen Primern eine PCR durchgeführt werden. Die Produkte wurden auf einem präparativen TAE-Agarosegel aufgetrennt und spezifische Banden mit dem E.Z.N.A. Gel-Extraktions-Kit (Peqlab, Erlangen) aufgereinigt. Diese PCR-Produkte konnten dann mit den für die Amplifikation verwendeten Primern sequenziert werden. Aus der Sequenzinformation konnten dann neue Primer abgeleitet und ein neuer Zyklus begonnen werden. Dieses Verfahren wurde solange angewendet bis die gesuchte Sequenzinformation bekannt war.

2.2.3.10.3 TA-Klonierung

Da die *Taq*-Polymerase eine von der Matrize unabhängige terminale Transferase aufweist, besitzen die meisten PCR-Fragmente einen 3`-Desoxyadenin Überhang. Diese Tatsache erlaubt die so genannte TA-Klonierung, bei der ein linearisierter Vektor mit 3`-Desoxythymidin-Überhang und einer kovalent gebundenen Topoisomerase zum Einsatz kommt. Die Durchführung ist analog zu einer herkömmlichen Ligation und orientiert sich an den Angaben des Herstellers (z.B. TOPO TA-Cloning, Invitrogen, Heidelberg; pAcceptor, Novagen). Die Insertion erfolgte dabei nicht gerichtet, konnte aber durch Restriktionsanalyse oder PCR leicht untersucht werden. Die Vektoren mit den gesuchten Inserts liessen sich ohne Besonderheiten transformieren. Durch Insertion eines PCR Fragments wurde bei diesen Vektoren in der Regel ein *lacZ* Gen inaktiviert, so dass Klone, die ein Plasmid mit Insert tragen durch klassische Blau-Weiss Selektion identifiziert werden konnten.

2.2.3.10.4 Kolonie-PCR

Zur Erfolgskontrolle und zum Screening von gesuchten Klonen kann als Alternative zur PCR an isolierten Plasmiden auch eine PCR mit den erhaltenen Kolonien direkt durchgeführt werden. Dabei wurde anstelle der Plasmid DNA direkt ein Teil der Kolonie als Template in den PCR-Ansatz gegeben. Parallel wurde die untersuchte Kolonie auf einer neuen Platte ausgestrichen. Zu beachten war, dass zur Lyse der Zellen und Freisetzung der DNA ein zusätzlicher Inkubationsschritt für 10 min bei 95°C am Anfang des PCR-Programms eingefügt werden musste.

Nach Analyse der PCR-Ergebnisse konnten dann die entsprechenden Klone auf den Parallelplatten weiter bearbeitet werden (Plasmidisolierung, Enzym-Aktivitätstests,...).

2.2.3.11 Reverse Transkription

Die Herstellung der cDNA aus isolierter Gesamt-RNA wurde freundlicherweise von Melanie Pavlovic durchgeführt. Dazu wurde zunächst restliche DNA durch Inkubation der RNA für 20 min bei 37°C in Gegenwart von RNase freier DNase I und RQ1-Puffer (Promega) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung dieses Enzyms durch Inkubation für 10 min bei 65°C in Stoppuffer (1 µl/10 µl Ansatz). Nach erfolgreicher elektrophoretischer Qualitätskontrolle der RNA konnte die cDNA Synthese im 50 µl Maßstab gestartet werden. Dazu wurden 2 µg der RNA und 1,5 µg Random Hexamer Primer (Promega) gemischt und 5 min bei 70°C inkubiert. Nach Aufheizen des Ansatzes auf 94°C erfolgte während der Abkühlung und der Inkubation für 5 min bei 20°C die Anlagerung der Primer. Erst dann

erfolgte die Zugabe von 5 µl 10 x Nukleotid-Mix, RNase freiem H₂O, Puffer für die Reverse Transkriptase und 200 U einer M-MLV Reversen Transkriptase (RNase H Minus, Point Mutant; Promega). Nach der Elongation für 1 h bei 42°C erfolgte dann der Abbau der RNA mittels RNase H (Promega) bei 37°C für 20 min. Die Enzyme wurden schließlich für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die cDNA wurde entweder frisch eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.2.3.12 RealTime-PCR

Zur Durchführung der semiquantitativen RealTime-PCR (RT-PCR) kam die LightCyclerTM-Technologie der Firma Roche zum Einsatz. Vor dem Start wurde die cDNA für 5 min bei 95°C denaturiert. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt dabei 10 pmol der beiden spezifischen Primer, 2 µl der im vorherigen Kapitel beschriebenen cDNA, 1 x SYBR Green 1 Master Mix (Qiagen, Hilden) und Nuklease freies Wasser. Die einzelnen Ansätze wurden in LightCyclerTM Glaskapillaren gefüllt und kurz abzentrifugiert. Im Anschluss wurde folgendes Programm durchgeführt:

<i>1 Zyklus</i>	<i>94°C/15 min</i>	<i>Aktivierung der Polymerase</i>	<i>Heizrate: 20°C/s</i>
<i>40 bis 50 Zyklen</i>	<i>a) 94°C/15 s</i>	<i>PCR</i>	<i>Heizrate: 20°C/s</i>
	<i>b) 50-52°C/20 s</i>		<i>Heizrate: 20°C/s</i>
	<i>c) 72°C/30 s</i>		<i>Heizrate: 20°C/s</i>
<i>1 Zyklus</i>	<i>a) 94°C/0 s</i>	<i>Schmelzkurve</i>	<i>Heizrate: 20°C/s</i>
	<i>b) 40°C/10 s</i>		<i>Heizrate: 0,1°C/s</i>
	<i>c) 90°C/0 s</i>		<i>Heizrate: 20°C/s</i>
<i>1 Zyklus</i>	<i>40°C</i>	<i>Kühlen</i>	<i>Heizrate: 20°C/s</i>

Alle Messungen wurden doppelt und mit zwei unabhängig voneinander gewonnenen cDNAs durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde immer auch eine Probe mit Wasser analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der LightCyclerTM Software 5.32 (Crossing-Point-Analyse des zweiten derivativen Maximums). Die Quantifizierung jeder Probe wurde in Relation zum Referenzgen *xpk* (Phosphoketolase) gesetzt. Der Induktionsfaktor „I“ einer Probe nach einer Stressbehandlung im Vergleich zu einer Probe unter optimalen Bedingungen berechnet sich dabei wie folgt:

$$I = E^{(C_s - C_k)}$$

E = Effizienz der PCR (Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit; für alle Primerpaare vergleichbar 2,0)

CS = Crossing point nach Stressbehandlung

CK = Crossing point der Kontrolle

2.2.3.13 Nukleinsäuretransfer und Hybridisierungsversuche

Der Transfer von DNA und RNA auf geeignete Membranen für Hybridisierungsversuche erfolgte in dieser Arbeit im Rahmen des Southern-, des Northern- und des RNA-Dot-Blots. Um das Arbeiten mit Radioaktivität zu vermeiden wurde in allen Fällen mit immunologischen Nachweisen und den zuvor entsprechend markierten DNA-Sonden gearbeitet.

2.2.3.13.1 Southern-Blot

Depurinierungslösung:	0,25 M HCl
Denaturierungslösung:	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris-HCl 3,0 M NaCl; pH 7,0
20 x SSC:	3,0 M NaCl 0,3 M Natrium-Citrat; pH 7,0

Der Southern-Blot dient dem Transfer von DNA von z.B. einem Agarosegel auf eine Membran z.B. aus Nylon oder Nitrocellulose, um dort dauerhaft fixiert zu werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Kapillartransfer und nicht mittels Vakuum- oder Elektro-Blot gearbeitet. Aus *L. sanfranciscensis* isolierte genomische DNA wurde mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gespalten und anschließend auf einem 0,8% TAE-Agarosegel aufgetrennt. Nach der Ethidiumbromid-Färbung wurde das Gel in der Depurinierungslösung unter ständigem Schwenken bis zum Umschlag des Bromphenolblaus zu gelb inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für je zweimal 15 min in Denaturierungs- und Neutralisierungslösung, sowie eine darauf folgende kurze Äquilibrierung in 20 x SSC. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (HybondTM-N+, Amersham Biosciences) wurde mittels Kapillarblot und 20 x SSC als Blotting-Puffer über Nacht durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran durch eine Bestrahlung für 60 s unter dem UV-Transilluminator auf der Membran fixiert.

2.2.3.13.2 Northern-Blot

10 x MOPS:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 20 mM EDT; pH 7,0
RNA-Auftragspuffer:	1 x MOPS 50% deionisiertes Formamid 6,15% Formaldehyd 0,05% Bromphenolblau

Der Northern-Blot dient der dauerhaften Fixierung von RNA auf einer Membran. Zur Auftrennung der RNA wurde eine denaturierende Elektrophorese gewählt. Um eine Degradation der RNA durch RNasen so weit wie möglich zu verhindern, wurden alle Lösungen mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Gelelektrophoresekammer, Gelschlitten und Käme wurden über Nacht mit 0,1 N NaOH-Lösung gereinigt.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,3 g Agarose in 71 ml DEPC-Wasser in der Mikrowelle gelöst und anschließend mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 18 ml Formaldehyd (37%) vermischt. Nach dem Aushärten des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x MOPS-Puffer bis zur Oberkante des Gels gefüllt. Bevor die RNA-Proben aufgetragen wurden, mussten sie mit dem doppelten Volumen an Auftragspuffer für 10 min bei 65°C denaturiert werden. Pro Bande wurden gleiche Mengen an RNA (ca. 3,5 µg) aufgetragen. Der Einlauf ins Gel erfolgte für ca. 10 min bei 4 V/cm. Erst dann wurde die Gelkammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Nach der vollständigen Auftrennung wurde das Gel zur Entfernung des Formaldehyds für 10 min in DEPC-Wasser und anschließend für 10 min in 20 x SSC-Puffer inkubiert. Der Kapillarblot und die Fixierung der RNA erfolgten analog zum Verfahren des Southern-Blots.

2.2.3.13.3 RNA-Dot-Blot

Der RNA-Dot-Blot unterscheidet sich vom klassischen Northern-Blot nur dadurch, dass das RNA Gemisch nicht aufgetrennt wird. Stattdessen werden mit Hilfe einer geeigneten Dot-Blot-Apparatur (Stratagene, Heidelberg) und einer Vakuumpumpe RNA-Extrakte gleicher Konzentration in definierten Spots auf eine Membran aufgebracht und dort fixiert. Im Anschluss daran erfolgt die Visualisierung und Quantifizierung mittels DIG-markierter DNA Sonden und dem in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen immunologischen Verfahren.

Dabei sollten immer mehrere Blots mit denselben RNA Mengen parallel hergestellt werden. Während auf einem Kontroll-Blot ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen nachgewiesen wird, kann auf den anderen Dot-Blots die mRNA Konzentration der zu untersuchenden Gene analysiert und zur relativen Quantifizierung in ein Verhältnis zur Kontrolle gesetzt werden.

Beim Zusammenbau der Apparatur war darauf zu achten, dass die Membran zuvor mit Hybridisierungspuffer befeuchtet wird und auf ebenfalls angefeuchtetes Filterpapier gelegt wird. Um ein „Verlaufen“ der Spots zu vermeiden, musste die Dichtung der Apparatur absolut luftdicht schließen, da sonst das Vakuum an den Auftragspunkten nicht ausreicht, um die Proben schnell genug durch die Membran zu saugen und so ein Verwischen der Spots zu verhindern. Die Menge der aufzutragenden RNA richtete sich immer nach der mRNA Konzentration, die nachgewiesen werden sollte. Diese Konzentration kann in Abhängigkeit

des Gens und der Inkubationsbedingungen stark schwanken und wurde in allen Fällen durch Vorversuche mit unterschiedlichen Auftragsvolumina bestimmt. Die Konzentration sollte sich in einem Rahmen bewegen in dem sie sowohl nachweisbar, als auch noch quantifizierbar ist. Gleichzeitig ist darauf zu achten, dass das Auftragsvolumen hoch genug ist (100 – 1000 µl), so dass eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Membranspot möglich ist. In den meisten Fällen war dazu eine Verdünnung der RNA-Proben mit DEPC behandeltem Wasser nötig.

2.2.3.13.4 DIG markierte DNA-Sonden

Durch Einsatz von dUTPs, die mittels einer Esterbindung mit DIG (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate, alkali-labile; Roche) modifiziert sind, wurden bei der PCR-Amplifikation (2.2.3.10.1) die DNA-Sonden automatisch markiert. Ein Reaktionsansatz (50 µl) setzte sich dabei aus 2 µl 10 x dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und 1,6 mM dTTP), 1 µl DIG-dUTP Stammlösung (1 mM DIG-dUTP), 1 µmol je Primer, 2 U der *Taq*-Polymerase und der entsprechende Menge an Template-DNA (10 ng genomische DNA oder 10 pg Plasmid DNA) zusammen. Da mit DIG markierte DNA Fragmente im Agarosegel langsamer laufen als herkömmliche PCR Produkte, konnte die erfolgreiche Markierung leicht überprüft werden.

2.2.3.13.5 Immunologischer Nachweis

<i>Standard-Hybridisierungspuffer</i>	5 x SSC Blocking Reagent 2% (v/v) SDS 0,02% (w/v) <i>N-Laurylsarcosin</i> 0,2% (w/v)
<i>Maleinsäurepuffer</i>	100 mM Maleinsäure NaCl 150 mM; pH 7,5
<i>Low-stringency-Waschpuffer</i>	2 x SSC SDS 0,1% (w/v)
<i>High-stringency-Waschpuffer:</i>	0,5 x SSC SDS 0,1% (w/v)
<i>Waschlösung</i>	Maleinsäurepuffer mit 0,3% (w/v) Tween 20
<i>Detektionspuffer</i>	Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,1 M; pH 9,5
<i>Strippinglösung</i>	NaOH 0,2 M SDS 0,5% (w/v)

Der immunologische Nachweis ist für alle Blots prinzipiell identisch. Bei der Arbeit mit RNA ist darauf zu achten, dass alle Lösungen mit DEPC-Wasser hergestellt werden. Die Hybridisierungstemperatur (T_{Hyp}) ist von der Homologie, der Länge und dem GC-Gehalt der DNA-Sonde abhängig und berechnet sich annäherungsweise wie folgt (nach Meinkoth und Wahl 1984):

$$T_{\text{Hyp}} = T_m - 25^\circ\text{C} - (x \cdot 1,4^\circ\text{C}), \text{ wobei}$$

$$T_m = 16,61 \log[\text{Na}^+] + 0,41 (\%GC) + 81,5 - 500/n - 0,61 (\%\text{Formamid})$$

T_m = Schmelztemperatur der Sonde/Nukleinsäure; x = % [Homologie der Sonde zur Zielsequenz] - 80% (falls Homologie < 80%); %GC = GC-Gehalt Sonde [mol]; Na^+ = Na^+ -Konzentration im Hybridisierungspuffer [mol]

In der Regel wurden die Sonden so gewählt, dass die Hybridisierungstemperaturen zwischen 50 und 60°C liegen. Die Nylonmembran wurde im vorgewärmten Ofen für 45 min zusammen mit 20 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die DIG markierte Sonde 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurden 7 µl der Sonde zur Membran mit den 20 ml Hybridisierungspuffer gegeben und 18 bis 24 h bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur inkubiert. Das anschließende Waschen der Membran erfolgte für 2 x 5 min bei Raumtemperatur in je 50 ml low-stringency-Waschpuffer und anschließend für 2 x 15 min bei 65°C in high-stringency Waschpuffer.

Für RNA-Blots waren folgende Besonderheiten zu beachten: Dem Hybridisierungspuffer wurde deionisiertes Formamid (Endkonzentration 50%) und dem high-stringency-Waschpuffer wurde anstelle 0,5% SSC nur 0,1% SSC zugesetzt. Die Hybridisierung fand generell bei 50°C statt.

Alle Membranen wurden danach bei Raumtemperatur für 5 min in 20 ml Waschlösung und anschließend für 30 min in 50 ml Blocking-Lösung (Roche, Mannheim) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Lösung mit den Anti-Digoxigenin-Antikörpern (verbunden mit alkalischer Phosphatase) für 5 min zentrifugiert und aus dem Überstand 5 µl zu 100 ml Maleinsäurepuffer gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur zusammen mit der Membran für 30 min inkubiert und anschließend für 2 x 15 min mit je 50 ml der Waschlösung unter ständigem Schütteln gewaschen.

Zur Detektion wurden die Membranen 5 min in Detektionspuffer inkubiert und danach auf einer Plastikfolie mit 10 bis 15 Tropfen der Detektionslösung CPSD (Roche, Mannheim) gleichmäßig überschichtet. Die Membran wurde in die Folie eingeschweißt und für 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. In der Dunkelkammer wurde in einer Filmkassette für verschiedene Zeiten ein Röntgenfilm (Kodak® X-Omat AR-Film, XAR-2) auf die Membran

gelegt und anschließend entwickelt (Kodak®GBX developer and replenisher, 2% Essigsäure, Kodak®GBX fixer and replenisher).

Bei Bedarf konnte die Membran mit einer neuen Sonde wieder verwendet werden. Zur Entfernung der alten DIG-markierten Sonde wurde die Membran dazu 5 min mit Wasser gespült und 2 x für je 15 min mit je 20 ml Stripping-Lösung bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Membran in 2 x SSC äquilibriert, in Folie eingeschweißt und bis zur Hybridisierung mit einer neuen DNA Sonde bei 4°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Stressparameter

Beim Vergleich der Wirkung verschiedener Stressarten auf einen Mikroorganismus ist ein häufiges Problem, dass die Intensitäten der jeweiligen Stressbedingungen sehr unterschiedlich gewählt wurden. So kann man z. B. Studien über die Wirkung letaler Stressbehandlungen nicht mit Untersuchungen vergleichen, deren Absicht es ist eine durch subletalen Stress induzierte Stressantwort zu charakterisieren. Um geeignete Voraussetzungen für einen Vergleich mehrerer Stressantworten zu schaffen, müssen daher zunächst die Stressparameter ähnlicher Intensitäten bestimmt werden. Die größte Veränderung der Genexpression bei *Lactococcus lactis* wird erreicht, wenn durch die gewählten Stressbedingungen die maximale Wachstumsrate auf 10% reduziert wird (Sanders *et al.* 1999). Unter diesen Umständen wird auch für *L. sanfranciscensis* eine deutlich messbare Stressantwort erwartet. Daher wurden die für diese Arbeit relevanten Stressparameter so gewählt, dass sie die maximale exponentielle Wachstumsrate jeweils um 90% verringern. Durch Intensitäten gleicher Auswirkung auf die Wachstumsrate sollten die verschiedenen Stressarten miteinander vergleichbar gemacht werden. Auf diese Weise war es möglich Hochdruckstress mit anderen lebensmittelrelevanten Stressarten wie Hitze-, Kälte-, Säure- und NaCl-Stress direkt zu vergleichen. Außerdem sollten auch Zellen in der stationären Phase (Hungerstress) berücksichtigt werden. Die durch Wachstumsversuche ermittelten Parameter der verschiedenen Stressparameter sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Alle Versuche zur Bestimmung der Wachstumsraten unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und die einzelnen Werte gemittelt. Als optimale Wachstumsbedingungen wurden eine anaerobe Inkubation in mMRS-Medium bei 30°C und einem pH-Wert von 5,6 definiert.

Tabelle 3.1 Subletale Stressparameter für *L. sanfranciscensis*. Inkubationsbedingungen, bei denen die maximale Wachstumsrate auf 10% reduziert ist und eine maximale Stressantwort erwartet wird.

Stressart	max. Wachstumsrate reduziert auf 10% bei:
Hochdruck ²	80 MPa; 30°C
Hitze ²	43°C
Kälte	12,5°C
Salz ¹	1,9% NaCl; 30°C
Säure ²	pH 3,7; 30°C
Hunger	Stationäre Phase (OD ₆₀₀ = 1,2 – 1,5)

1: Wert übernommen (Scheyhing 2002)

2: Wert übernommen (Scheyhing 2002) und in dieser Arbeit bestätigt

Während einer Inkubation für 60 Minuten unter den in Tabelle 3.1 angegebenen subletalen Stressbedingungen waren weder eine signifikante Zunahme der Zelldichte, noch eine Veränderung der Zellmorphologie feststellbar.

Um eine durch subletalen Stress induzierte Adaptation bzw. Kreuzresistenz erkennen zu können, mussten wie bereits erwähnt neben den subletalen auch die letalen Stressbedingungen ermittelt werden. Dabei war zu berücksichtigen, dass die Bedingungen so mild wie möglich und so hoch wie nötig gewählt werden. Letaler Stress durfte dabei nicht so hoch sein, dass auch Zellen, die eine durch Adaptation erworbene erhöhte Resistenz besitzen, in kürzester Zeit abgetötet werden. Um Artefakte zu vermeiden, sollten die Bedingungen aber dennoch so gewählt werden, dass eine exponentielle Inaktivierung erreicht und die Zellzahl nach einer gewissen Inkubationsdauer um mindesten 99% reduziert wird. In Tabelle 3.2 sind die Werte angegeben, bei denen diese Bedingungen für *L. sanfranciscensis* erfüllt wurden.

Tabelle 3.2 Letale Stressparameter für *L. sanfranciscensis*. Inkubationsbedingungen, bei denen eine exponentielle Abnahme der Lebendzellzahl über die Zeit stattfand. Die Bedingungen sind so mild wie möglich gewählt, um Unterschiede in der Resistenz bei verschiedenen Zellen beobachten zu können.

Stressart	letale Stressparameter:
Hochdruck ¹	300 MPa; 30°C
Hitze	50°C
Kälte	Einfrieren (-20°C) / Auftauen (30°C)
Salz	20% NaCl; 30°C
Säure	pH 2,0; 30°C

1: Wert übernommen (Scheyhing 2002) und in dieser Arbeit bestätigt

3.2 Adaptation und Kreuzresistenz

Inkubiert man Zellen unter subletalen Stressbedingungen, so können diese ihre Resistenz gegenüber einer anschließenden letalen Stressbehandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollpopulation erhöhen. Ist der letale Stress dabei identisch mit dem subletalen Stress der Vorinkubation, spricht man von Adaptation. Wird hingegen die Resistenz gegenüber einer anderen Stressart erhöht, handelt es sich um Kreuzresistenz. Bei *L. sanfranciscensis* konnte nach einer einstündigen Inkubation unter verschiedenen subletalen Stressbedingungen eine erhöhte Hochdruckresistenz festgestellt werden (Abbildung 3.1). Eine Vorinkubation für 60 Minuten in Medium mit 1,9% NaCl (Salzstress) erhöhte die Überlebensrate um das 3,1-fache ($\pm 0,2$) und eine Vorinkubation in saurem Medium mit einem pH-Wert von 3,4 führte zu einer 4,9-fachen ($\pm 0,6$) Steigerung der Überlebensrate nach

einem anschließenden letalen Hochdruckstress. Auch eine vorangehende Absenkung der Inkubationstemperatur auf 12,5°C (Kältestress) wirkte sich positiv auf die Hochdruckresistenz aus. Die Überlebensrate war danach um den Faktor 4,3 ($\pm 1,2$) signifikant erhöht. Auch stationäre Zellen (Hungerstress) besaßen im Vergleich zu Zellen in der exponentiellen Phase eine 2,7-fach ($\pm 0,3$) höhere Überlebensrate nach einer letalen Hochdruckbehandlung für 30 Minuten bei 300 MPa. Eine Temperaturerhöhung auf 43°C für 30 min (Hitze stress) führte hingegen zu einer verringerten Hochdruckresistenz. Die Zellen wurden sensitiver gegenüber HHD und die Überlebensrate betrug nach einer Inkubation bei 300 MPa für 30 min nur noch 40% ($\pm 10\%$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Schließlich konnte auch eine subletale Hochdruckbehandlung eine erhöhte Resistenz gegenüber einer letalen Hochdruckbehandlung induzieren (Adaptation). Bei *L. sanfranciscensis* wurde eine Hochdruckadaptation beobachtet, die die Überlebensrate nach einem letalen Hochdruckstress um das 2,8-fache ($\pm 0,4$) erhöht. Wurde während der subletalen Vorinkubation dem Medium Chloramphenicol (Cm) zugesetzt, konnte dieser Effekt der Adaptation nicht beobachtet werden ($0,9 \pm 0,1$).

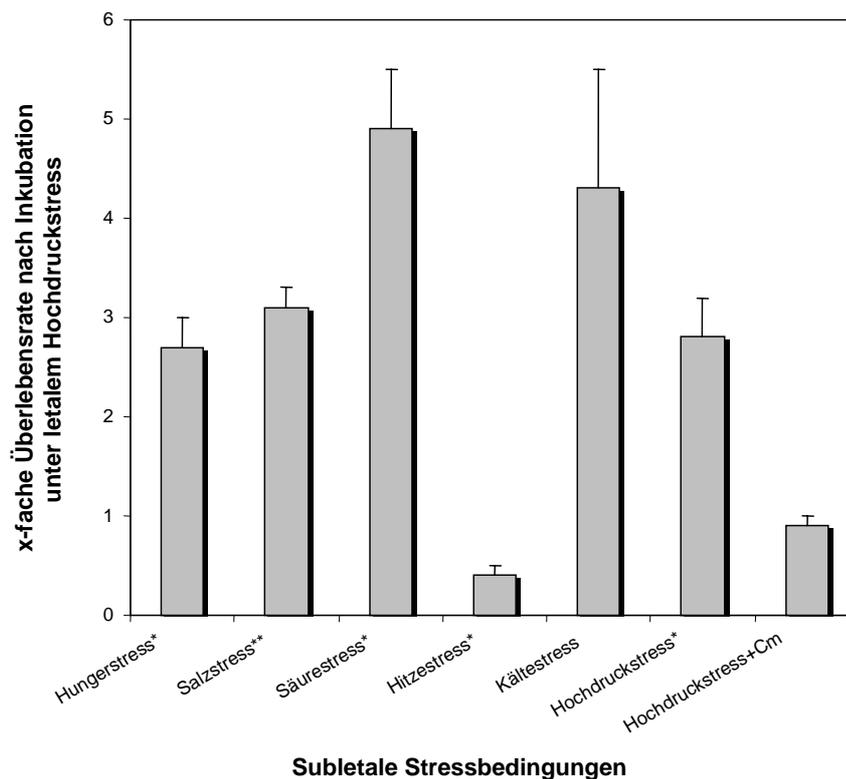


Abbildung 3.1 Kreuzresistenz und Adaptation bei *L. sanfranciscensis*. Eine Vorinkubation für 60 min (30 min bei Hitze stress) unter verschiedenen subletalen Stressbedingungen (x-Achse) besitzt Auswirkungen auf die Überlebensrate nach einem anschließenden letalen Hochdruckstress bei 300 MPa für 30 min (y-Achse). Genaue Stressparameter und Inkubationsbedingungen siehe Text. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Balken zeigen die Standardabweichungen. (Cm = Chloramphenicol).

* Wert übernommen und in dieser Arbeit bestätigt bzw. korrigiert (Scheyhing 2002)

** Wert übernommen (Scheyhing 2002)

In komplementären Versuchen wurde festgestellt, dass eine subletale Hochdruckbehandlung ebenfalls signifikante Auswirkungen auf die Überlebensrate nach Inkubation unter verschiedenen letalen Stressbedingungen besitzen kann (Abbildung 3.2). So war die Überlebensrate nach einer Hitzebehandlung bei 50°C um das 3,7-fache ($\pm 0,3$) höher, wenn die Zellen zuvor für 60 Minuten bei 80 MPa inkubiert wurden. Während eine Vorinkubation unter subletalem Hochdruck keine gravierende Veränderung gegenüber einem letalen Salzstress (20% NaCl) ($1,1 \pm 0,3$) oder einem einmaligen Einfrier-/Auftauprozess ($1,2 \pm 0,05$) ausübte, ist die Resistenz gegenüber einem letalen Säurestress deutlich verringert. Eine Behandlung mit subletalem HHD erhöhte die Sensitivität von *L. sanfranciscensis* gegenüber einem letalen pH-Wert von 2,0 derart, dass 80% ($\pm 10\%$) mehr Zellen abstarben als in der unbehandelten Kontrolle.

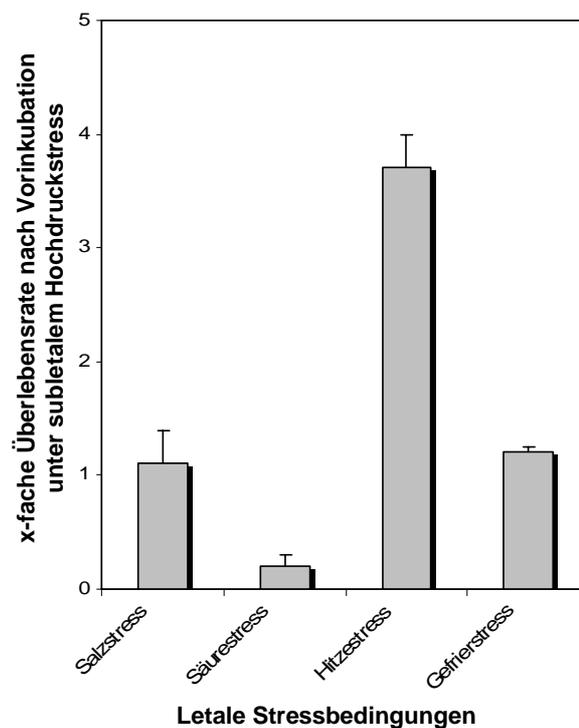


Abbildung 3.2 Kreuzresistenz bei *L. sanfranciscensis*. Eine Vorinkubation mit subletalem Druckstress für 60 min bei 80 MPa kann Auswirkungen auf die Überlebensrate (y-Achse) nach verschiedenen letalen Stressbedingungen für 60 min (x-Achse) haben. Genaue Stressparameter und Inkubationsbedingungen siehe Text. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Balken zeigen die Standardabweichungen.

3.3 Charakterisierung der Stressantwort auf Proteomebene

In den vorangegangenen physiologischen Versuchen wurde gezeigt, dass nach einer subletalen Vorinkubation die Adaptation an eine letale Hochdruckbehandlung bei *L. sanfranciscensis* möglich ist. Da nach Zugabe von Chloramphenicol dieser Effekt nicht auftritt, scheint eine funktionierende Protein *de novo* Synthese dafür nötig zu sein.

Um herauszufinden, welche Proteine dabei synthetisiert werden, sollte mittels hochauflösender 2D-Gelelektrophorese die hochdruckinduzierte Veränderung des Proteoms von *L. sanfranciscensis* untersucht werden. Damit eine statistisch abgesicherte Aussage getroffen werden kann, wurden in über 70 Gelen die zytoplasmatischen Proteinmuster von unbehandelten mit denen von mit 80 MPa behandelten Zellen verglichen und die Unterschiede quantifiziert. Um die statistische Sicherheit und Signifikanz der Proteomstudie zu erhöhen, wurden zusätzlich auch die von Scheyhing generierten Gele in die Auswertung mit aufgenommen (Scheyhing 2002). Im Regelfall betrug die Druckhaltezeit 60 min. Experimente mit veränderten Haltezeiten von 30 min, 120 min, 180 min und 240 min ergaben keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnte nach einer über 60 min dauernden Inkubation eine Zunahme der optischen Dichte durch Zellwachstum festgestellt werden. Um nur die Stressantwort und keine Artefakte durch Vermehrung der Zellen unter Druck zu messen, wurden für die Auswertung daher nur Experimente mit einer Druckhaltezeit von 60 min berücksichtigt. Insgesamt konnten auf diese Weise 16 Proteinspots (HHD „sensitive“ Proteine) identifiziert werden, deren Konzentration in der Zelle nach einer Inkubation bei 80 MPa im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant verändert war. Von den 16 Proteinspots war bei 9 Proteinen eine deutliche, mindestens zweifache Zunahme der Proteinmenge festzustellen („induzierte Proteine“), wohingegen bei den restlichen 7 Proteinen nach einer Druckbehandlung die Menge in der Zelle auf mindestens die Hälfte abnahm („reprimierte“ Proteine).

In Abbildung 3.3 sind zwei typische Polyacrylamidgele mit silbergefärbten Proteinen gezeigt. Proteinspots, deren Konzentration nach 60 min bei 80 MPa im Vergleich zur Kontrolle signifikant verändert war, sind durch Rechtecke, bzw. Rauten markiert. Die Quantifizierung der Unterschiede in den Proteinmengen vor bzw. nach einer Hochdruckbehandlung ist in Tabelle 3.3 abgebildet.

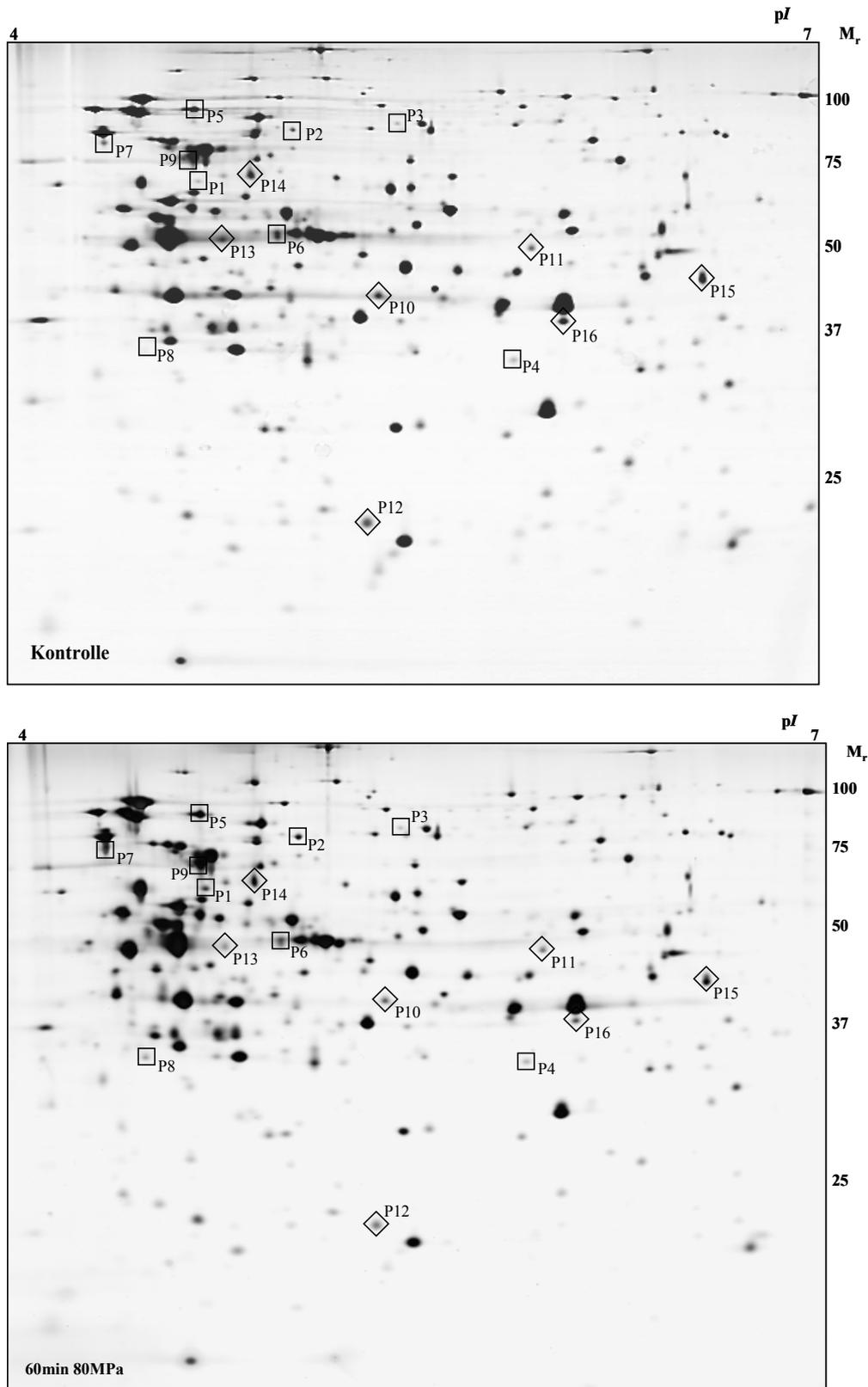


Abbildung 3.3 Proteomanalyse zytoplasmatischer Proteinextrakte bei *L. sanfranciscensis*, unbehandelt und 60 min bei 80 MPa inkubiert. Die Proteine wurden silbergefärbt. □ = Proteinspot, dessen Menge mind. verdoppelt ist. ◇ = Proteinspot, dessen Menge mind. halbiert ist. Angaben zu Isoelektrischen Punkten (pI) und molekularen Massen von Standardproteinen sind abgebildet.

Tabelle 3.3 Semiquantitative Analyse der Veränderung zytoplasmatischer Proteinmengen von *L. sanfranciscensis* nach verschiedenen subletalen Stresseinwirkungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Untersucht wurden die 16 Proteinspots (P1 – P16), deren Menge nach einer Hochdruckbehandlung (HHD) signifikant verändert war. Qualitative Übereinstimmungen in der Zu- und Abnahme der Proteinmengen zwischen hochdruckbehandelten Zellen und den alternativ gestressten Zellen sind grau unterlegt. Genaue Bedingungen der jeweiligen Stressbehandlungen siehe Text.

Spot	pI ^a	M _r (x10 ³) ^b	HHD ^c	Salz ^c	Hitze ^c	Kälte ^c	Säure ^c	Hunger ^c
P1	4.9	60	+++	++	+/-	+++	+	+++
P2	5.2	85	++	+	+/-	++	+/-	+++
P3	5.5	90	++	+	-	+/-	+	+/-
P4	5.8	35	++	+/-	+	+	++	++
P5	4.8	95	+	++	+	+/-	+/-	++
P6	5.1	50	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-
P7	4.6	35	+	+	+/-	+	+/-	+
P8	4.4	85	+	+	++	+/-	+	+/-
P9	4.8	65	+	+	+	+	+/-	+
P10	5.4	40	-	-	-	-	+/-	-
P11	5.9	45	-	+/-	-	-	+/-	+/-
P12	5.4	25	-	+	+/-	-	+	+
P13	4.9	50	-	-	-	-	-	-
P14	5.1	60	-	-	-	+/-	-	+/-
P15	6.7	40	-	-	-	-	-	+/-
P16	6.0	35	-	+/-	-	-	-	+

a) Aus den 2D-Gelanalysen ungefähre isoelektrische Punkte (pI)

b) Aus den 2D-Gelanalysen ungefähre molekulare Massen (M_r)

c) +++ Zunahme der Proteinmenge > 10; ++ Zunahme der Proteinmenge 5-10;

+ Zunahme der Proteinmenge 2-5; +/- keine Veränderung; - Abnahme der Proteinmenge > 0,5;

Zur besseren Charakterisierung der HHD induzierten Stressantwort von *L. sanfranciscensis* sollte im Folgenden ein Vergleich mit anderen Stressantworten dieses Stammes durchgeführt werden. Dabei wurden dieselben subletalen Stressbedingungen wie in den physiologischen Versuchen zur Ausbildung von Kreuzresistenzen gewählt (siehe Kapitel 3.1 und 3.2). Untersuchungen über die Veränderungen der Konzentrationen HHD „sensitiver“ Proteine unter den verschiedenen, zum Teil besser verstandenen Stressbedingungen derselben Intensität,

sollten eine Aussage über das Wirkprinzip von HHD auf die Zelle erleichtern. Weitere zytoplasmatische Proteinextrakte von *L. sanfranciscensis* wurden dazu nach Inkubation unter subletalem Salz-, Hitze-, Kälte- und Säurestress mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Ergebnisse anschließend ausgewertet. Auch Proteinextrakte stationärer Zellen (Hungerstress) wurden untersucht und für die Auswertung herangezogen. Für die Proteomanalyse von *L. sanfranciscensis* nach Säure- und Hungerstress wurden nur die bereits vorhandenen Daten von Scheyhing verwendet (Scheyhing 2002). Zur Auswertung von Hitze- und Salzstress wurden eigene Gele hergestellt und um die von Scheyhing generierten Werte ergänzt. Außerdem wurde in dieser Arbeit auch die Expression HHD „sensitiver“ Proteinen nach einem Kältestress untersucht. In Abbildung 3.4 sind Ausschnitte entsprechender 2D-Gele abgebildet, die die 16 HHD „sensitiven“ Proteinspots nach Inkubation unter den verschiedenen erwähnten Stressbedingungen zeigen. Die Quantifizierung der Proteinmengen zeigte Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Regulation der Proteine zwischen den Zellen, die mit HHD behandelt wurden und Zellen, die den anderen Stressbedingungen ausgesetzt waren (Tabelle 3.3). Demnach bestehen die größten Gemeinsamkeiten zwischen Hochdruckstress und Kältestress, bzw. Salzstress. Jeweils 11 der 16 HHD „sensitiven“ Proteine wurden unter diesen beiden Stressbedingungen ähnlich reguliert (Ab-, bzw. Zunahme der Proteinmenge). Nach einer halbstündigen subletalen Hitzebehandlung bei 43°C zeigten 10 der 16 Proteine eine vergleichbare Veränderung. Säure- und Hungerstress bewirkten nur noch bei 8 Proteinen eine zu Hochdruckstress ähnliche Regulation.

Aus den physiologischen Versuchen mit Chloramphenicol kann gefolgert werden, dass eine hochdruckinduzierte Stressantwort auf die Neusynthese von Proteinen angewiesen ist (Kapitel 3.2). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache erscheint es daher sinnvoll, wenn in Bezug auf eine induzierte Resistenzbildung beim Vergleich der verschiedenen Stressantworten vor allem die Proteine berücksichtigt werden, die unter HHD deutlich (mindestens fünffach) induziert sind (P1 bis P4). Unter dieser Betrachtung weisen mit Ausnahme der Hitzestressantwort alle untersuchten Stressantworten mit jeweils drei von vier möglichen Übereinstimmungen hohe Ähnlichkeiten in der Proteinregulation mit der von Hochdruckstress auf. Die Hitzestressantwort hat die Regulation von nur einem stark induzierten Protein (P4) mit Hochdruckstress gemeinsam (Tabelle 3.3).

Hervorzuheben ist auch die Tatsache, dass nur ein einziges Protein (P6) spezifisch unter HHD „induziert“ wurde. Alle anderen Proteine waren unter mindestens einer weiteren der untersuchten Stressbedingungen ähnlich reguliert.

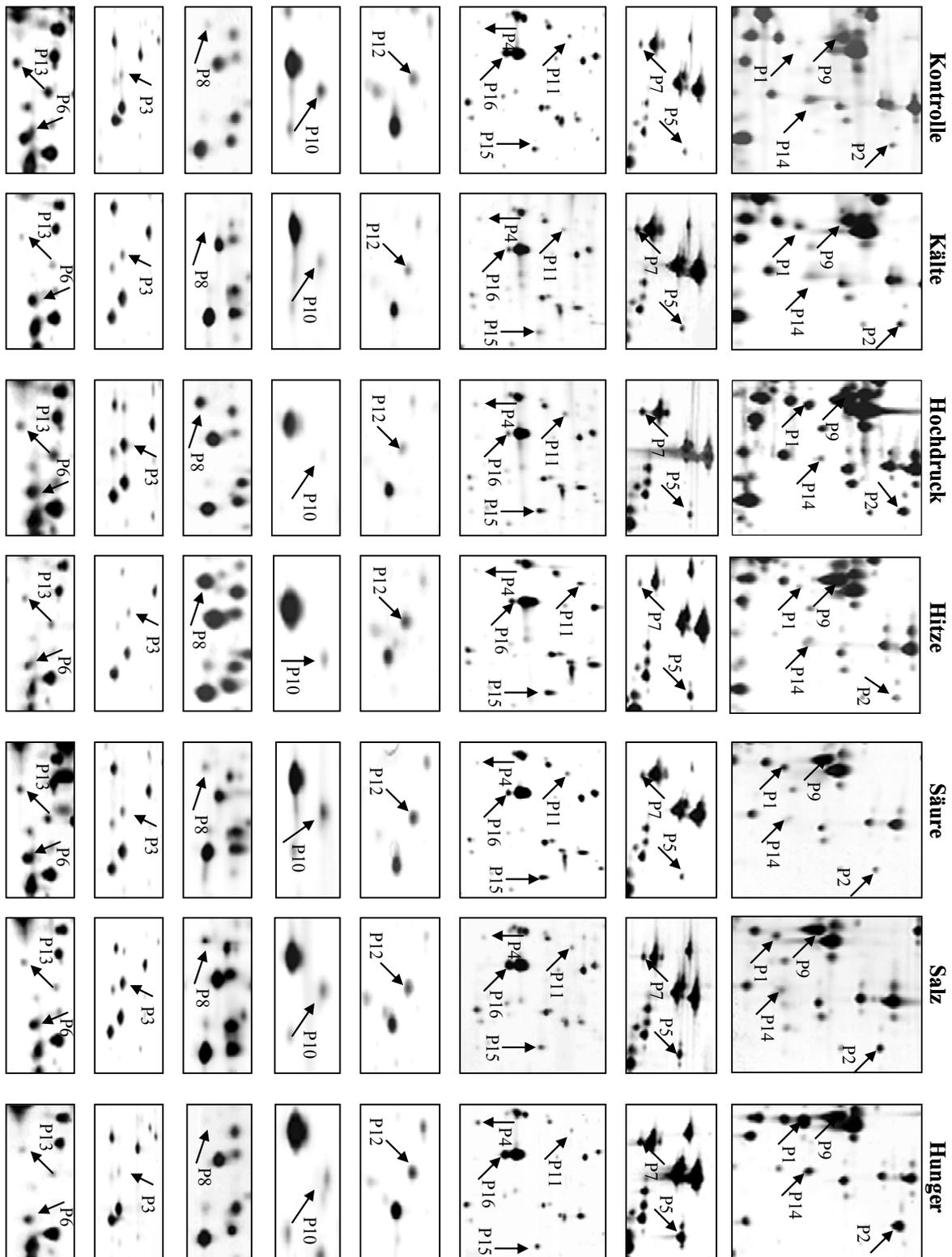


Abbildung 3.4 Ausschnitte aus 2D-Gelen, die Details aller 16 durch HHD beeinflussten Proteine nach Inkubation unter den verschiedenen Stressarten zeigen. Die Nummerierung der Proteinspots ist identisch mit der aus Abbildung 3.2 bzw. Tabelle 3.3. Die genauen Inkubationsbedingungen und –zeiten können dem Text entnommen werden (Kapitel 3.1). Eine Quantifizierung der veränderten Proteinnormen ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

3.4 Proteinidentifizierung

Nach Auswertung der hochdruckinduzierten Stressantwort anhand der Proteinmuster lag der nächste Schritt in der Identifizierung der 16 HHD „sensitiven“ Proteine. Kenntnisse über die Funktion dieser Proteine könnten genauere Aussagen zu den Vorgängen in der Zelle im Umgang mit Hochdruckstress ermöglichen. Mit dem Wissen wie eine Zelle auf HHD reagiert können u. a. Aussagen über Wirkmechanismen und Angriffsorte von HHD in der Zelle getroffen werden.

Da das Genom von *L. sanfranciscensis* zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht vollständig sequenziert war, wurde für eine Proteinidentifizierung die Aminosäuresequenz eines internen Peptidfragments benötigt. Die Bestimmung der Massenspektren tryptisch verdauter Proteine mittels MALDI-TOF MS wurde in dieser Arbeit zwar durchgeführt, eine Identifizierung der Proteine ist aufgrund der fehlenden Genominformationen für *L. sanfranciscensis* allerdings nicht möglich. Aus diesem Grund kamen aufwendigere Methoden wie die direkte N-terminale Sequenzierung interner Peptidfragmente mittels Edman-Abbau zum Einsatz. Bereits in einer früheren Arbeit (Scheyhing 2002) konnten auf diese Weise vier der insgesamt 16 Proteinspots identifiziert werden. Neben dem Proteinspot P1 (interne Peptidsequenz: GANGQAIAAARSGADTT) konnten auch interne Peptidsequenzen für die Proteinspots P2 (GEISVIGATTQDERYR), P9 (AAVEEGFVPGGGTAFINILK) und P16 (FANNRAAAVNTI PHSSGAAK) ermittelt werden (Tabelle 3.4). Nach Datenbankrecherche mittels der BLAST-Programme des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) konnten Homologien zu bereits bekannten Proteinen gefunden werden. So konnte für die Sequenz von P1 eine hohe Ähnlichkeit mit einem Peptidfragment einer Ribokinase aus *Lactobacillus plantarum* (82% Übereinstimmung) gefunden werden. Für Protein P2 ergab die Suche mit 87% Übereinstimmung eine große Homologie zu einer ATP-abhängigen Protease (ClpL) aus *L. rhamnosus*. Für die Peptidsequenz des Proteins P9 besteht eine Übereinstimmung von 88% mit dem generellen Stressprotein GroEL aus *L. johnsonii*. Die gefundene Aminosäuresequenz von P16 zeigt mit 87% Sequenzidentität starke Homologie zu einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus *L. plantarum*.

Die restlichen 12 Proteinspots wurden im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Herrn Dr. Lars Israel vom Zentrallabor für Proteinanalytik der Medizinischen Fakultät der LMU München identifiziert. Einzelne Peptide der tryptisch verdauten Proteine wurden dazu mittels HPLC aufgetrennt und danach direkt in einem QSTAR XL Massenspektrometer analysiert (nano-ESI-LC-MS/MS). Die anschließende Auswertung der resultierenden Spektren mit der

Software MascotTM (Matrix Science) ergab für jeden Proteinspot mehrere mögliche Datenbanktreffer mit verschiedenen hohen Wahrscheinlichkeiten. Die Auswahl der in Tabelle 3.4 dargestellten Ergebnisse erfolgte grundsätzlich aufgrund der statistisch höchsten Wahrscheinlichkeiten. Aber auch die Qualität der einzelnen Spektren und die Übereinstimmung von molekularem Gewicht und isoelektrischem Punkt zwischen den Proteinen auf den 2D-Gelen und den homologen Proteinen aus der Datenbank wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Die Zuverlässigkeit der Methode konnte durch die Analyse bereits bekannter Kontrollproteine bestätigt werden. So wurde der Proteinspot P1 ebenfalls als Ribokinase identifiziert, was das Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung mittels Edman-Abbau bestätigt. Auch in der Arbeit von Drews *et al.* wurde dieses Protein bereits analysiert und ebenfalls als Ribokinase beschrieben (Drews *et al.* 2002). Und auch das Ergebnis der Analyse des Proteinspots P13 steht mit dem Ergebnis von Drews *et al.* (2002) im Einklang. In beiden Fällen wurde dieses Protein als Elongationsfaktor TU identifiziert. Das Resultat der Analyse des Proteins P8, das deutliche Homologien mit dem Stressprotein DnaK besitzt, konnte aufgrund der bereits bekannten Gensequenz mittels einfacher Maldi-TOF-MS Analyse verifiziert werden. Die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der eingesetzten Methode konnte damit hinreichend gezeigt werden. Die Proteinidentifizierungen aller weiteren Proteinspots basieren nur noch auf der massenspektrometrischen Methode (siehe Tabelle 3.4). Für die 9 hochdruckinduzierten Proteine konnten Homologien zu folgenden Proteinen gefunden werden: Protein P1 zu einer Ribokinase und Ribose-5-P-Isomerase aus *L. plantarum*; Protein P2 zu einer ClpL-Protease aus *L. rhamnosus*; Protein P3 zu einem Protein mit unbekannter Funktion aus *L. lactis*; Protein P4 zu einer Thioredoxin-Reduktase aus *L. acidophilus*; Protein P5 zu einer Trehalose und Maltose Hydrolase aus *L. gasseri*; Protein P6 zu einer weiteren Clp-Protease, ClpX aus *L. johnsonii*; Protein P7 zu einem hypothetischen Protein YudG aus *L. lactis*; Protein P8 zu DnaK aus *L. sanfranciscensis* und Protein P9 zu GroEL aus *O. oeni*.

Für die 7 unter Hochdruck „reprimierten“ Proteine wurden Homologien zu folgenden Proteinen gefunden: Protein P10 zu einem Exopolysaccharid-Biosyntheseprotein aus *L. acidophilus*; Protein P11 zu einer 3-P-Shikimat-1-Carboxyvinyltransferase aus *L. plantarum*; Protein P12 zu einer UMP-Pyrophosphorylase aus *L. sakei*; Protein P13 zu dem bereits erwähnten Elongationsfaktor TU aus *L. lactis*; Protein P14 zur γ -Untereinheit der DNA-Polymerase III aus *L. plantarum*; Protein P15 zu einer Glutamat-Cystein Ligase aus *L. plantarum* und Protein P16 zu einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus *L. plantarum*.

Tabelle 3.4 Proteinidentifizierung und Ergebnisse der Datenbankauswertung aller 16 Proteine, deren Menge durch HDD beeinflusst wird. Ausführliche Erläuterungen siehe Text.

Spot	N-terminale Sequenz interner Peptidfragmente	Homologie	Quelle	Größe ^{a)}	Identität	pI ^{b)}	M _r ^{b)}	pI ^{c)}	M _r ^{c)}
P1 ^{d) e)}	GANGQAIA AARSGADTT,	Ribokinase RbsK	<i>Lactobacillus plantarum</i> NP_785739	306	82% (14/17)	5.18	31.8	4.9	60
P2 ^{d) e)}	GEISVIGAT TQDERYR	Clp protease ClpL	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> AAK64290	770	87% (14/16)	5.76	84.5	5.2	85
P3 ^{e)}	YHNLIIVSDQLK	Unbekannte Funktion	<i>Lactococcus lactis</i> AF216814_10	820	100% (11/11)	5.01	96.7	5.5	90
P4 ^{e)}	MTGVKVVHMK	Thioredoxin reductase	<i>Lactobacillus acidophilus</i> YP_194727.1	310	100% (9/9)	5.06	33.7	5.8	35
P5 ^{e)}	IFEVDPWK	Trehalose and maltose hydrolase	<i>Lactobacillus gasseri</i> ZP_00047083.1	758	100% (8/8)	5.18	87.8	4.8	95
P6 ^{e)}	TYLAQTLAK, NLTTGDLVKFGLIP EFIGR	Clp protease ClpX	<i>Lactobacillus johnsonii</i> AAS08833.1	421	100% (28/28)	5.39	46.6	5.1	50
P7 ^{e)}	SISKNGHFR	Hypothetical protein yudG	<i>Lactococcus lactis</i> gi25308242	314	100% (9/9)	4.97	34.8	4.6	35
P8 ^{e)}	FQLTDIPAAPR, NGIVNVSAAK, NGEIQVGEVAK	Heat shock protein 70 DnaK	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CAC86402	614	100% (31/31)	4.76	66.3	4.4	75
P9 ^{d) e)}	AAVEEGFVP GGGTAFINILK	GroEI Hsp 60	<i>Oenococcus oeni</i> ZP_00319095	541	88% (16/18)	4.85	57.3	4.8	65
P10 ^{e)}	RVVMALLK	Exopoly- saccharide biosynthesis protein	<i>Lactobacillus acidophilus</i> YP_194580.1	351	100% (8/8)	9.86	39.9	5.4	40
P11 ^{e)}	LTVNGLNPTR	3-P-shikimate 1- carboxyvinyl- transferase	<i>Lactobacillus plantarum</i> NP_785560.1	432	100% (10/10)	8.01	46.0	5.9	45
P12 ^{e)}	LAVVPILR, VGHIGMYR	UMP pyrophos- phorylase	<i>Lactobacillus sakei</i> gi22654171	209	100% (16/16)	5.41	22.8	5.4	25
P13 ^{e)}	GITINTAHIEYETEK	Elongation factor TU	<i>Lactococcus lactis</i> gi25299411	395	100% (15/15)	4.89	43.2	4.9	50
P14 ^{e)}	IPLTIISR	DNA-directed DNA polymerase III gamma subunit	<i>Lactobacillus plantarum</i> NP_784458.1	565	100% (8/8)	5.13	62.7	5.1	60
P15 ^{e)}	NSSSGYTNR	Glutamate- cysteine ligase (putative)	<i>Lactobacillus plantarum</i> NP_785798.1	412	100% (9/9)	6,26	45.9	6.7	40
P16 ^{d)}	FANNRAAAV NTIPHSSGAAK	GapDH	<i>Lactobacillus plantarum</i> NP_784534	340	87% (14/16)	5.30	36.4	6.0	35

a) Aminosäurekettenlänge des homologen Proteins gemäß Datenbankeintrag

b) Theoretisch berechnete Werte für pI und M_r des homologen Proteins mittels entsprechender Software (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)

c) Aus den 2D-Gelen geschätzte Werte für pI und M_r des jeweiligen Proteins aus *L. sanfranciscensis*

d) Bestimmung der N-terminalen Sequenz interner Peptidfragmente mittels Edman-Abbau (Scheyhing 2002)

e) Bestimmung der N-terminalen Sequenz interner Peptidfragmente mittels nano-ESI-LC-MS/MS

Die hohe Übereinstimmung zwischen den berechneten Werten der molekularen Massen und isoelektrischen Punkte der homologen Proteine und den aus den 2D-Gelen abgeschätzten Werten der Proteine von *L. sanfranciscensis* bestätigten die Ergebnisse der Proteinidentifizierungen. Die einzige signifikante Abweichung beim Vergleich der molekularen Massen zeigte das Protein P1 (Ribokinase) im Vergleich zum entsprechenden homologen Protein (Tabelle 3.4; Zeile 1). Mit ca. 60 kDa war das Protein P1 ungefähr doppelt so groß wie alle bisher beschriebenen Ribokinasen aus verschiedensten Organismen. Die Ursache für das hohe Molekulargewicht dieses Proteins sollte durch die Identifizierung und Charakterisierung des entsprechenden Gens und des daraus resultierenden Enzyms unter anderem im nächsten Teil dieser Arbeit aufgeklärt werden.

3.5 Identifizierung und Charakterisierung ausgewählter Gene und Proteine

Für die Charakterisierung bisher unbekannter Proteine ist es unerlässlich, die gesamte Aminosäuresequenz zu kennen. Da die vollständige Sequenzierung von Proteinen extrem aufwendig ist, wird im Regelfall die Aminosäuresequenz aus der jeweiligen Gensequenz abgeleitet. Während bei einem Organismus, dessen Genom komplett sequenziert ist die jeweils benötigte Gensequenz in Datenbanken abgerufen werden kann, muss bei einem Organismus, dessen Genom wie bei *L. sanfranciscensis* noch nicht vollständig entschlüsselt ist, die jeweilige Gensequenz erst noch mittels reverser Genetik identifiziert werden. Dazu werden unter Zuhilfenahme des genetischen Codes von den bekannten Peptidsequenzen degenerierte Oligonukleotide abgeleitet und als Primer für die inverse PCR eingesetzt. Genomische DNA wird mit einem spezifischen Restriktionsenzym geschnitten, danach ligiert und als DNA-Template eingesetzt. Dadurch, dass die Primer nach außen gerichtet sind, beinhalten die PCR-Produkte neue, noch unbekannte Sequenzinformationen. Nach Sequenzierung dieser PCR-Produkte können neue Oligonukleotide konstruiert werden. Das Verfahren wird dabei so oft wiederholt bis die gewünschte Gensequenz komplett bekannt ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und nähere Charakterisierung einiger ausgewählter Proteine, deren Konzentration in den Zellen von *L. sanfranciscensis* unter Hochdruck zunahm und die somit aktiv an einer möglichen Stressantwort beteiligt sein könnten. Darunter befinden sich typische Stressproteine wie ClpL, ClpX, DnaK oder GroEL. Aber auch ein im Zusammenhang mit Stressreaktionen bisher noch nicht beschriebenes Protein mit Homologie zu Ribokinasen (RbsK) sollte charakterisiert werden. Außerdem wurde auch der Transkriptionsregulator CtsR analysiert, der bei Milchsäurebakterien an der Regulation verschiedenster Stressgene beteiligt ist.

3.5.1 Ribokinase / Ribose-5P-Isomerase (P1)

Ausgehend von der Peptidsequenz des Proteins P1 (Tabelle 3.4) konnte nach mehreren Zyklen inverser PCR der komplette Leserahmen des entsprechenden Gens mit einer Länge von 1623 Basenpaaren identifiziert werden (Abbildung 3.5).

```

ATGAAAAAATTATTGTCGTCGGTTCGACTAATGTAGATAAAGTTCTAAATGTTGAAAAATATGCCCTTCCAGGTGAAA
CTTTGGCTATTAATACTTACCAACAATCACATGGTGGTGGTAAAGGTGCTAACCAAGCTATTGCAGCTGCTCGTTCTG
GAGCAGACACTACATTTTACTAACTAGGTAATGATGAAGATGCGAAAATGATGGTTAAGGGTTTTAAAGCAGACG
GAATGAATATTGACGATGTGATTACAACCACCGATCAAGAAACCGGAAAAGCTTACATCACTGTTGATAAATCAGGTCA
AAATTCGATTTATGTCTATGGTGGTGCAAATATGGCCATGACTCCTACTGATGTTGACGCCACAAAATCGGCAATTATT
AATGCTGATCGTGAATTTGCTCAATTGGAAATTCCTGTTCCAGCAGTTATTGAGGCCTTAAGATTGCGAAAGAATG
GCGTACAGACGATTTTGAACCCAGCTCCTGCTAAGGAACCTCCAGAAGAATTACTAAAATTAACAGATATTACTCC
TAATGAATCAGAAGCAGCAACCTTAACTGGAATTGAAGTTAAAGATGAAACATCGATGTTAGCCAATGCAAAAATCTTC
TTTGAAGAGGAATTAAGATGGTTATAATCACCGTTGGTGGCGTGGCTCGTTTTTGTACCCAGATGACCATGCT
TTAATTCACCATTCCAGCAAAGGTAGTTGATACTACTGCAGCCGGAGATACCTTTATTGGTTCTCTTGCATCACAAC
TAGAAATTGATTTGTCAAATATTCGAAAAGCAATGCTTTATGCTAGTCATGCTTCATTAATACTATTCAAGTTGCAGGT
GCACAGAATTCAATTCACCCAGAGAAGCAATTTGAATGTCATTAATCAAGATCAGATGACTAAAACAGAAATTGAAA
AACAAAAAGCTCAAGCTGCAGCCTATGCTGCTAACTTGTCTGACCATATTGTATTGGGATTGGGATCAGGAACAA
CAGCTGCTTACTTTGTTAAAGCCATTAATCAACGAATCAATGATGAGCATTAGATATTCAATGTGTTGCAACTTCAGT
GGGGACAGAAAAATTAGCTGAAAAGTTGGGCATGCGGATGTTAGATGTTAACTATTGATCAAGTAGATTTAACGGT
TGATGGTGC GGATGTTGTTGATCATCAACTTAACGGAATTAAGGTGGTGGTGCAGCACTACTATTTGAAAACTTGT
GCTGATATGTCTAAGCAAAATATCTGGATTGTTGATCAGAGTAAATACACCGATTCTTTAGCTGGGCATATTTAAACAA
TTGAAGTAATTCCTTTTGGTGAATGGGAGTCTTTCGTTATTTGAAGGAAAATGGATATCAACCAGAATTTGCTTTAA
AGATAACGGTGATATATTGGAACTGATTCAGGTAATTATTTAATTAACATTATCATTCCAAAAGATGCTGACTTAGAAA
AATTATCCATTGATTTGAAGAAGCAAACCTGGAGTAGTAGAACACGGGTTGTTCTTAAATGTTTGTGACGAATTAATTATT
GGTGGAGATCAAATTAACAATTAAGCGTTCAGATCTATCTTAA

```

Abbildung 3.5 Komplette Gensequenz des zu einer Ribokinase homologen Proteins P1 aus *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz wurde ausgehend von der Aminosäuresequenz eines internen Peptidfragments mittels inverser PCR aufgeklärt. Start- und Stopkodon der 1623 bp langen Sequenz sind unterstrichen.

Eine Southern Blot Analyse, bei der die *EcoRV* geschnittene chromosomale DNA drei verschiedener Stämmen von *L. sanfranciscensis* (TMW 1.52, 1.53 und 1.392) aufgetrennt und mit einer für dieses Gen spezifischen DIG-markierten DNA Sonde hybridisiert wurde, ergab in allen Fällen ein einzelnes, deutliches Signal mit einer Größe von ca. 3500 bp (Abbildung 3.6). Da in der DNA Sequenz der Sonde keine *EcoRV* Schnittstelle vorhanden ist, konnte davon ausgegangen werden, dass nur eine einzige Kopie dieses Gens im Chromosom von *L. sanfranciscensis* vorkommt. Auch Pseudogene, die bei den gewählten Bedingungen mit der spezifischen Sonde hybridisieren könnten, sind im Genom von *L. sanfranciscensis* anscheinend nicht existent.

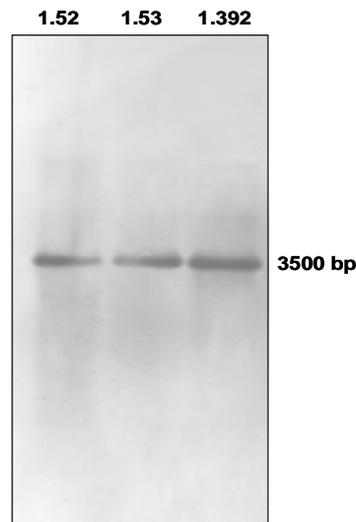


Abbildung 3.6 Southern Blot Analyse mit einer für das Gen *pI* spezifischen Sonde. Die mit *EcoRV* geschnittene chromosomale DNA drei verschiedener Stämme von *L. sanfranciscensis* (TMW 1.52, 1.53 und 1.392) wurde im Agarosegel aufgetrennt und mit einer für das Gen *pI* spezifischen Sonde hybridisiert. Die Größe des Signals wurde mit einem DNA Standard bestimmt und ist am rechten Bildrand dargestellt.

Das Gen kodiert für ein Protein bestehend aus 540 Aminosäuren (Abbildung 3.7). Durch Berechnung der Werte für das gesamte Protein P1 wurde ein theoretischer isoelektrischer Punkt von 4,99 und ein molekulares Gewicht von ca. 58,1 kDa ermittelt. Somit stimmt das berechnete Molekulargewicht mit dem aus den 2D-Gelen abgeschätzten Gewicht des Proteins P1 überein. Der Grund für das hohe Molekulargewicht im Vergleich zu allen bisher bekannten Ribokinasen wird ersichtlich, wenn man die gesamte Sequenz des Proteins auf Homologien untersucht. Eine „blastp“-Datenbanksuche zeigte, dass zwei konservierte Domänen in dem Protein vorhanden sind.

```

MKKIIVVGSTNVDKVLNVEKYALPGETLAINTYQQSHGGGKGANQAIAAARSGADTTFITKLGNDEDAKMMVK
GFKADGMNIDDVITTTDQETGKAYITVDKSGQNSIYVYGGANMAMTPTDVAHKSAINADR VIAQLEIPVPAVI
EAFKIAKEHGVQTILNPAPAKELPEELLKLDIITPNESEAAATLTGIEVKDETSMLANAKFFFERGIKMVIITVGGR
GSFFATPDDHALIPPPAKVVDTTAAGDTFIGSLASQLEIDLSNIRKAMLYASHASSLTIQVAGAQNISIPTREAIL
NVINQDQMTKTEIEKQKAQAAA YAAKLVDPDHIVLGLSGGTTAA YFVKAINQRINDEHLDIQC VATSVGTEKLAE
KLGMRMLDVNTIDQVDLTVDGADVVDHQLNGIKGGGAALLFEKLVADMSKQNIWIVDQSKYTD SLAGHILTIE
VIPFGGMGVFRYLKENG YQPEFRFKDNGDILETDSGNYLINIIPKDADLEKLSIDLKKTGVVEHGLFLNVCDE
LIIGGDQIKTIKRS DLS
  
```

Abbildung 3.7 Komplette Aminosäuresequenz des Proteins P1 aus *L. sanfranciscensis*. Das theoretische Molekulargewicht der Sequenz beträgt 58,1 kDa und besitzt einen berechneten isoelektrischen Punkt von 4,99. Die mittels Edman-Abbau ursprünglich ermittelte Peptidsequenz ist unterstrichen. Der vordere Teil des Proteins weist hohe Homologien zu Ribokinasen auf. Der hintere Teil des Proteins (kursiv dargestellt) besitzt große Übereinstimmungen mit verschiedenen Ribose-5-P-Isomerasen.

Die ersten 308 Aminosäuren (924 bp) besitzen sehr hohe Ähnlichkeit zu verschiedenen Ribokinasen aus unterschiedlichsten Organismen. Das für diesen Proteinteil berechnete Molekulargewicht liegt mit 32,8 kDa in der gleichen Größenordnung wie es für Ribokinasen typisch ist. Auch der *pI* von 5,0 stimmt mit dem von anderen Ribokinasen überein.

Die Analyse der zweiten Domäne des Proteins zeigte dagegen sehr hohe Übereinstimmungen mit Ribose-5-Phosphat-Isomerasen aus unterschiedlichen Organismen. Die berechneten Werte für die 232 Aminosäuren (696 bp) große Enzymdomäne ergeben einen isoelektrischen Punkt von 4,96 und ein Molekulargewicht von 25,4 kDa. Damit besteht auch hier eine gute Übereinstimmung mit Werten anderer Ribose-5-Phosphat-Isomerasen.

Um zu überprüfen, ob das in dieser Form erstmals beobachtete „2-Domänen-Enzym“ auch tatsächlich die vorhergesagten Funktionen einer Ribokinase und einer Ribose-5-P-Isomerase besitzt, wurde eine biochemische Charakterisierung des Proteins P1 durchgeführt. Dazu wurde die Gensequenz des gesamten Proteins, bzw. die Sequenzen der beiden einzelnen Enzymdomänen jeweils in einen Expressionsvektor kloniert und heterolog in *E. coli* überexprimiert. Als Expressionssystem wurde zunächst das Plasmid pET3a (Novogen) zusammen mit dem *E. coli* Expressionsstamm BL21 Lys (DE3) gewählt. Die entsprechenden Gene wurden bei diesem Vektor vor einen mit IPTG induzierbaren Promotor kloniert. Gleichzeitig wurde dabei die Sequenz für sechs Histidine an das Ende des Gens angehängt. Aufgrund der hohen Affinität des so genannten 6xHis-tags zu Nickel war es möglich nach der induzierten Genexpression die heterologen Proteine mit einer entsprechenden Säule mittels FPLC zu reinigen (siehe Abbildung 3.8).

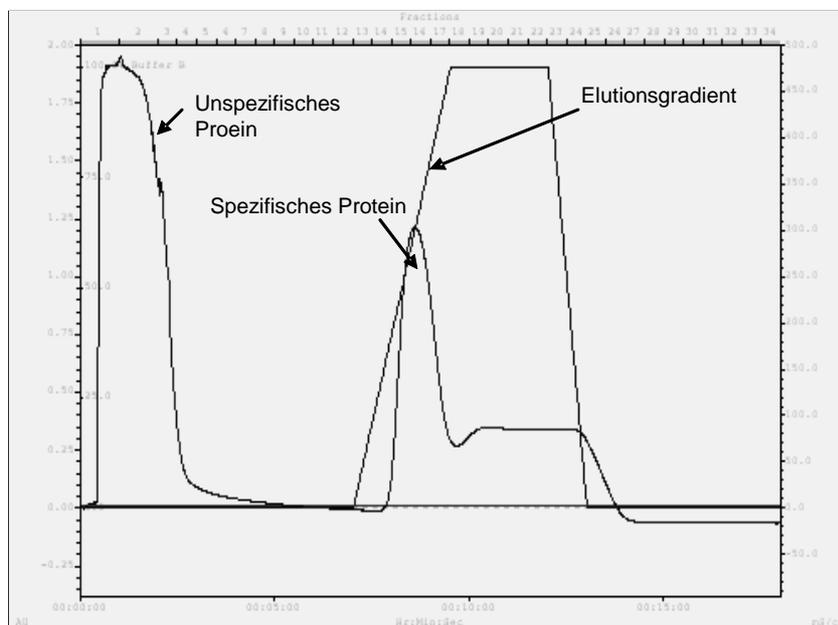


Abbildung 3.8 Typisches FPLC-Chromatogramm der Aufreinigung eines Proteins (am Beispiel RbsK) mit 6xHis-tag mittels einer Ni-Sepharose Säulen. Nach Auftragung des gesamten Proteinrohextraktes wurde solange mit Puffer gespült, bis alle unspezifischen Proteine von der Säule gewaschen sind und nach dem ersten Peak die Nulllinie wieder erreicht ist. Danach wurde die Konzentration des Elutionspuffers langsam von 0% auf 100% erhöht (Elutionsgradient). Das spezifische Protein wurde von der Säule eluiert und in den jeweiligen Fraktionen gesammelt. Um die Konzentration des spezifischen Proteins zu erhöhen, kann die Beladung der Säule mit dem Proteinextrakt vor der Elution ebenfalls erhöht werden.

Die Expression und Aufreinigung der beiden einzelnen Domänen (Ribokinase bzw. Ribose-5-P-Isomerase) war sehr erfolgreich (Abbildung 3.9). Während hier die Reinheit und Ausbeute der jeweiligen Proteine sehr hoch waren, konnte das gesamte Protein P1 aufgrund der Bildung so genannter „inclusion bodies“ zwar heterolog in *E. coli* exprimiert, mit den zur Verfügung stehenden Mitteln aber nicht aufgereinigt werden. Weder die Zugabe von Sorbit zum Medium, noch Veränderungen der Induktions- bzw. Inkubationsbedingungen nach der Induktion (Temperatur, IPTG-Konzentration, O₂-Versorgung) führten zu einer Verbesserung.

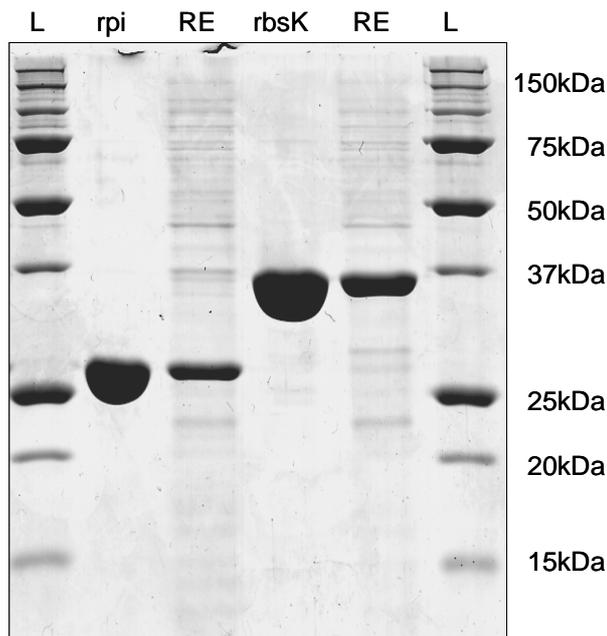


Abbildung 3.9 Auftrennung der Proteinextrakte der beiden einzeln überexprimierten Enzymdomänen RbsK (Ribokinase) und Rpi (Ribose-5-P-Isomerase) des Proteins P1. Für die heterologe Expression in *E. coli* BL21 Lys (DE3) wurde der Vektor pET3a verwendet und mit IPTG induziert. Es wurde jeweils 1 µl der verschiedenen Proteinlösungen aufgetragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blue gefärbt. „L“ = Größenstandard; „RE“ = Rohextrakt nach Induktion; „rpi“ / „rbsK“ = jeweils gereinigte Proteinlösung.

Aus diesem Grund wurde das komplette Gen in alternative Expressionsvektoren kloniert und versucht in verschiedenen *E. coli* Stämmen heterolog zu exprimieren. Zwar war eine schwache Expression mit dem Vektor pGEX 4T-1 (GE Healthcare) möglich (nicht gezeigt), ein deutlich besserer Erfolg konnte aber mit dem Expressionssystem bestehend aus dem Expressionsstamm *E. coli* TOP10 und dem Expressionsvektor pBAD/*Myc*-His A (Invitrogen) erreicht werden. Dieser Vektor besitzt einen durch Arabinose induzierbaren Promotor. Aufgrund der schwächeren Induktion der Genexpression im Vergleich zum IPTG induzierbaren Promotor war mit diesem System die Proteinmenge zwar geringer, dafür wurden aber keine „inclusion bodies“ gebildet und die etablierte Aufreinigungsmethode mittels Ni-Affinitätschromatographie konnte aufgrund des vorhandenen His-tags trotzdem durchgeführt werden (Abbildung 3.10). Die Molekulare Größe des gesamten Proteins von ca. 63 kDa stimmt mit dem Wert aus den 2D-Gelen überein und entspricht der Summe der beiden einzelnen Domänen (RbsK ca. 35 kDa, Rpi ca. 28 kDa).

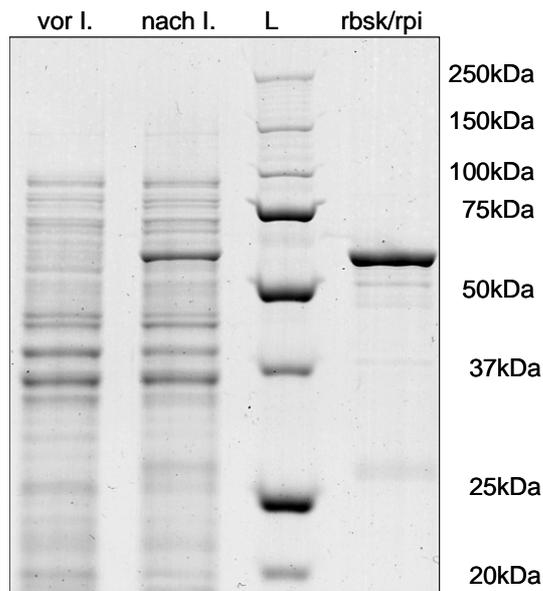


Abbildung 3.10 Auftrennung der einzelnen Proteinextrakte vor und nach Expression des Proteins P1 bzw. nach Aufreinigung.

Für die heterologe Expression in *E. coli* TOP10 wurde der Vektor pBAD/Myc-His A verwendet und mit Arabinose (10 mM) induziert. Es wurden jeweils 3 μ l der verschiedenen Proteinlösungen aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blue gefärbt.

„L“ = Größenstandard; „vor I.“ = Rohextrakt vor Induktion mit Arabinose; „nach I.“ = Rohextrakt nach Induktion mit Arabinose; „rpi/rbsK“ = gereinigtes Protein P1 mit beiden Domänen;

Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung des gesamten Proteins P1, bzw. der beiden einzelnen Proteindomänen, sollte im Anschluss daran die Funktion mittels geeigneter Enzymtests untersucht werden.

Für den Nachweis der Ribokinase-Aktivität wurde ein pH-Wert abhängiger Nachweis gewählt (Andersson 2004). Da bei der Reaktion von Ribose mit ATP zu Ribose-5-P und ADP ein H^+ freigesetzt wird, findet eine Ansäuerung des Mediums statt. Durch Änderung der Farbe des pH-Indikators Phenolrot und somit durch eine Absorptionsveränderung bei 448 nm kann die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Zeit gemessen werden. Nach Zusammensetzung des Reaktionspuffers (KCl, Mg_2Cl , ATP, Phenolrot und Enzymlösung) wurde direkt in der Reaktionsküvette mit NaOH der pH-Wert auf 6,6 eingestellt. Die eigentliche Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe der Ribose als Substrat gestartet (Kapitel 2.2.2.9).

Wurde die Reaktion unmittelbar nach Ansetzen des Puffers gestartet, kann erst nach einer gewissen Zeit (5 bis 60 min nach Reaktionsstart) eine Absorptionzunahme gemessen werden (in Abbildung 3.11 a) nach ca. 22 min). Die Zeitdauer scheint dabei indirekt proportional zur eingesetzten Enzymmenge zu sein.

Wurde die Reaktion hingegen erst nach einer gewissen Inkubation des Enzym-Puffer-Gemisches durch die Zugabe der Ribose gestartet, ist eine Absorptionsänderung bei sonst gleichen Bedingungen schon nach kurzer Zeit messbar (in Abbildung 3.11 b nach ca. 2,5 min).

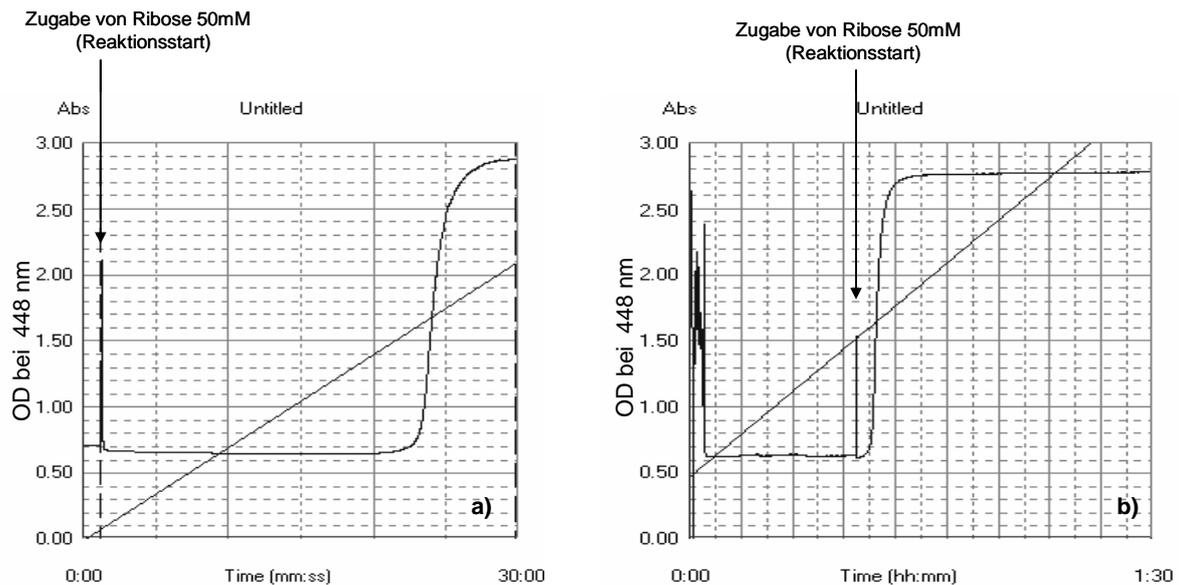


Abbildung 3.11 pH-Wert abhängiger, chromogener Assay zur Messung der Ribokinaseaktivität mittels Absorptionmessung bei 448 nm. Eine durch Ansäuerung des Mediums verursachte Farbveränderung des pH-Indikators Phenolrot wird in Abhängigkeit der Zeit gemessen. a) Bei unmittelbarem Reaktionsstart nach Zusammensetzung des Enzym-Ansatzpuffers vergeht eine längere Dauer bis zu einer messbaren Absorptionsänderung. b) Wird der Start der Reaktion nach dem Ansatz des Puffers verzögert, findet die Änderung der Absorption unmittelbar darauf statt.

Die Versuche wurden mit verschiedenen Enzymmengen unter ansonsten identischen Bedingungen jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit zunehmender Enzymmenge die Zeit zwischen Reaktionsstart und messbarer Absorptionsänderung proportional abnimmt und die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend zunimmt. Wurde die Menge des Substrates Ribose verändert, konnte ebenfalls eine deutliche Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Dies war sowohl in der Zeit zwischen Reaktionsstart und messbarer Absorptionsänderung, als auch in der Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Zeit (Steilheit der Kurve) ersichtlich (Abbildung 3.12).

Durch erneute Zugabe von Ribose zu einem Ansatz, bei dem die Absorptionsänderung bereits ein Plateau erreicht hat, konnte eine weitere, sofort einsetzende Absorptionzunahme gemessen werden. Dies konnte solange wiederholt werden bis der pH-Wert so niedrig ist, dass der Reaktionsansatz aufgrund des vollen Farbumschlags des Indikators eine tiefrote Färbung besitzt und die OD_{448} bei ca. 3,5 liegt.

Die Zugabe von Enzym, welches für 5 min bei 85°C inaktiviert wurde, führte zu keiner Veränderung der optischen Dichte. Alle Versuche wurden nicht nur mit dem gereinigten Protein P1, sondern auch mit der gereinigten Ribokinase-Domäne alleine durchgeführt.

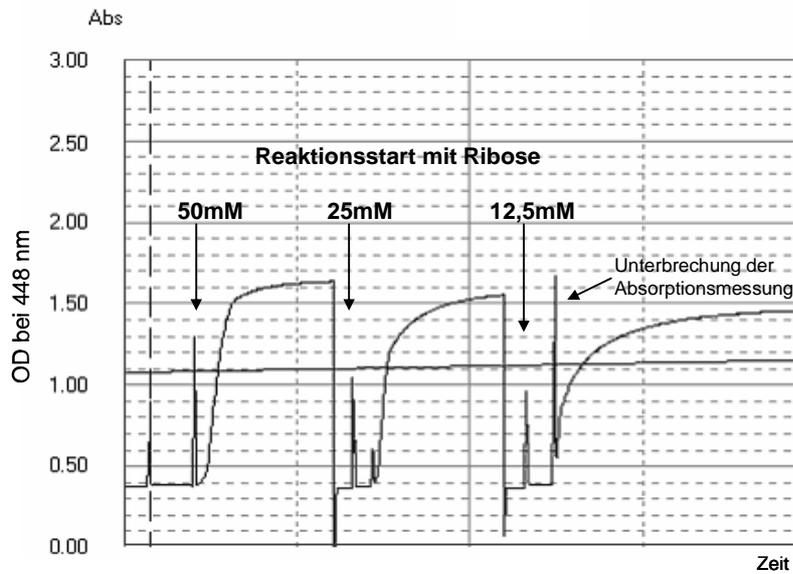


Abbildung 3.12 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Ribokinase in Abhängigkeit der Substratkonzentration Ribose. Mit abnehmender Substratkonzentration (50 mM bis 12,5 mM) konnte eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit sowohl durch eine verringerte Absorptionsänderung über die Zeit, als auch durch eine Zunahme der Zeit zwischen Reaktionsstart und messbarer Absorptionsänderung festgestellt werden. Analoge Beobachtungen wurden bei konstanten Substratkonzentrationen und steigenden Enzymkonzentrationen gemacht (ohne Abbildung)

Für die Messung der Ribose-5-P-Isomerase (RPI) Aktivität stand keine geeignete Nachweismethode zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde versucht die Phosphorylierung von Ribose zu Ribose-5-P und die weitere Isomerisierung zu Ribulose-5-P mittels HPLC-Analyse nachzuweisen. Dazu wurden die einzelnen Zucker auf einer AminoPac PA10 Säule (Dionex) aufgetrennt. Erste Versuche wurden mit Ribose als Standardsubstanz durchgeführt (Abbildung 3.13). Eine reine, 1:1000 verdünnte Riboselösung (100 mM Ausgangskonzentration) ergab dabei einen eindeutigen Peak nach ca. 11 min (Abbildung 3.13/1). Der Zusatz der benötigten Puffersubstanzen (KCl, Mg₂Cl, ATP) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Elutionszeit (Abbildung 3.13/2). Auch nach Zugabe des durch Hitze inaktivierten Enzyms mit Ribokinase-Aktivität konnte nur der eine Elutionspeak beobachtet werden (Abbildung 3.13/3). Erst nach Zugabe des gereinigten Proteins P1 bzw. der Ribokinase-Domäne des Proteins P1 und nach entsprechender Inkubation, konnte eine Abnahme des Ribose-Peaks und das Auftreten eines neuen Peaks nach 41 min Elution beobachtet werden (Abbildung 3.13/4).

Besitzt das zugegebene Enzym die vermutete Ribokinase-Aktivität, sollte der neu entstandene Peak auf die Entstehung von Ribose-5-P zurückzuführen sein. Die eindeutige Bestätigung konnte nur mit einem Ribose-5-P Standard erbracht werden. Daher wurde eine Ribose-5-P Referenzsubstanz erworben und weitere Analysen durchgeführt (Abbildung 3.14).

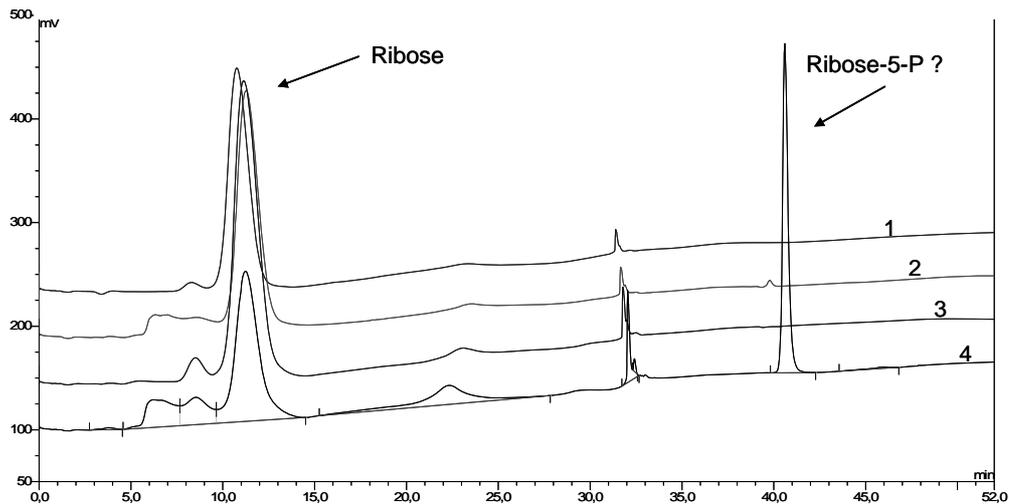


Abbildung 3.13 Qualitative Messung der Ribokinase-Aktivität mittels HPLC-Analyse (AminoPac). „1“ = Ribose-Eichlösung; „2“ = wie „1“ + Puffersubstanzen; „3“ = wie „2“ + inaktives Enzym mit Ribokinase-Aktivität; „4“ = wie „2“ + aktives Enzym mit Ribokinase-Aktivität → neuer Peak;

Dabei zeigte sich, dass eine Pufferlösung, bestehend aus ATP, KCl, Mg_2Cl und gleichen Anteilen von Ribose und Ribose-5-P die zwei beobachteten Peaks nach ca. 11 min und ca. 41 min besitzt (Abbildung 3.14/1). Gab man zu einer Pufferlösung mit Ribose-5-P als einzigem Zucker intaktes Enzym mit Ribokinase-Aktivität, konnte nur der Ribose-5-P Peak detektiert werden (nicht abgebildet). Das gleiche Ergebnis erhielt man, wenn inaktiviertes Protein P1 oder inaktiviertes Protein, welches nur die RPI-Domäne besitzt, in den Ansatz gegeben wurde (Abbildung 3.14/2).

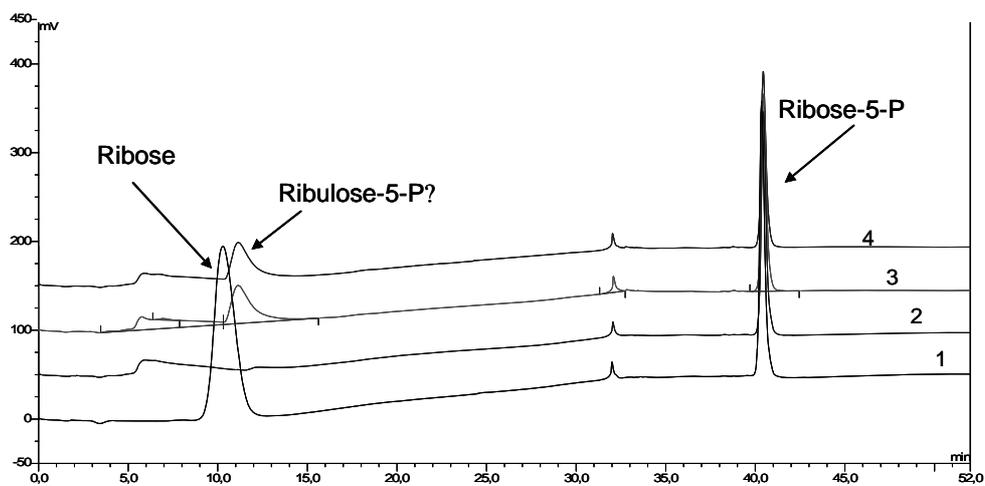


Abbildung 3.14 Qualitative Messung der Ribose-5-P-Isomerase-Aktivität mittels HPLC-Analyse (AminoPac). „1“ = Ribose- + Ribose-5-P-Eichlösung + Puffersubstanzen; „2“ = Ribose-5-P in Reaktionspuffer + denaturiertes Protein P1 bzw. Protein mit Ribose-5-P-Isomerase-Aktivität; „3“ = wie „2“ + aktives Enzym P1 → neuer Peak; „4“ = wie „2“ + aktives Enzym mit Ribose-5-P-Isomerase-Aktivität → neuer Peak;

Wurde hingegen aktives Protein P1 dem Ansatz mit Ribose-5-P zugesetzt, trat ein zusätzlicher Peak bei ca. 12 min auf (Abbildung 3.14/3). Ein identisches Ergebnis zeigte sich auch nach Zugabe des aktiven Proteins mit der RPI-Domäne alleine (Abbildung 3.14/4).

Auch in diesem Fall konnte der neu entstandene Peak (12 min) nur nach Analyse der entsprechenden Standardsubstanz Ribulose-5-P zugeordnet werden. Nach Beschaffung einer mindestens 80% reinen Ribulose-5-P Probe war die endgültige Zuordnung aller drei Zucker möglich (Abbildung 3.15). Dazu wurden neben einem Gemisch aus Ribulose-5-P und Ribose-5-P auch beide Substanzen einzeln aufgetrennt (Abbildung 3.15/1-3). Um den nur geringen Unterschied der Elutionszeit zwischen Ribulose-5-P und Ribose deutlich zu machen (vgl. dazu auch Abbildung 3.14), wurde im selben HPLC-Lauf zusätzlich noch eine Ribose-Lösung analysiert (Abbildung 3.15/4). Auch wenn die Peaks von Ribose und Ribulose-5-P sehr nahe beieinander liegen, ist ein eindeutiger Unterschied zu erkennen.

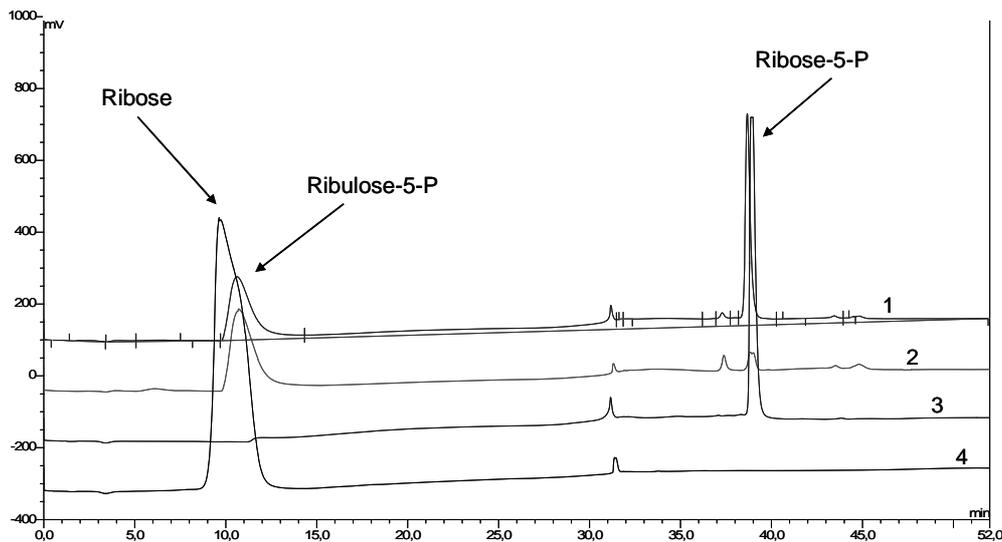


Abbildung 3.15 Qualitative Messung von Ribose, Ribose-5-P und Ribulose-5-P mittels HPLC-Analyse (AminoPac). „1“ = Ribose-5-P + Ribulose-5-P; „2“ = Ribulose-5-P; „3“ = Ribose-5-P; „4“ = Ribose;

Somit konnte gezeigt werden, dass die Aktivitäten des Proteins P1 bzw. die seiner einzelnen Untereinheiten mit den Vorhersagen übereinstimmen. Neben der Bildung von Ribose-5-P aus Ribose durch die Ribokinase konnte auch die Isomerisierung zu Ribulose-5-P durch die Ribose-5-P-Isomerase gezeigt werden. Darüber hinaus konnte auch die umgekehrte Reaktion von Ribulose-5-P zu Ribose-5-P sowohl durch das komplette Protein P1, als auch durch die RPI-Domäne alleine nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.5.2 ATP-abhängige ClpL Protease (P2)

Die gefundene Peptidsequenz des hochdruckinduzierten Proteins P2 besitzt starke Homologien zu ClpL-Proteasen (Tabelle 3.4). Um diesen Befund zu verifizieren, wurde auch dieses Protein näher charakterisiert. Aus der internen Peptidsequenz abgeleitete, degenerierte Oligonukleotide wurden dabei als Primer für eine erste inverse PCR Reaktion verwendet. Nach Sequenzierung des PCR Produkts und anschließender Durchführung weiterer inverser PCR-Reaktionen konnte die komplette Gensequenz inklusive Stopkodon mit einer Größe von insgesamt 2142 bp identifiziert werden (Abbildung 3.16).

```

ATGGCAAACAACGGTTTTGGAAACGACCCATTTGGCGGAAGCGGAATGGATGACATTTTCAATAGTTTATTTAACAAACA
TGGGAAATGACGCAAATGCTCGTTACTCTGTTAATGGACACGTAATACTCCTGAACAAGTCGCAGAAATGCGTAGAAC
AGGTCAAATCCTGGTCAAATGGTAGTCATAACGGTGCTACCCCTACTCAAGCAAAACAACAACAAAAGGCAGAAAAGT
TACCTTGATAAAATTGGCCGTAACCTAACTGATGAAGCTAAACAAGTTTTCTTGATCCAGTTATTGGTCGTGATAAAGA
AATCAAGAAACGGCTGAAATTTAAGTCGTCGAATTAATAAACCCTAGTTGGTGATGCCGGTGTGGTAAAA
CTGCTATCGTTGAAGGTTAGCTCAAAAAATTGTTAAGGGAGATGTTCTGCAACAATTAAGACAAACAAGTTATTTCA
ATCGATCTTCTTCATTAGAAGCCGGTACTCAATACCGTGGTGCTTACGAAGAAAACATCCAAAAATTAGTTGAAGAAGT
TAAAGAACGTAAGAACGTTATCTTATTCTTTGATGAAATTCACCAAATCGTTGGAGCAGGTGCTTCAGGTGACGAACT
GGTGGTAAAGGTTTATCAGATATCTTGAAGCCAGCTCTTTCACGTGGTGAAATATCTGTAATTGGTGCTACTACTCAAG
ACGAATACCGTAACACAATTATGAAAGATGCTGCTTTAGCACGTCGTTCAATGATGTTGTAGTTAACGCTCCTAGCAAA
GACACTACTTTTGAATCTTAAAAGGAATTCGTAATCATACGAAGATCATCATCAAGTTAAATTACCAGATGATGTTTTG
AAAGCTGCAATTGAATACTCAGAACAATACATTCCTCAAAGATCATTACCTGATAAAGCAATTGATCTTATCGATATGAC
AGCTGCTCATTAGCTGCTAAGAACCCTGTTACTGACAAGTTAGTCTTGAAAAAGAACTTAAAGCTGCTAAAGCCCAA
AAAGCTGCACACGCTAAAGCTGAAAAATTCGAAGAAGCTGCTAAAGATAAAGCTAAGATTGCTGAAATCGAAAAGAAC
TTAAGAGTGAAGCTGATGACACTGAAACACCAGTTGCTAAACCTTCTGATATTGCAGATTCAAGTAGAACGTTTAACTGGA
ATTCCAGTATCACAATGAGTACTGACGATATGGAACGTTTGAAGAGTATGGACAGTCGTTTGAATCACACATCATCG
GTCAAGATGAAGCTGTTGACGCTGTAGTTGATGCCATTCGTCGTAACCGTGCTGGTTTTGATGACGGTAACCGGCCAA
TCGGTTCATTCTTATTCTGTTGGACCTACTGGTGTGGTAAAACTGAATTAGTTAAACAATTAGCAAAAGACATGTTTAAAC
GATGAAGATTCAATTATCCGCTTGATATGTCAGAATACCAAGATGAAACTGCTGTTTCAAAGATGATTGGTGCTACTGC
TGTTACGTTGGTTACAACGATAACGGTAATACCCTTACTGAACGTGTAAGAAGAAATCCTTACTCAATCGTCTTACTTG
ATGAAATTGAAAAAGCTAACCCACAAGTTATTACCCTATTACTTCAAGTAATTGATGACGGTCGTTTAACTGATGGTCAA
GGTAACGTGGTTAACTTAAAGAACACAGTTATCATTGCAACTTCAAATGCCGGATTCAGTAGTGATGCAATCACTAAGAA
CCAAAAAGAAGATATGAAGATTATGGATCGTTTACTCCATACTTCCAGACCAGAATTCTTAAACCGTTTCAACGCTATTG
TTGAATTCAGTCACTTAACTAAGGAAGACTTAAAGCAAGATTGTTGATCTTATGATTGATAACTTGAACGACACCTTAGCA
AGAAAAGACATGAAACTTGAATCAGCGATGAAGTTAAAACTGGTTGATGGAACAAGTTACGATGAAGCAATGGGTG
CTCGTCCACTCCGTCGTGTAATTGAACAACAATTACGTGATAAGATTGCTATGTTCTACTTGGATCACCAAGAAATTAAG
AATATTAAGCTGTTCTTGATCACAAGAATGACACAATTAATTAAGCTAACGAAAAAGCAAGTAAATAA

```

Abbildung 3.16 Die komplette Gensequenz des zu einer ClpL Protease homologen Proteins P2 aus *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz wurde von der Aminosäuresequenz eines internen Peptidfragments mittels inverser PCR aufgeklärt. Start- und Stopkodon der 2142 bp langen Sequenz sind fett, bzw. unterstrichen dargestellt.

Aus der Gensequenz konnte durch Translation die vollständige Aminosäuresequenz des Enzyms mit einer Länge von 713 Aminosäuren abgeleitet werden (Abbildung 3.17).

```

MANNGFGNDPFGGSGMDDIFNSLFNMGNDANARYSVNGHVLTP EQVAEMRRTGQIPG
QIGSHNGATPTQAKQQQKAESYLDKIGRNLTDEAKQGFLDPVIGRDKEIQETAELSRIKN
NPILVGDAGVGKTAIVEGLAQKIVKGDVPATIKDKQVISIDLSSLEAGTQYRGAYEENIQKLV
EEVKERKNVILFFDEIHQIVGAGASGDETGGKGLSDILKPALSRGEISVIGATTQDEYRNTI
MKDAALARRFNDVVVNAPSKDTTFFELKGIKRSYEDHHQVKLPDDVLKAAIEYSEQYIPQR
SLPDKAIDLIDMTAAHLAAKNPVTDKVSLEKELKAAKAQKAAHAKAEKFEEAAKDKAKIAEI
EKKLKSETDDTETPVAKPSDIADSVRLTGIPVSQMSTDDMERLKSMD SRLKSHIIGQDEA
VDAVVDAIRNRAGFDDGNRPIGSFLFVGPTGVGKTELVKQLAKDMFNDEDSIIRLDMSEY
QDETAVSKMIGATAGYVGYNDNGNTLTERVRRNPYSIVLLDEIEKANPQVITLLLQVIDDGR
LTDGQQGNVFNKNTVIIATSNAGFSSDAITKNQKEDMKIMDRLAPYFRPEFLNRFNAIVEFS
HLTKEDLSKIVDLMDNLDNLTARKDMKLEISDEVKNWLMEQGYDEAMGARPLRRVIEQQL
RDKIAMFYLDHQEIKNIKAVLDHKNDTIKIEANEKASK

```

Abbildung 3.17 Komplette Aminosäuresequenz (713 Aminosäuren) des Proteins P2 aus *L. sanfranciscensis*. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der Sequenz beträgt 78,9 kDa. Das gesamte Protein besitzt einen theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von 5,26. Die mittels Edman-Abbau ursprünglich ermittelte Peptidsequenz ist unterstrichen.

Um das Protein und seine Funktionen im Zusammenhang mit einer Stressantwort in *L. sanfranciscensis* im Rahmen zukünftiger Arbeiten weiter analysieren zu können, wurde versucht dieses Protein heterolog zu exprimieren und aufzureinigen. Dazu wurde das entsprechende *clpL*-Gen zunächst in den schon bewährten Expressionsvektor pBAD/*Myc*-His A kloniert, in *E. coli* TOP10 transformiert und die Expression mittels Arabinose induziert. Das exprimierte Protein konnte über das angehängte 6xHis-tags und der bereits erwähnten Ni-Affinitätschromatographie erfolgreich aufkonzentriert werden (Abbildung 3.18).

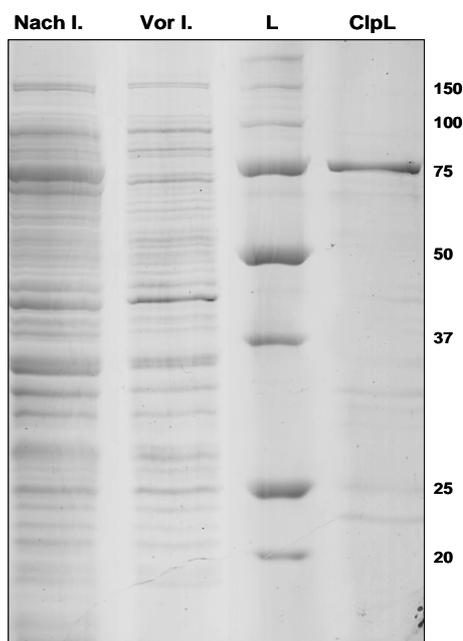


Abbildung 3.18 Auftrennung der Proteinextrakte aus der Expression des Proteins P2. Für die heterologe Expression in *E. coli* TOP10 wurde der Vektor pBAD/*Myc*-His A verwendet und mit Arabinose induziert. Es wurden jeweils 2 µl der verschiedenen Proteinlösungen aufgetragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blue gefärbt. „L“ = Größenstandard; „vor I.“ = Rohextrakt vor Induktion mit Arabinose; „nach I.“ = Rohextrakt nach Induktion mit Arabinose; „ClpL“ = gereinigtes Protein P2;

Im Acrylamidgel befindet sich das Signal des gereinigten Proteins knapp über der eines Standardproteins mit 75 kDa und stimmt somit sehr gut mit der theoretisch berechneten Größe von 78,9 kDa überein.

3.5.3 DnaK (P8)

Die Peptidsequenz des Proteinspots P8 konnte eindeutig dem DnaK Protein von *L. sanfranciscensis* zugeordnet werden, da in diesem Fall die Sequenz des zugehörigen *dnaK* Gens von *L. sanfranciscensis* bereits aufgeklärt (Dr. M. Ehrmann) und in der NCBI-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ315382 zu finden ist. Die insgesamt 1842 bp kodieren für ein Protein mit 614 Aminosäuren, das ein errechnetes, theoretisches Molekulargewicht von 66 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 4,8 besitzt. Die vollständige Sequenzierung und Charakterisierung des gesamten *dnaK* Operons inklusive dem entsprechenden Promotor, Ribosomenbindestellen und Terminator wird in Kapitel 3.6.1 ausführlich beschrieben und in den Kapiteln 4.5.3 und 4.6.3.6 diskutiert.

3.5.4 GroEL (P9)

Die 18 Aminosäuren des internen Peptids von Protein P9 besitzen eindeutige Homologien zu GroEL-Proteinen anderer Mikroorganismen. Ausgehend von dieser Sequenz wurden Oligonukleotide für die reverse PCR konstruiert. So konnte im Rahmen dieser Arbeit die komplette DNA-Sequenz des *groESL* Operons aufgeklärt werden. Neben bereits vorhandenen Sequenzdaten (persönliche Mitteilung M. Ehrmann) und zusätzlichen Sequenzinformationen aus dem Genomprojekt (Pavlovic 2006) wurde der noch fehlende Teil des Operons identifiziert (Abbildung 3.19). Der molekulare Aufbau des *groESL* Operons, bestehend aus den beiden Genen *groES* und *groEL* ist mit allen bisher bei Milchsäurebakterien identifizierten Operons dieser Art identisch. In der Sequenz zwischen den beiden Genen konnte eine potentielle Ribosomenbindestelle, aber keine eigene Promotorsequenz für *groEL* gefunden werden (Abbildung 3.19). Dies bestätigt, dass die beiden Gene auch bei *L. sanfranciscensis* in einem gemeinsamen Operon liegen, dessen Aktivität von einem Promotor reguliert wird.

```

ATGTTACAACCAATTGGTGATCGTGTAATTATTGAGGTTAAAGCTCAAGCAGAA
AAGAATATTGGTGGCATTGTTTTGGCAGAAAATGCTAAACAAAAACCAACAGAA
GGTAAGATTGTTGCAGTTGGAAGTGGTCGATTTTTAGACAACGGTGAAAAAATTG
CCCCTGTAGTTAAGAAGGGGACGTTGTGATGTTTGATAAATACGCCGGAACATA
AAATTGAATATGACGAAAAATCATATTTGGTAATGCACGAAAAATGACTTACTTGC
AATTATTAATAATACTAAAGAACAACATAATGAAGAATAAGAGGTAATTAATATGGC
TAAAGAGATTAATTTTTCTGATGACGCCCGTAGCGAAATGCTTAAAGGGGTCGA
CAAATTAGCAGATACAGTTAAAACATAATGGGTCCTAAGGGACGGAATGTCGT
TTTGGAAAGAAACAGCTGGTAACCCAACCATTACTAATGATGGGGTTACGATTGCT
CGTGCAATTTCAATGCCAGATCATTTCCAAAACATGGGTGCTAAACTAGTCGCTG
AAGTTGCATCAAAAATAATGATGTTGCTGGTGATGGTACGACAACACTGCTACGGT
TTTAACGCAAGCAATTGTTAAGAAGCGATGAAGAACGTCAGTCTGCTGGTGCTAA
CCCAGTTGGTGTTCTGCTGGAATCGAAAAAGCAACTGCAGCTGCCGTTGCTGG
GCTTCACAAGATGAGTCACAAAGTGGAAAAACAAAGAAGATATTGCTCAAATCGC
ATTGAATTCATGCCAGTGAAAAAGTTGGTAAATTAATTGCAGATGCCATGGAA
AAAGTTGGTAACGACGGAGTCATTACCATTGAAGACTCTAAAGGGGTTGAAACC
AGCCTTGATGTCGTTGAAGGAATGGAATTTGACCGTGGTTACATGTCACAATACA
TGGTAACAGCAAGAAAAGATGGAAGCAGATCTTGATAATCCATACATTTTGGT
AACCGATAAAAAGATTAACAACATGCAAGATATCATGTCAGTCTTCTCAAGAAGTT
GTGCAACAAGGTCGTTCAATGTTAATCATTGCCGATGATATTGGTGGTGAAGTTC
TTCCAACCTTGTATTAACAAGATGAGAGGAACCTTCAATGTAGTTGCTGTTAA
AGCACCTGGTTTTGGTGACCGTCGTAAGGACGAATTCTCGATATCGCTCTTTTG
ACTGGAGCAACTGTCATTACTGATGACTTAGGTCTTGAATTAAGGACACTACCT
TTGAACAATTAGGTCAAGCTAACAAAGTTAACGTTACTAAAGACAAGACTACGAT
TGTTGAAGGTAAGGGAAGCAAGAAGCCATTGCTAAACGAGTTAACGAAATTA
AACTCAAATTAGCTGCTACAACCTCACAATTTGATCGGGAAAAACTTCAAGAACGC
CTTGCTAAATTAGCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CTGAATTAAGAAGCAAGTACCGCATTGAAGATGCTTTGAACGCAACTCGTG
CTGCCGTTGAAGAAGGCTTTGTTCCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TAAAGACGTTGATGCAGTTGAAGCTACTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TGTCAGTCGGGCTTAGAAGCACCAGTAAAACAAATTGCTGCTAATGCGGGAGT
TGATGGTGGCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CAATGCTGCGGATGACAAATACGAAGATATGATTGCTGCCGAGTTGTTGATCC
AACCAAGGTTAGTCGCTCAGCACTTCAAATGCTGCATCTGTTTCATCATTGTTAT
TATTAACGACTGAAGCAGTCGTTGCTGAAAACCAGAAGAAAACAATGCTGCACC
TGCTATGCCACAAGGAATGCCTGGAATGATGTAATAAATGTAAGTACTAGCTATGTA
AAAGATAATTGTTAAATTCGTTAACTTGTCTATGTGTACATTAGTTAATGGAT
ATAGAGGAGTCTAGCTATGCTAAATCAAATATTGATAATAAATGGCTGAAAATTT
GAATTAATAGTTATAAATTATCTTA

```

Abbildung 3.19 Sequenz des *groESL* Operons von *L. sanfranciscensis*. Die Gensequenzen von *groES* und *groEL* sind fett dargestellt. Die Start- und Stopkodons der beiden Gene sind in größerer Schrift gezeigt. Eine potentielle Ribosomenbindestelle (AAGAGG) vor *groEL* ist kursiv markiert.

Die Aminosäuresequenzen von GroES und GroEL sind in den Abbildungen 3.20 und 3.21 gezeigt. Die Proteinsequenz (94 Aminosäuren) des insgesamt 282 bp großen *groES* Gens (10 kDa Chaperonin) stimmt mit bis zu 83% mit GroES Sequenzen anderer Laktobazillen überein. Die Analyse der Proteinsequenz ergibt für GroES einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,4 und ein molekulares Gewicht von 10,3 kDa.

```

MLQPIGDRVIIIEVKAQAEKNIGGIVLAENAKQKPTEGKIVAVGTGRILDN
GEKIAPVVKEGDVVMFDKYAGTKIEYDEKSYLVMHENDLLAIK

```

Abbildung 3.20 Aminosäuresequenz des Proteins GroES von *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz besitzt bis zu 83% Ähnlichkeit mit GroES Proteinen verschiedener Gram positiver Bakterien

Das 538 Aminosäuren (1614 bp) große GroEL Protein (Hsp 60) ist sehr stark konserviert und besitzt sogar bis zu 95% Ähnlichkeit mit GroEL Proteinen anderer Laktobazillen. Für GroEL liegen die theoretisch bestimmten Werte bei einem isoelektrischen Punkt von 5,2 und einem Molekulargewicht von 57,3 kDa.

```
MAKEIKFSDDARSEMLKGVDKLADTVKTTMGPKGRNVVLEETAGNPT
ITNDGVTIARAISLPDHFQNMGAKLVAEVASKTNDVAGDGTATVLT
QAIVKEAMKNVTAGANPVGVRGIEKATAAAVAGLHKMSHKVENKED
IAQIASISSASEKVGKLIADAMEKVGNDGVITIEDSKGVETSLDVVEGM
EFD RGYMSQYMVTDQEKMEADLDNPYILVTDKINNMQDIMSLLEQV
VQQGRSLLIADDIGGEVLPTLVLNKMRGTFNVVAVKAPGFGDRRKR
ILDIALLTGATVITDDLGLELKDITFEQLGQANKVNVTKDKTTIVEGKGS
KEAIAKRVNEIKTQLAATTSQFDREKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATET
ELKERKYRIEDALNATRAAVEEGFVPGGGTAFINILKDVDAVEATGDE
KTGVEIVSRALAPVKQIAANAGVDGAVVVDHSKQEKPGIGYNAADD
KYEDMIAAAVVDPTKVSRSALQNAASVSSLLLLLTTAEVVAENQKKTML
HLLCHKECLE
```

Abbildung 3.21 Aminosäuresequenz des Proteins GroEL von *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz besitzt bis zu 95% Ähnlichkeit mit GroEL Proteinen verschiedener Milchsäurebakterien

3.5.5 ClpX (P6)

Die Sequenz von *clpX* (kodiert Protein P6) war bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Allerdings existierte von diesem Gen eine Partialsequenz aus dem Genomprojekt, welche den Beginn des Gens (Abbildung 3.22) und einen kleinen Teil der davor liegenden Sequenz enthält (vgl. Kapitel 3.6.3.4).

```
ATGAGGAGATTTTTATATGTTGATGATGAAACAACAAAACAGTTACATGCTCATTTTGCGGAAAATCCCA
AGATCAAGTAAAAAAATTGTTGCTGGTCCTGGCGTTTACATTTGTAACGAGTGTATCGATTTATGTGAAC
AAATTATGGATACTGAAATTAATCCCAAAGTGCAGATGAAGAAATTGATGTTTTAACTCCTAAAGAAATC
GTTGATCGTTTTAGATCAATATGTAATTGGACAAACTGAGGCTAAAAAACATTAGCAGTCGCTGTATATAA
CCACTACATGAGAATTAAGAATTAGCAAAGCGTGATCAAGAAGATACTGAAGGTGATTCAGATATCTAT
AAGACTATTGAATCAGAAACTGAAATTCAAAAAAGCAATATTGCAATGATTGGACCAACTGGTTCAGGAA
AAACTTATATCGCCCAAACGTTGGCTAAAATTATTAACGTTCCATTTGCAATTGCAGATGCTACAACTTTGA
CAGAGGCTGGATATGTTGGCGAAGATGTCGAAAAATATTCTCTTAAAAATTATTACAAAACGCTGACTTCGAC
GTTGAACGTGCTGAACATGGAATTATTTATATTGATGAAATTGATAAAATTGCCAAAAAAGGCGAGAATGT
TTCAATTACCCGTGATGTTTCTGGTGAAGGGTTCAACAATCACTTCTTAAAAATCCTTGAAGGAACTATTG
CAAATGTTCCGCCAAAGGGTGGACGTAAAAATCCACAACAAGAATTCATTTAAAAATTGATACAAAAACAT
CCTCTTTATTGTAGGTGGA....clpX
```

Abbildung 3.22 Teil der DNA Sequenz des *clpX* Gens von *L. sanfranciscensis*. Das Startkodon ist unterstrichen.

An der Sequenzierung des kompletten Gens soll in einem nachfolgenden Projekt gearbeitet werden. Die Translation der *clpX* Teilsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz (Abbildung 3.23) und ein anschließender Homologievergleich zeigt eine Ähnlichkeit von bis zu 85% mit ClpX-Proteasen verschiedener Gram positiver Bakterien.

```
MRRFLYVDDETNKTVTCSFCGKSQDQVKKIVAGPGVYICNECIDLCEQIMDTEIKSQSADEEIDVLTPK
EIVDRLDQYVIGQTEAKKTLAVAVYNHYMRIKELAKRDQEDTEGDSDIYKTIESETEIQKSNIAMIGPTGS
GKTYIAQTLAKIINVPFAIADATTLTEAGYVGEDVENILLKLLQNADFDVERAEHGIYIDEIDKIAKKGENV
SITRDVSGEGVQQSLLKILEGTIANVPPKGRKPNQQEFIKIDTKNILFIVGG...ClpX
```

Abbildung 3.23 N-terminaler Teil der Aminosäuresequenz von ClpX aus *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz besitzt bis zu 85% Ähnlichkeit mit ClpX-Proteasen verschiedener Gram positiver Bakterien

3.5.6 CtsR-ClpC

Die Proteomanalyse zeigte, dass unter HHD zahlreiche Stressproteine wie die ATP-abhängigen Clp-ATPasen ClpX (einziges, spezifisch hochruckinduziertes Protein) und ClpL (das am zweitstärksten induzierte Protein), sowie DnaK, GroEL und eine Thioredoxin-Reduktase induziert werden. Daher war es von besonderem Interesse mehr über deren Regulation zu erfahren. Der Transkriptionsrepressor HrcA, der die Expression von Stressgenen der Klasse I reguliert, ist für *L. sanfranciscensis* bereits bekannt. Clp-ATPasen hingegen zählen zu den Stressproteinen der Klasse III, deren Genexpression in der Regel über einen so genannten CtsR-Repressor (class three stress gene repressor) gesteuert wird (Derré *et al.* 1999 und 2000). Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit dieser CtsR-Repressor bei *L. sanfranciscensis* identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurden mehrere bereits bekannte Aminosäuresequenzen von CtsR aus verschiedenen Laktobazillen mittels Alignment verglichen und konservierte Regionen des Repressors ausfindig gemacht. Durch reverse Translation in die DNA-Sequenz konnten degenerierte Oligonukleotide als Primer für inverse PCR-Reaktionen abgeleitet werden. Mittels reverser Genetik konnte neben der *ctsR*-Sequenz zusätzlich auch die komplette Sequenz des im selben Operon liegenden, nachfolgenden *clpC* Gens identifiziert werden (Abbildung 3.24).

Zwischen dem 471 bp großen *ctsR* Gen und dem 2460 bp großen *clpC* Gen liegt eine Sequenz von 18 bp, die eine potentielle Ribosomenbindestelle („GAAAGAAGG“), aber keinen eigenen Promotor für das *clpC* Gen besitzt. Beide Gene sind also in einem gemeinsamen Operon organisiert. Das Ende dieses *ctsR-clpC* Operons setzt sich aus einer Sequenz zusammen, die

eine typische „stem-loop“ Struktur ausbilden kann und von einem Abschnitt gefolgt wird, der auffallend viele Thymidin Nukleotide aufweist. Solche Sequenzabschnitte sind typisch für rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren am Ende eines Operons.

```

ATGGCAAGTCATAGTATGTCAGATACTATTGGAGAATATTTAAAAAATTGTTAGCCGAACGCGATGAAGAGGTAGAAATTCGTCGTTCA
GATATTGCGGAACACTTTGTAGTTCCTTCTCAAATTAACATATGTCATTAACACTCGGTTTACCATTACAGGACGGTTTTGTGTCCAAAGT
AAACGTGGTGGCGGTGGCTACATTAGAATTGAAAAATAAACAATTAATGAAGATTGCAATGTTTTGATCGTTTGATTGACTCAATTGGAGA
CATGATTAGTCAAAAAGATGAAGAAGATATTTTAAAACTTTACTAAATAACGGACTATTAATAAACGTGAAGTACATATGTTGCATCGA
TTCTTACTCATGATGCAATCAATGTGTCTAATTATGAGACAGAAGAAAAAGTGGCGGCAAACGTATTATCAGCTTTATTATGTCGGTTGAAA
TATGAGTGCTAGCTGAAAGAAGGCTATTTAATGGAAGACTCATTAAACACCTAGTGCAAAAAAACACTTATGATTGCGCAAGAACAAGCA
CGTGGTTTTCAACATCAATCGGTTGGAAGTGGCATTATATTGGCATTATCCATTGAAAAAGTGAATCGCTTACCAAACCTTAAATCA
ACTTTCTGTTACTGAACAGGATGTTAAAGAAGAAATGAACAAATTGCCGGTTATGGTAATTTACAAAACGACGGAACAACCTATTTGCCAT
ATTCTCCTAAGATGCGTGACATTTAAATTTAGCTGGTCAAATGCTAAACAATATGGCAGCAAACGGTTGGAACGGAACATTTGTTATTA
GCGTTAACTAGCGAAAACGAAATCGTTTCAAGAATTTAACAGCTTAGGAATTTCTCCTGAAGATGTTGTAAGATTACGATTCGGAA
AATGGGGTTCCTGATCAAGGAATACCAACTGAATCTAAGAATGATGACAAAAGAAAAACCAACGCTTGATTCAATTTGCAAAAAGATCTT
ACCAAAGCAGCTCGAGATGGCCAAGTATGCAATTTATGGGCGTGATCAAGAAGTTCGTCGTCGAATTCAAATTTAAGTCGGCGGACG
AAAAATATCCAGTTCTAATCGGAGAGCCTGGGGTTGGTAAAACAGCAATTGCAGAAGGACTAGCTCAAAAAATTGTGAAAAAGAAAGTT
CCTCAAGATATGACCAATAAACGTGTTATGGCCCTTGATATGGGAAGCCTAGTTGCAGGGACTAAATATCGTGGGGAATTTGAAACCGAC
TTAAAAAATTTAATGAAATCAAAAGTAACGGACAGCTTATTTATTTGTTGATGAATGCATACTTTAATGGAGCTGGAGGAGCAGAA
GGTGCCATTGATGCTTCTAATTTTTAAAGCCAACTTAGCTCGTGGTAAATTCAGATGATTGGGGCAACGACCTTAAATGAATACCAAAA
GCATATTGAAGCTGATGCTGCTTTAGAAGCTGCTTTTGCCACGGTACAATTTGAAGAACCTAGGGTCGATGAAGCAAGAAATTTGGCT
GGTTTACGACCAAAATCGAAGAATATCATCATGTGAAAAATCACCGATGATGCGATTAAATGCAGCTGTGGATTATCAAGTCGTTACATTA
GTGGTGCCTTTTTACCTGATAAAGCCATTGACTTGATGGATGAAGCTGCTGCTAAAGTTGCAATTGATGCAATGGGAGATTCTACTGAATTA
GTTAAGCAACACGTGAACTTGATGAAGCAAGGTGCAATAAAGATCGTGCCATTGAAGAACACGTTTTGACGATGCTGTAACTTTTCGTA
GTCAAGAACAACAACCTGAAAAATCGGTTGCTGCTAATGAAAAAGACAAAAAGAAACGTGAACATGAAAATAAGCAACATAACTATA
AACTCAAGAAAACTCAGAGTCAGTTGCGCAAATTTGCTGTAATGGACAGGCATTCCAGTTACGCACCTTAAAGAAACGGATGCAGATC
GATTGGTTAACTTGGAAAATGTATTGCATAAACGGGTGATTGGGCAAGATGAGGCGGTTACTGCAGTTGCTAAAGCAGTAAGAAGAGCTC
GAAGTGGATTGAAAGATCCTAATCGTCCAATTGGCTCATTTATTTTCTTGGACCTACTGGTGTAGGAAAAACGGAATTAGCTAAGGATTTA
GCAGAAGAAATGTTGGCTCAGAAGACGATGTAATTAGAGTCGATATGAGTGAGTACATGGAAAAATATTCTACTAGTCGTTTAGTTGGAT
CTGCTCCAGGATATGTTGGTTATGAAGAAGGAGGTCAACTAACTGAAAAAGTTAGAAAAACATCCTTACTCCGTTGTTTTGCTTGATGAAGT
GAAAAAGCACATCCAGATGCTTTAACTTGCTCTTACAAGTTCTTGATGACGGATTTCTAACTGATTCTAAAGGTCGTAAGTTGACTTTAA
AAATACAATTATCATTATGACATCTAATTTAGGTGCCACAGCGTTACGTGAACAAAAACAGTTGGTTTTGATGCCAACCGTTCAGAAAAACA
ACGATGCTGAAGTTAAACGAGTAATTCAAGAAAAATGAAGCAATTCTCCGTCCTGAATTTAAACCGAGTTGATGAACAGTTATTTTC
CATAGTTTAAACGAATCAGAATTCATCGAATTGTTAAATTGATGACCAACGTTTAGTAGATCGGGTTGAAAAACAAGGGTACATTTAAA
AATCACTCCTGCAGCCATTGATGCGGTTGCTAAAAAGGTTACAACCCAGAATACGGAGCTCGTCCTTAAAGAAGAGCACTTCAAAGTGA
AATCGAAGATCCTTAAAGTATGATGATTGTTAGCTGGTAAATTTAAACTAGGTGATAAAATCACAAATGGAGCACAAAAAGGTAATAACG
CTTACACATAAACTCCAGTTATATAGAAAAACGCCATTGAAAAATGGCGTTTTTTGTTGACGTAATGCTTACATCGCGTTAAAAATGAATTAG
TATATAGTGAATGAAATGAGTTGTTGCGATCTATGTCCGGGACACAGATTATAGTTACCCAAAAATAGATTATCTATTTTGGCTTTTTTTTG
CTTTAAATTAGCTTTTTTAGCAAATTGTAATCAAAC

```

Abbildung 3.24 Sequenz des *ctsR-clpC* Operons von *L. sanfranciscensis*. Die Gensequenzen sind fett gedruckt. Die jeweiligen Start- und Stopkodons sind größer und zusätzlich unterstrichen dargestellt. Eine Ribosomenbindestelle (RBS) vor dem *clpC* Gen und ein möglicher rho-unabhängiger Transkriptionsterminator nach dem Operon sind kursiv dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Translation der *ctsR* Gensequenz führte zu einem Protein bestehend aus 156 Aminosäuren mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von 5,13 und einem Molekulargewicht von 17,8 kDa (Abbildung 3.25). Ein Homologievergleich auf Ebene der Aminosäuresequenz zeigte eine Ähnlichkeit von bis zu 76% mit *CtsR* Sequenzen anderer Milchsäurebakterien.

```
MASHMSDITIGEYLKLLAERDEEVEIRRSIDIAEHFDVPSQINYVIKTRFTIQDGFVVQSKRGGGGYIRIEKINLME
DSNVFDRLLDSIGDMISQKDEEDILKTLNNGLLNKREVMVASILTHDAINVSNYETEKEKVRANVLSALLCRLKYEC
```

Abbildung 3.25 Sequenz des CtsR Repressor Proteins von *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz besitzt bis zu 76% Ähnlichkeit mit CtsR Proteinen verschiedener Gram positiver Bakterien

Das ClpC-Protein besitzt eine Größe von 819 Aminosäuren (Abbildung 3.26). Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 6,68 und das molekulare Gewicht bei 91,3 kDa. Die Übereinstimmung mit ClpC Proteasen anderer Gram positiver Bakterien beträgt bis zu 81%.

```
MEDSLTPSAKKTLMIAEQEQARGFQHQSVGTEHLLLALSIEKSGIAYQTLNQLSVTEQDVKEEIEQIAGYGNLQNDG
TTYLPYSPKMRDILNLAGQIAKQYGSKRVGTEHLLLALTSENEIVSSRILNSLGISPEDVRKITIRKMGVDPDQGIPTES
KNDDKEKPTLDSFAKDLTKAARDGQLDPIIGRDQEVRRAIQILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIAEGLAQKIVEKKV
PQDMTNKRYMALDMGSLVAGTKYRGEFENRLKKIINEIKSNGHVILFVDELHTLIGAGGAEGAIDASNILKPTLARG
EIQMIGATTLNEYQKHIEADAALERRFATVQIEEPRVDEAKKILAGLRPKYEEYHHVKITDDAINAAVDLSSRYISGRF
LPDKAIDLMDAAAQVRIDAMGDSTELVKQQRELDEARSNKDRAIEEQRFDDAVTFRSQEQQLEKSVAALMEKDK
KKREHENKQHNYKLKENSESVAQIVAEWTGIPVTHLKKTDADRLVNLNENLHVKRVIGQDEAVTAVAKAVRRARSG
LKDPNRPIGSFILGPTGVGKTELAKDLAEEMFGSEDDVIRVDMSEYMEKYSTSRVLVGSAPGYVGYEEGGQLTEK
VRKHPYSVLLDEVEKAHPDVFNLLLQVLDDGFLTDSKGRKVDKNTIIIMTSNLGATALREQKTVGFDANRSENN
DAEVKRVIQEKMKQFFRPEFLNRVDETVIFHSLTESELHRIVKLMTKRLVDRVEKQGYILKITPAAIDAVAKKGYNPE
YGARPLRRALQSEIEDPLSDALLAGKFKLGDKITIGAQQKGITLTHKTPVI
```

Abbildung 3.26 Sequenz der ClpC-Protease von *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz besitzt bis zu 81% Ähnlichkeit mit ClpC-Proteasen verschiedener Gram positiver Bakterien

Zur weiteren Charakterisierung von CtsR sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, den Repressor durch heterologe Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung herzustellen. Dazu wurde das kodierende Gen in den Expressionsvektor pBAD/*Myc*-His kloniert und nach Induktion mit Arabinose im *E. coli* TOP10 Expressionsstamm überexprimiert. In Abbildung 3.27 ist die erfolgreiche Expression des Proteins mit der entsprechenden Größe von ca. 18 kDa gezeigt. Es war allerdings nicht möglich, das mit einem 6xHis-tag versehene CtsR Repressorprotein mittels Ni-Affinitätschromatographie aufzureinigen. Durch wiederholte Sequenzierung der Region des Expressionsvektors, an der das *ctsR* Gen integriert wurde, konnte ein Fehler bei der Klonierung ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit die fehlende Affinität des heterologen Proteins zu erklären, besteht in der starken Tendenz des CtsR-Repressors zur Dimerisierung bzw. zur Ausbildung räumlicher Strukturen. So könnte das His-tag im Inneren eines multimeren Moleküls verborgen sein. Eine Bindung an die Säule wäre in diesem Fall nicht mehr möglich.

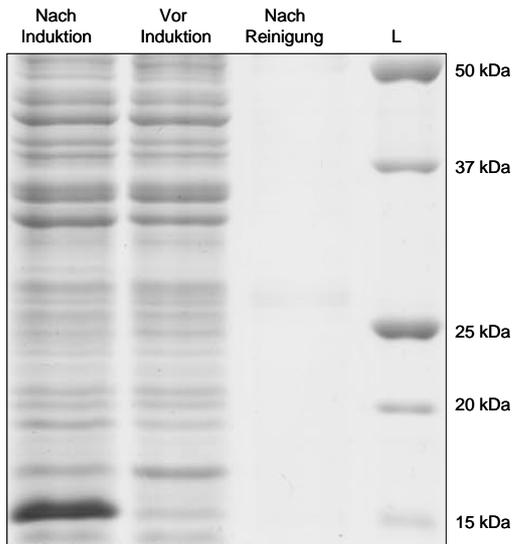


Abbildung 3.27 Auftrennung der Proteinextrakte vor und nach der heterologen Expression des Proteins CtsR. Für die Expression in *E. coli* wurde der Vektor pBAD/*Myc*-His verwendet und mit Arabinose induziert. Es wurden jeweils 3 μ l der verschiedenen Proteinlösungen aufgetragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blue gefärbt.

„L“ = Größenstandard; „vor Induktion“ = Rohextrakt vor Induktion mit Arabinose; „nach Induktion“ = Rohextrakt nach Induktion mit Arabinose; „nach Reinigung“ = CtsR konnte mittel Ni-Affinitätschromatographie nicht aufgereinigt werden;

Aus diesem Grund ist vor zukünftigen Versuchen mit gereinigtem CtsR eine Optimierung der Aufreinigungsmethode nötig.

3.6 Promotoraktivitäten unter Hochdruckstress

Um neben den Proteinen und Genen auch deren genetische Regulation unter Hochdruck und anderen Stressarten analysieren zu können, ist die Identifizierung der jeweiligen Promotorsequenzen nötig. Promotoren zeichnen sich durch Bindestellen für Transkriptions-Aktivatoren und -Repressoren, als auch für alternative σ -Faktoren aus und stellen so die Grundlage bei der Regulation der Genexpression dar. Um die Aktivität eines Promotors unter bestimmten Umweltbedingungen wie subletalen Hochdruckstress studieren zu können, werden Methoden benötigt, die eine Quantifizierung von Promotroaktivitäten ermöglichen. Neben der klassischen Methode des Northern Blots, bei der die mRNA Menge eines Gens quantifiziert wird und so Rückschlüsse auf die Aktivität des jeweiligen Promotors erlaubt, kann heute mittels DNA-Microarray das gesamte Transkriptom eines Organismus auf einem Chip analysiert und in Abhängigkeit verschiedener Inkubationsbedingungen miteinander verglichen werden. Diese komplexe Methode wurde in der Arbeit von Melanie Pavlovic genutzt, um die hochdruckinduzierte Stressantwort von *L. sanfranciscensis* zu untersuchen (Pavlovic 2006). Für die Expressionsanalyse einzelner Gene kann auch die RealTime-PCR eingesetzt werden. Während bei den erwähnten Methoden die Promotoraktivität direkt oder indirekt über die Menge an mRNA des entsprechenden Gens gemessen wird, kloniert man bei Anwendung eines Reportersystems den zu untersuchenden Promotor vor ein Gen, dessen Genprodukt leicht nachweisbar und quantifizierbar ist. Ein entscheidender Vorteil dieses Systems wird deutlich, wenn nur die Promotoraktivität von Interesse ist und ein Vergleich der Aktivitäten

verschiedener Promotoren unter denselben Bedingungen durchgeführt werden soll. Im Gegensatz zu den anderen Methoden wird hier nicht die Expression der verschiedenen Gene untersucht, sondern nur die Expression des Reportergens wird in Abhängigkeit des jeweiligen Promotors quantifiziert. Auf diese Weise lassen sich Effekte, die zum Beispiel auf unterschiedliche RNA Stabilitäten zurückzuführen sind vermeiden.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollten die Aktivitäten ausgewählter Promotoren mittels Northern Blot, RealTime-PCR und Reporterassay charakterisiert und sowohl untereinander, als auch mit Daten der Microarray-Studien verglichen werden. Neben der Konstruktion und Etablierung eines für *L. sanfranciscensis* geeigneten Reportersystems (Kapitel 3.6.1) waren darüber hinaus auch die Voraussetzungen für eine korrekte Quantifizierung der RealTime-PCR Experimente für *L. sanfranciscensis* zu schaffen (Kapitel 3.6.2).

3.6.1 Konstruktion und Etablierung eines Reportersystems

Die bisher für Laktobazillen vorhandenen Reportersysteme sind für eine sensitive Analyse der Promotoraktivitäten bei *L. sanfranciscensis* ungeeignet. Aus diesem Grund war es ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit ein neues Reportersystem für diesen Organismus zu entwickeln, das auch für den Einsatz unter Hochdruck genutzt werden kann. Das System sollte auf einem Reporter basieren, dessen Genprodukt einfach zu messen und zu quantifizieren ist. Als Vektor diente das von Posno *et al.* (1991) konstruierte Plasmid pLP3537, das sich durch Resistenzgene für Ampicillin und Erythromycin, sowie Replikons für *E. coli* und Laktobazillen auszeichnet. Der Shuttlevektor kann sowohl in *E. coli*, als auch in *L. sanfranciscensis* transformiert werden.

Die ersten Versuche dieser Arbeit *lacZ* (β -Galaktosidase) aus *E. coli* mit diesem Vektor funktionell in *L. sanfranciscensis* zu exprimieren schlugen fehl. Deshalb konnte dieses weit verbreitete Reporter gen nicht für *L. sanfranciscensis* verwendet werden. Aufgrund der Tatsache, dass *L. sanfranciscensis* keine α -Galaktosidase Aktivität besitzt und der Enzymassay analog dem *lacZ*-Nachweis verläuft, wurde das *mela* Gen aus dem nahe verwandten Stamm *Lactobacillus plantarum* DSM 20205 als Reporter gen gewählt. So steht für Promotorstudien mit dem neu entwickelten Reportersystem neben einem quantitativen chromogenen Enzymassay auch das durch den *lacZ*-Test bekannte Blau-Weiss-Screening auf Agarplatten mit X- α -Gal zur Verfügung. Ein erstes Screening ergab, dass neben *L. sanfranciscensis* auch zahlreiche andere Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc lactis* oder *Lactobacillus acidophilus* keine α -Galaktosidase Aktivität besitzen und so ebenfalls für die Anwendung dieses Reportersystems in Frage kommen.

Aus der von Silvestroni *et al.* (2002) beschriebenen Sequenz des *mela* Gens aus *L. plantarum* ATCC 8014 wurden Primer so abgeleitet, dass das entsprechende Gen aus chromosomaler DNA von *L. plantarum* DSM 20205 amplifiziert werden konnte. Dabei wurde der vorwärts gerichtete Primer so konstruiert, dass das amplifizierte Gen weder die Ribosomenbindestelle, noch das ATG-Startkodon enthält. Die beiden auf das Startkodon folgenden Basentriplets wurden zu einer *Ngo*MIV Restriktionsschnittstelle umgewandelt, so dass die zu untersuchende Promotorsequenz ohne Modifikationen durch Schnittstellen direkt vor das Reporter-gen kloniert werden konnte. Die Änderung der beiden ersten Tripletts des *mela* Gens zu einer *Ngo*MIV Schnittstelle führte dabei zum Austausch von nur einer Aminosäure. Die Aktivität von Mela bleibt nach wie vor erhalten. Der zweite Primer wurde so gewählt, dass neben dem *mela* Stopkodon auch noch die nächsten 153 bp amplifiziert wurden. Diese Sequenz bildet einen rho-unabhängigen Transkriptionsterminator. Auf diese Weise sollte die Transkription nachfolgender Gene auf dem Vektor verhindert werden. Schließlich wurde durch den Primer noch eine zusätzliche *Hind*III Schnittstelle am Ende des Amplifikats eingefügt, die für die folgenden Konstruktionen benötigt wurde. Die Sequenzierung des kompletten 2367 bp *mela*-Amplifikats aus dem hier verwendeten Stamm weist im Vergleich zur Sequenz aus *L. plantarum* ATCC 8014 acht Punktmutationen auf. Vier dieser Mutationen sind stumm, während die anderen vier zu Veränderungen der jeweiligen Aminosäuren führen. Die komplette *mela*-Sequenz ist unter der Accession No. AJ888516 in der NCBI Datenbank hinterlegt.

Die genaue Konstruktion des auf dem *mela*-Reporter-gen basierenden Promotor-Testvektors ist in Abbildung 3.28 ausführlich dargestellt. Um zu verhindern, dass das Reporter-gen durch die Aktivität stromaufwärts gelegener Promotoren transkribiert und somit das Ergebnis verfälscht wird, wurde zusätzlich noch der rho-unabhängige Transkriptionsterminator des Maltose-Operons aus *L. sanfranciscensis* direkt vor das Reporter-gen kloniert. Die Primer wurden dazu so gewählt, dass die 244 bp lange Sequenz nach der Amplifikation am 5'-Ende eine *Hind*III- und am 3'-Ende eine *Ngo*MIV-Restriktionsschnittstelle besitzt. Durch *Ngo*MIV-Restriktion und Ligation des *mela*-Amplifikats und der Terminatorsequenz entstand das 2611 bp große „Terminator-Reporter-Terminator“-Fragment mit *Hind*III-Schnittstellen an beiden Enden.

Nach Amplifikation dieses Gesamt-Konstrukts wurde es mit *Hind*III geschnitten und in den ebenfalls mit *Hind*III linearisierten *E. coli* / Laktobazillus Shuttlevektor pLP3537 inseriert. Das resultierende Plasmid pSH85350 stellt mit einer Größe von 8916 bp den grundlegenden Vektor für alle in dieser Arbeit durchgeführten Promotoranalysen dar. Aufgrund des fehlenden Promotors bzw. Startkodons ist nach Transformation dieses Vektors in die Empfängerzellen noch keine Mela-Aktivität messbar.

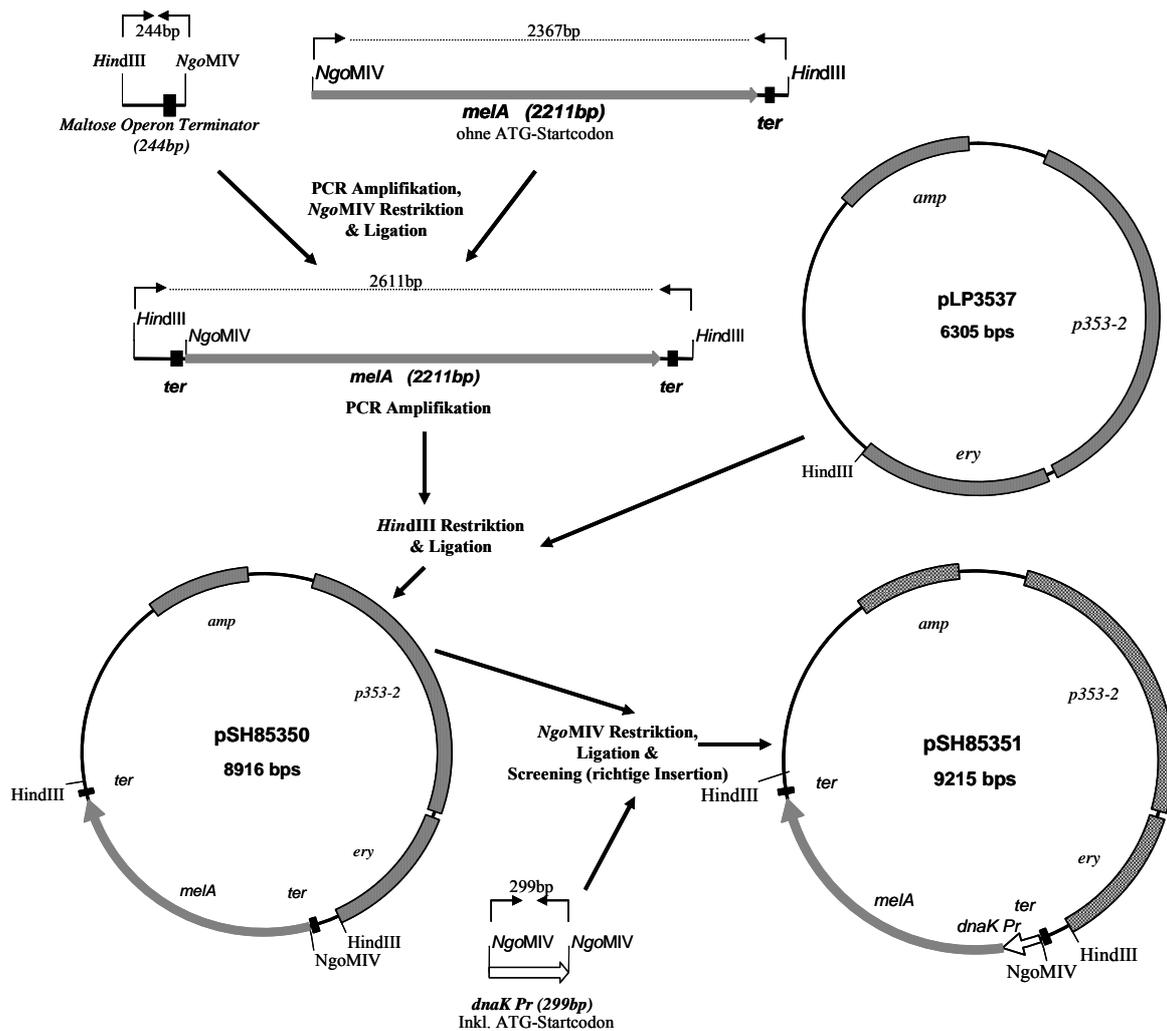


Abbildung 3.28 Konstruktion des Reportersystems für *L. sanfranciscensis*. 1. Fusion des *meIA* Reportergens aus *L. plantarum* (ohne Startkodon, aber mit Transkriptionsterminator) (2367 bp) mit dem Transkriptions-Terminator des Maltose Operons aus *L. sanfranciscensis* (244 bp). 2. Insertion dieses Konstrukts (2611 bp) in den *E. coli* / Laktobazillus Shuttlevektor pLP3537 (6305 bp). 3. In den resultierenden „Promotor-Test-Vektor“ pSH85350 (8916 bp) wird der *dnaK* Promotor (299 bp) direkt vor das Reportergen ligiert. 4. Nach Transformation in *L. sanfranciscensis* können mittels Blau-Weiß Screening α -Galaktosidase positive Stämme identifiziert werden, die den Vektor pSH85351 (9215 bp) mit dem *dnaK* Promotor in richtiger Orientierung aufgenommen haben.

Abkürzungen: *ery* = Erythromycin Resistenzgen; *amp* = Ampicillin Resistenzgen; *p353-2* = Plasmid aus *Lactobacillus pentosus* MD353, das u. a. ein für Laktobazillen geeignetes Replikon besitzt; *ter* = Sequenz für rho-unabhängigen Transkriptionsterminator;

Zur Validierung und Etablierung des Reportersystems sollte die NaCl abhängige Aktivität des *dnaK*-Promotors aus *L. sanfranciscensis* analysiert und mit den Ergebnissen klassischer Northern Blots verglichen werden. Dazu wurde die *dnaK* Promotorsequenz inklusive dem ATG-Startkodon amplifiziert (299 bp) und an beide Enden wurden NgoMIV Schnittstellen angehängt (Abbildung 3.29). So konnte die Promotorsequenz in den Vektor pSH85350 direkt vor das *meIA* Reportergen inseriert werden. Der resultierende Vektor pSH85351 ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

Die *dnaK* Promotorsequenz aus *L. sanfranciscensis* besitzt neben einer potentiellen Ribosomenbindestelle, einer -10-Region und einer -35-Region auch noch eine für Stressgene der Klasse I typische CIRCE-Bindestelle (controlling inverted repeat of chaperone expression) für den HrcA-Repressor (Abbildung 3.29).

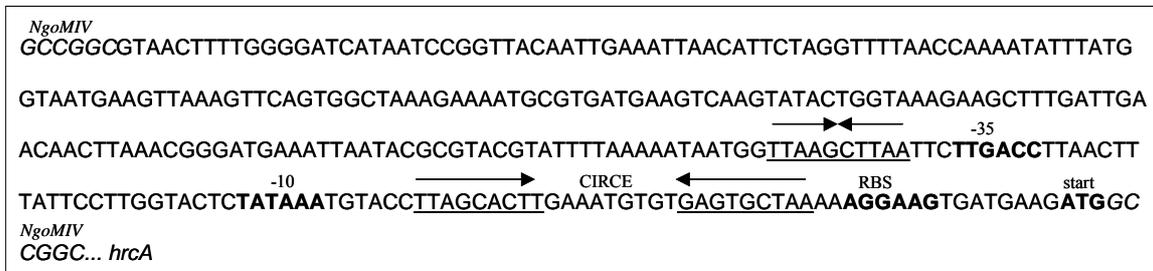


Abbildung 3.29 Promotorsequenz des *dnaK* Operons von *L. sanfranciscensis*. Eingefügte *NcoMIV* Restriktionsschnittstellen sind kursiv dargestellt. Hypothetische Ribosomenbindestelle (RBS), Startkodons und -10-Region bzw. -35-Regionen sind fett gedruckt. Invertierte Sequenzwiederholungen sind unterstrichen und mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine typische HrcA Repressor Bindestelle ist beschriftet (CIRCE).

Da die Insertion des Promotors in den Vektor nicht gerichtet erfolgt, kann der Einbau prinzipiell in beiden Orientierungen stattfinden. Nach Transformation mit dem Ligationsansatz sind die Klone, die den Vektor mit dem Promotor in richtiger Orientierung vor dem Reportergen enthalten an der blauen Färbung zu erkennen (Blau-Weiss-Selektion). Da *mela* sowohl in *E. coli*, als auch in *L. sanfranciscensis* erfolgreich exprimiert wird, kann das Screening prinzipiell mit beiden Organismen durchgeführt werden. Aufgrund der höheren Transformationseffizienz wurde das Screening mit *E. coli* in der Regel bevorzugt. Die gesuchten Vektoren wurden nach Isolierung und anschließender Überprüfung in *L. sanfranciscensis* transformiert, um Versuche zur Genexpression unter den verschiedenen Stressbedingungen durchführen zu können.

Zur reproduzierbaren Durchführung eines Enzymtests war es nötig, gleich bleibend optimale Bedingungen zu gewährleisten. Dazu wurde die α -Galaktosidase Aktivität von Zellrohextrakten bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen pH-Werten des Reaktionspuffers (McIlvaine-Puffer) bestimmt. Alle anderen Parameter wurden jeweils konstant gehalten. Die Messungen wurden an mindestens drei unabhängig voneinander gewonnenen Zellextrakten durchgeführt. Abbildung 3.30 zeigt die Ergebnisse mit verschiedenen pH-Werten bei einer konstanten Temperatur von 32°C. Der optimale pH-Wert für die α -Galaktosidase aus *L. plantarum* liegt demnach zwischen 5,2 und 5,5.

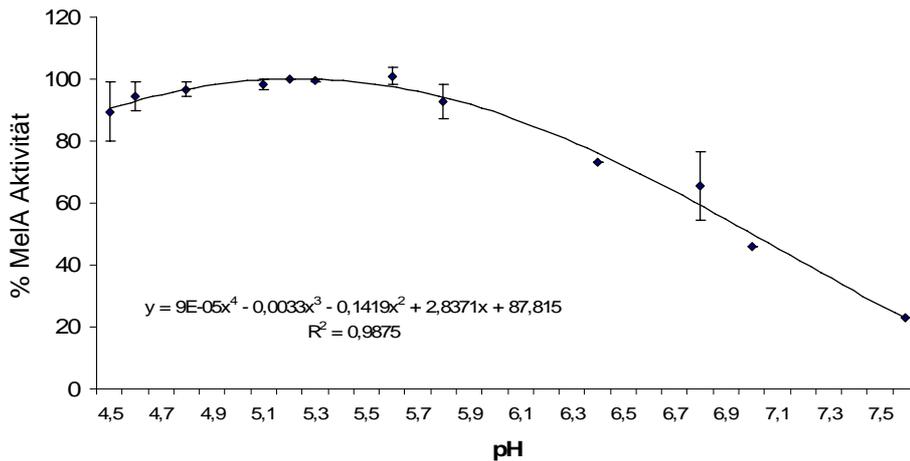


Abbildung 3.30 Auswirkung verschiedener pH-Werte des Reaktionspuffers auf die relative α -Galaktosidase Aktivität in Zellohextrakten von *L. sanfranciscensis* mit pH85351 bei 32°C. Für jeden Messpunkt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

In Abbildung 3.31 sind die Werte der relativen MeIA-Aktivität bei einem konstanten pH-Wert von 5,3 in Abhängigkeit der Temperatur gezeigt. Die für das Enzym geeignete Temperatur liegt demnach zwischen 30°C und 35°C mit einem Optimum bei ca. 32°C. Temperaturen über 37°C scheinen die Enzymfunktion irreversibel zu hemmen. Wie weitere Versuche zeigten, führt sogar die Inkubation von intakten Zellen für 10 min bei 40°C zu einer Abnahme der Enzymaktivität des daraus hergestellten Zellextraktes (Ergebnisse nicht dargestellt).

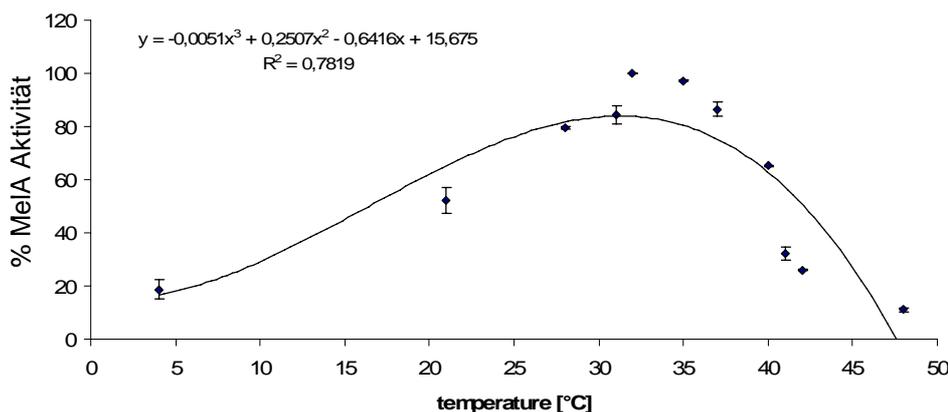


Abbildung 3.31 Relative α -Galaktosidase Aktivität in Zellextrakten von *L. sanfranciscensis* mit pH85351 in Abhängigkeit der Temperatur bei einem pH-Wert von 5,3. Für jeden Messpunkt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die MeIA Aktivität von Zellen getestet, die für 100 min in Medium mit verschiedenen NaCl Konzentration inkubiert wurden. In Abbildung 3.32 ist die prozentuale Veränderung der MeIA Aktivität in Abhängigkeit der NaCl Konzentration gezeigt.

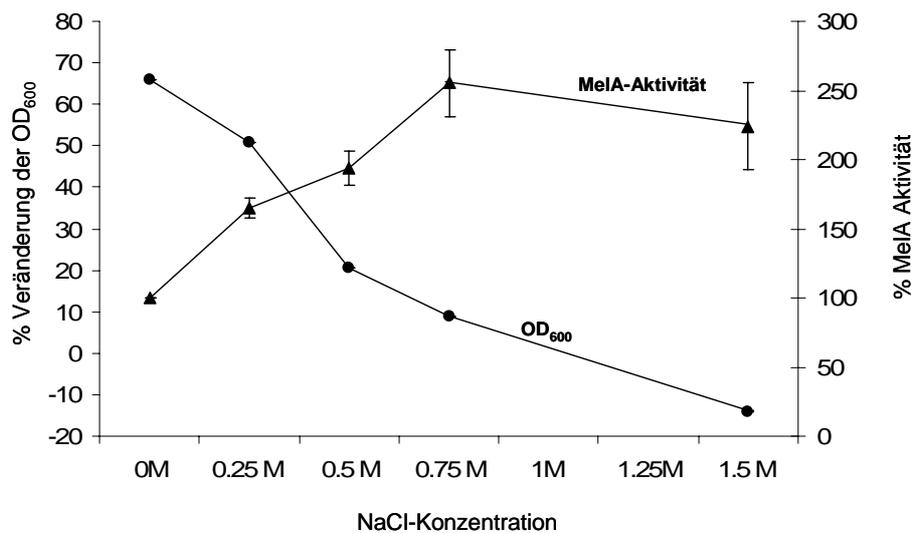


Abbildung 3.32 Relative Veränderung der α -Galaktosidase Aktivität von *L. sanfranciscensis* mit pSH85351 in Abhängigkeit der NaCl Konzentration während einer Inkubation für 100 min. Gezeigt ist auch die relative Veränderung der optischen Dichte bei 600 nm, die als Indikator für die Stärke des Salzstresses herangezogen werden kann. Für jeden Messpunkt der MelA-Aktivitäten wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Bezogen auf die Aktivität in der Kontrolle ohne NaCl (100% Aktivität) stieg die messbare α -Galaktosidase-Aktivität mit zunehmender NaCl Konzentration auf das $2,5 \pm 0,3$ fache an (0,75 M). Bei einer noch höheren Salzkonzentration von 1,5 M war eine etwas geringere Zunahme auf das ca. $2,2 \pm 0,4$ fache im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Um die ungefähre Intensität des Stresses für *L. sanfranciscensis* unter den jeweiligen NaCl Konzentrationen abschätzen zu können, wurde zusätzlich die Veränderung der optischen Dichte während der einzelnen Inkubationen gemessen (Abbildung 3.32). Während in Medium ohne NaCl (0 M; Kontrolle) die optische Dichte einer exponentiell wachsenden Kultur nach 100 min um ca. 65% zunahm, betrug in Medium mit einer NaCl Konzentration von 0,25 M die Zunahme nur noch 50%. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration führte zu einer noch stärkeren Inhibierung des Zellwachstums und betrug bei 0,5 M nur noch 20%. Bei einer NaCl Konzentration von 0,75 M war eine fast vollständige Stagnation des Zellwachstums zu beobachten (9% Zunahme) und bei 1,5 M nahm nach einer Inkubationszeit von 100 min die optische Dichte sogar um 15% ab. Dies lässt auf eintretende Lyse und somit Zelltod schließen. Zum Nachweis, dass die von der NaCl Konzentration abhängigen Veränderungen der MelA-Aktivität tatsächlich auf den *dnaK* Promotor zurückzuführen sind, wurde die Transkription des *dnaK* Operons im Wildtypstamm nach Inkubation unter den identischen Bedingungen untersucht. Abbildung 3.33a zeigt die Transkriptionsanalyse des *dnaK* Operons mittels

Northern Blot Analyse. Als DNA-Sonde wurde ein DIG-markiertes PCR Produkt des *dnaK* Gens verwendet. Um die Entstehung der vier verschiedenen Banden interpretieren zu können, wurde die vollständige Sequenz des *dnaK* Operons benötigt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit mittels inverser PCR die bereits von Ehrmann identifizierte DNA Sequenzen der Gene *hrcA* (Accession No. AJ315380), *grpE* (Accession No. AJ315381) und *dnaK* (Accession No. AJ315382) um das *dnaJ* Gen (Accession No. AJ968371) und einen, das Operon abschließenden Transkriptionsterminator erweitert (Abbildung 3.33b).

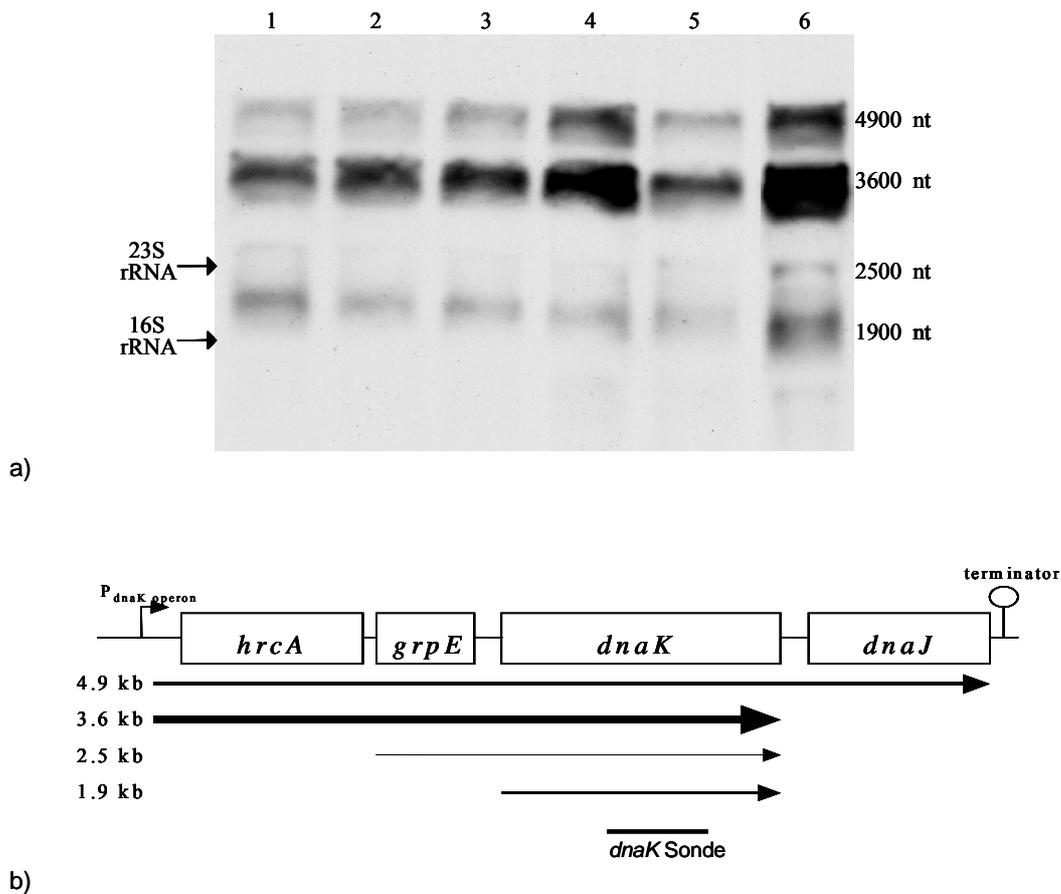


Abbildung 3.33 a) Northern Blot Analyse des *dnaK* Operons von *L. sanfranciscensis* nach Inkubation für 100 min bei 30°C und verschiedenen NaCl Konzentrationen bzw. nach Hitzestress. 1: Kontrolle ohne NaCl; 2: 0,25 M NaCl; 3: 0,5 M NaCl; 4: 0,75 M NaCl; 5: 1,5 M NaCl; 6: 10 min bei 40°C; Die mit der *dnaK* Sonde nachgewiesenen vier verschiedenen Signale können auf vier verschiedene Transkripte zurückgeführt werden. Die Größen der mRNAs sowie die Lage der 16S und 23S rRNAs sind dargestellt. Es wurden jeweils gleiche Mengen RNA (5 µg / Spur) aufgetragen, in einem 1% MOPS / Formaldehyd Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten *dnaK* spezifischen DNA Sonde hybridisiert. **b) Schematische Darstellung des *dnaK* Operons von *L. sanfranciscensis*.** Pfeile zeigen die vier potentiellen Transkripte, die mit der dargestellten *dnaK* Sonde nachgewiesen werden können. Die Stärke der Pfeile spiegelt die relative Menge der einzelnen Transkripte wider.

Die Transkriptionsanalyse (Abbildung 3.33a) zeigte neben der gleichzeitigen Detektion von vier verschiedenen großen Banden (ca. 4900 nt, 3600 nt, 2500 nt und 1900 nt) auch noch, dass

mit steigender NaCl Konzentration die Transkription des *dnaK* Operons zunimmt. Analog zu den Experimenten zur MelA-Aktivität wurde auch mittels Analyse der *dnaK* Promotoraktivität auf RNA Ebene eine maximale Induktion nach Inkubation bei einer NaCl Konzentration von 0,75 M festgestellt. Wie bei den Versuchen mit dem Reportersystem konnte mit steigender Salzkonzentration bis 0,75 M eine stetige Zunahme der Promotoraktivität beobachtet werden. Und auch die im Vergleich zur maximalen Promotoraktivität beobachtete Abnahme der mRNA bei Inkubation in Medium mit 1,5 M NaCl stimmte mit den Versuchsergebnissen zur MelA Aktivität überein. Die wie erwartet sehr starke Expression des *dnaK* Operons nach einem Hitzestress für 10 min bei 40°C ist an den sehr starken Signalen der einzelnen Banden zu erkennen (Abbildung 3.33a; Spur 6). Dass diese starke Promotoraktivität nicht mit dem Reportersystem nachgewiesen werden konnte, liegt an der bereits erwähnten Hitzeempfindlichkeit von MelA.

Um zu prüfen, ob die Menge des Reporterenzym MelA tatsächlich auf die Aktivität des *dnaK* Promotors zurückzuführen ist, wurden in einem weiteren Versuch die mRNA Mengen des *mela* Reportergens, des *dnaK* Gens und als Kontrolle die Menge der 16S rRNA mittels RNA Dot Blot untersucht und mit den MelA-Aktivitäten verglichen (Abbildung 3.34). Für jede NaCl-Konzentration wurde die RNA aus drei voneinander unabhängigen, mit pSH85351 transformierten Kulturen von *L. sanfranciscensis* isoliert. Anschließend wurden die isolierten RNAs aus Zellen, die unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden, gepoolt und jeweils gleiche Mengen an RNA für den Dot Blot aufgetragen. Es wurden insgesamt drei identische Membranen hergestellt und jede mit einer der spezifischen Sonden für *mela*, *dnaK* und 16S rRNA hybridisiert.

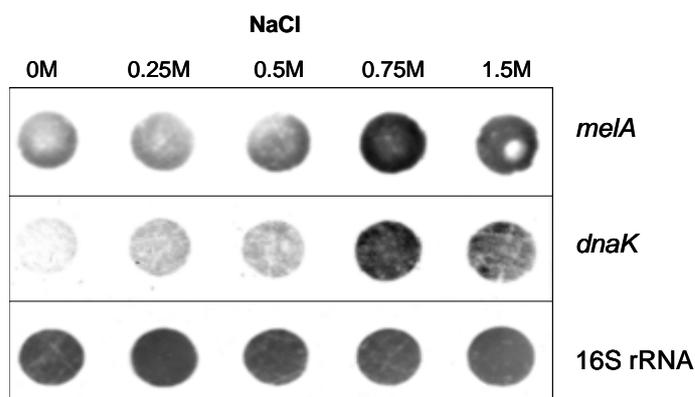


Abbildung 3.34 RNA Dot Blot Analyse gleicher RNA Mengen, isoliert aus *L. sanfranciscensis* transformiert mit pSH85351. Nach Inkubation für 100 min in Medium mit den verschiedenen NaCl Konzentrationen wurde RNA aus je drei voneinander unabhängigen Kulturen isoliert und gepoolt. Jeweils gleiche Mengen wurden aufgetragen und mit DIG markierten DNA Sonden spezifisch für *mela*, *dnaK* bzw. 16S rRNA hybridisiert.

Die Intensitäten der Spots, die zur Kontrolle gleicher RNA-Mengen mit der 16S rRNA Sonde hybridisiert wurden, sind bei allen NaCl Konzentrationen ungefähr identisch. Der Unterschied der Intensitäten von *dnaK* und *mela* verlief parallel in Abhängigkeit der Salzkonzentration und

zeigte einen Anstieg mit zunehmendem NaCl-Gehalt im Medium. Bei einer Konzentration von 0,75 M NaCl war für beide Transkripte ein Maximum erreicht. Eine noch höhere Salzkonzentration von 1,5 M NaCl führte im Vergleich dazu bei beiden Genen zu einer etwas geringeren Stärke der Signale. Trotz gleicher Mengen an RNA und denselben Bedingungen bei der Filmentwicklung ist die Intensität von *mela* durchgehend höher als die von *dnaK*.

Die Transformationseffizienz der auf dem Plasmid pSH85350 basierenden Vektoren ist mit 10^5 Transformanden / μg Plasmid DNA für *E. coli* und mit 10^2 bis 10^3 Transformanden / μg Plasmid DNA für *L. sanfranciscensis* relativ hoch. Der Vektor ist bezüglich Segregation stabil integriert und wird mit konstanter Kopienzahl an die Tochterzellen übertragen. Versuche mit dem LightCyclerTM zeigten, dass die Kopienzahl des Vektors durch Inkubation für bis zu drei Stunden weder unter Salzstress, noch unter anderen Stressbedingungen wie Kälte, Hitze oder HHD beeinflusst wird. Dazu wurden die Verhältnisse der so genannten „crossing points“ (Zyklus, bei dem die Fluoreszenz deutlich den Hintergrund überschreitet) in unterschiedlich verdünnten Zellextrakten vor und nach Inkubation unter den diversen Stressbedingungen bestimmt. Als so genannte Zielgene dienten dabei das mit nur einer Kopie auf dem Chromosom vorhandene *xpk* Gen für Phosphoketolase (siehe dazu Abbildung 3.35 Kapitel 3.6.2) und das auf dem Shuttlevektor kodierte *mela* Gen. Der konstante Abstand von 6,8 Zyklen (*mela* vor *xpk*) entspricht dabei einer ungefähren Kopienzahl des Vektors von ca. 110 ($2^{6,8}$) pro Zelle.

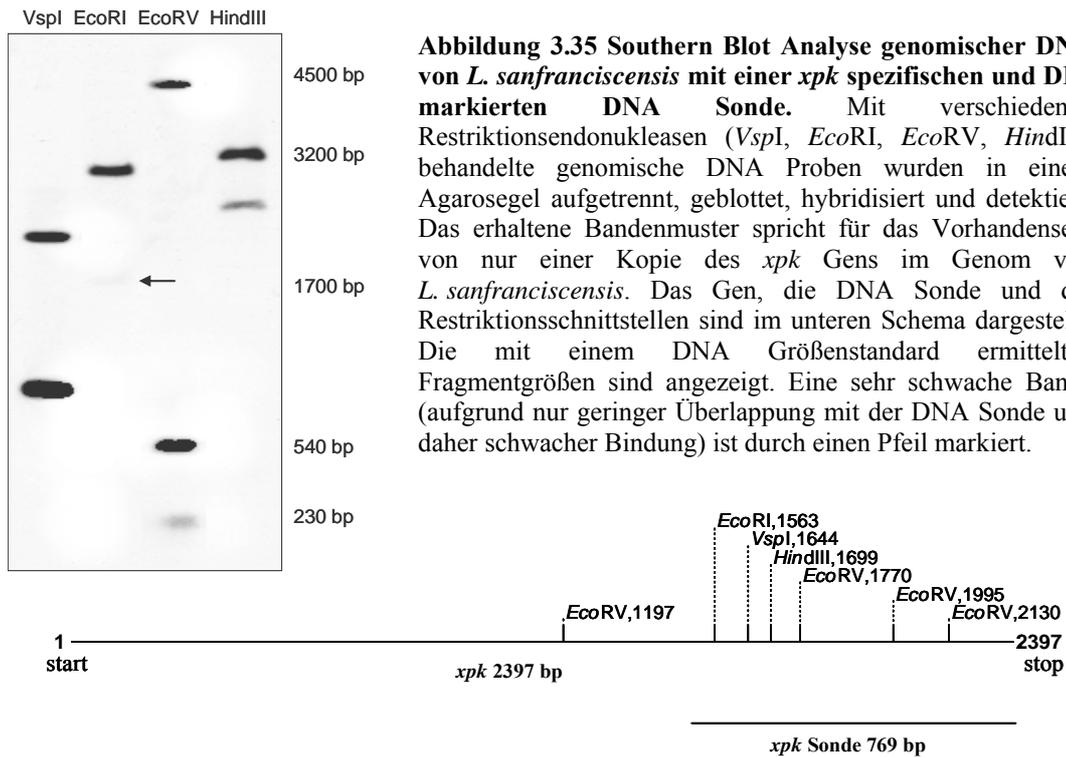
Zusätzlich zum hier beschriebenen „Promotor-Test-Vektor“, bei dem eine spezifische Promotorsequenz inklusive des Startkodons vor das Reportergen kloniert werden kann, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein „Promotor-Such-Vektor“ konstruiert. Dieser Vektor fand in der vorliegenden Arbeit keine explizite Verwendung, kann aber in Folgearbeiten bei der Suche nach HHD-induzierten Promotoren von Nutzen sein. Er unterscheidet sich lediglich dadurch, dass das *mela* Reportergen die eigene RBS und das eigene Startkodon behält. Nach Öffnen des Vektors an der *NgomI*V Schnittstelle kann dann mit *NgomI*V geschnittene chromosomale DNA durch Ligation eingefügt werden. Sequenzen, die Promotoraktivität besitzen, führen nach Transformation in den Wirtstamm dann zu einer Expression des Reportergens und somit zu einer Blau-Färbung des jeweiligen Klons. Die *NgomI*V Schnittstelle („GCCGGC“) wird außerdem von der Restriktionsendonuklease *NaeI* erkannt. Dieses Enzym schneidet die Sequenz „blunt end“ und erzeugt somit DNA Enden ohne Überhang. In diese Vektoren können also auch kleinere chromosomale DNA Fragmente ligiert werden, die durch Restriktion mit im Vergleich zu *NgomI*V weniger spezifischen Enzymen wie z. B. *AluI* oder mit einer Kombination mehrerer „blunt end“ schneidender Enzyme erzeugt werden können.

3.6.2 Etablierung der RealTime PCR für *L. sanfranciscensis*

Die quantitative RealTime PCR (RT-PCR) hat sich aufgrund ihrer Geschwindigkeit und hohen Sensitivität als Methode der Wahl etabliert, wenn die Expression einzelner Gene unter bestimmten Bedingungen untersucht werden soll. Aufwendige Verfahren zur Bestimmung der mRNA Mengen werden mehr und mehr durch diese Technik ersetzt. Ein Teil der vorliegenden Arbeit bestand daher auch in der Identifizierung eines für die RT-PCR geeigneten Referenzgens für *L. sanfranciscensis*, dessen Expression weder durch HHD, noch durch andere Stressbedingungen beeinflusst wird. Dazu analysierte Pavlovic (2006) mittels DNA Microarray die Expressionen möglicher Gene unter Hochdruck im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Es zeigte sich, dass die Expression potentieller Referenzgene wie die einer Maltosephosphorylase, einer Phosphoglukomutase, einer Acetatkinase oder einer Phosphotransacetylase durch HHD beeinflusst wird. Ein Gen konnte aber identifiziert werden, dessen Expression unter HHD nicht verändert wird. Es handelt sich dabei um das Gen *xpk*, das für eine Phosphoketolase kodiert und dessen Sequenz im Genom von *L. sanfranciscensis* bereits von Korakli *et al.* aufgeklärt wurde (Accession No. AJ586560). Neben einer konstitutiven Expression unter den zu testenden Stressbedingungen sollte ein geeignetes Referenzgen nur eine Kopie im Genom und eine durchschnittlich hohe Expression in der Zelle besitzen. Mehrere Kopien des Gens würden ebenso wie vorhandene Pseudogene oder eine zu hohe Konzentration an mRNA die Quantifizierung verfälschen. Aus diesem Grund sollte das *xpk* Gen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich dieser Anforderungen genauer charakterisiert werden.

Eine Southern Blot Analyse zeigte, dass im Genom von *L. sanfranciscensis* nur eine Kopie von *xpk* vorhanden ist und auch Pseudogene, die mit der spezifischen, DIG markierten Sonde hybridisieren, nicht existieren (Abbildung 3.35).

Im nächsten Schritt wurde die konstitutive Expression von *xpk* unter Hitze-, Kälte-, Salz- und Hochdruckstress mittels Northern Blot Analysen untersucht (Abbildung 3.36). Als Kontrolle für ein durch Stress reguliertes Gen diente dabei das bereits charakterisierte *dnaK*-Operon (Abbildung 3.33). Um zu zeigen, dass identische Mengen an RNA in den Proben aufgetragen wurden, wurde eine zweite identische Membran mit einer für die 16S rRNA typischen Sonde hybridisiert. Zum gleichen Zweck wurde die RNA eines weiteren identischen Agarosegels nicht auf eine Membran geblottet, sondern stattdessen mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 3.36). Durch Anfärbung der RNA im Agarosegel bzw. durch Hybridisierung mit der für die 16S rRNA spezifischen DNA Sonde wurde gezeigt, dass in jeder Spur gleiche Mengen an RNA vorhanden waren.



Die Northern Blot Analyse zeigte, dass die mRNA Konzentration von *dnaK* nach Inkubation unter Hitze- und HHD-Stress, nicht aber unter Kältestress im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht ist (siehe dazu auch die RNA Dot-Blot Analyse in Kapitel 3.6.3.6, Abbildung 3.46).

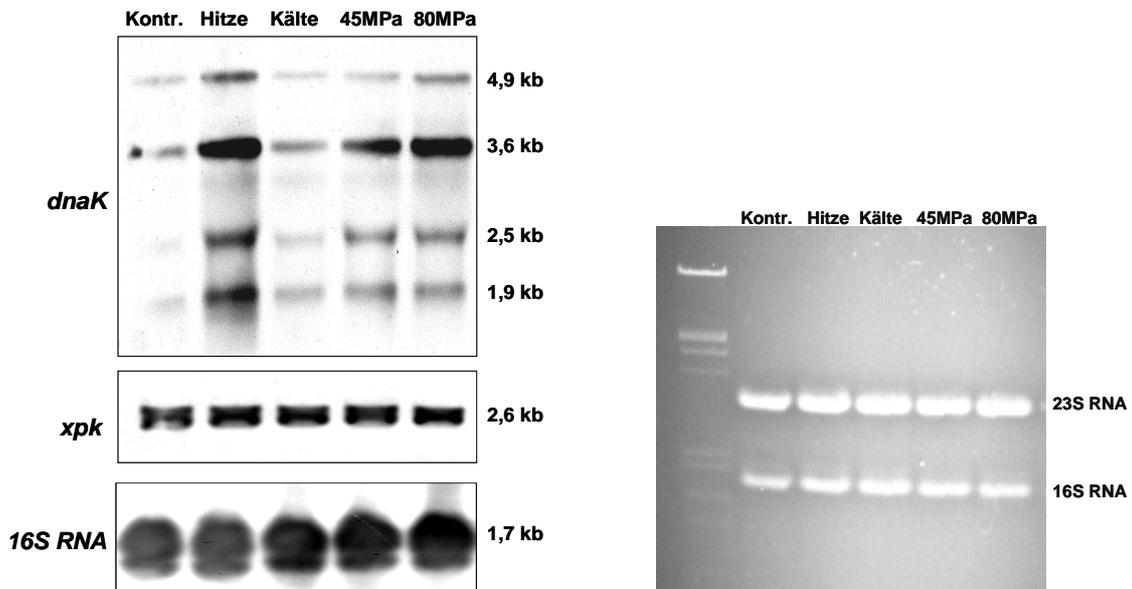


Abbildung 3.36 Northern Blot Analyse der aus *L. sanfranciscensis* isolierten RNA nach Inkubation für 10 min bei 40°C (Hitze), 60 min bei 12,5°C (Kälte) und 60 min unter subletalem Hochdruck (45 MPa bzw. 80 MPa). In allen Spuren wurden identische Mengen an RNA aufgetragen. Die verschiedenen Membranen wurden mit DIG markierten DNA Sonden, die spezifisch für *dnaK*, *xpk* bzw. 16S rRNA sind, hybridisiert (links). Die RNA eines weiteren Agarosegels wurde nicht auf eine Membran geblottet, sondern zum Nachweis gleicher RNA Mengen mit Ethidiumbromid gefärbt (rechts).

Für *xpk* und die deutlich höher konzentrierte 16S rRNA konnte bei keiner der untersuchten Stressbedingungen ein signifikanter Unterschied der mRNA Mengen festgestellt werden (Abbildung 3.36). Ähnlich verhielt es sich bei Inkubation in Medium mit verschiedenen hohen NaCl Konzentrationen. In Abbildung 3.37 ist die RNA Dot Blot Analyse dargestellt, die die mRNA Konzentration von *xpk* in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration zeigt. Die konstante Signalstärke von *xpk* weist darauf hin, dass die Expression von *xpk* im Gegensatz zu *dnaK* durch veränderte Salzkonzentrationen ebenso wie durch die anderen untersuchten Stressbedingungen nicht beeinflusst wird. Auch die Konzentration der 16S rRNA wird durch verschiedene NaCl Konzentrationen nicht verändert. Auch hier konnte im Vergleich zu *xpk* eine deutlich höhere Konzentration für die 16S rRNA festgestellt werden.

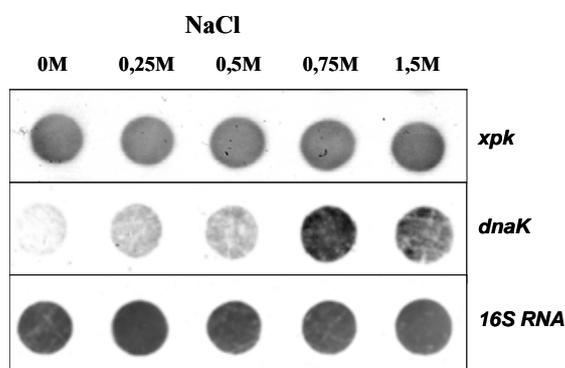


Abbildung 3.37 RNA Dot Blot Analyse des *xpk* Gens von *L. sanfranciscensis* in Abhängigkeit der NaCl Konzentration. Im Gegensatz zur erhöhten Transkript-Menge von *dnaK* ist die mRNA-Konzentration von *xpk* und 16S rRNA bei steigender NaCl Konzentration konstant. Teile dieser Abbildung stammen aus Abbildung 3.34.

3.6.3 Charakterisierung ausgewählter Promotorsequenzen

Nach Entwicklung und Etablierung eines Reportersystems basierend auf dem *mela* Gen und dem Nachweis, dass *xpk* als Referenzgen für die relative Quantifizierung mittels RT-PCR unter Hitze-, Kälte-, Salz- und Hochdruckstress geeignet ist, standen für diese Arbeit nun neben der klassischen Methode des Northern Blot zwei weitere Verfahren zur Messung der Promotoraktivität bei *L. sanfranciscensis* zur Verfügung. Die dabei erzielten Ergebnisse konnten darüber hinaus mit den Daten der Transkriptomanalyse von Pavlovic (2006) und der Proteomanalyse dieser Arbeit verglichen werden.

3.6.3.1 *rbsK/rpi* (*p1*) Promotor

Die Proteomanalyse dieser Arbeit zeigte, dass bei *L. sanfranciscensis* unter subletalem Hochdruck ein Enzym mit Ribokinase und Ribose-5-P-Isomerase Aktivität (P1) die stärkste Zunahme aufweist (Kapitel 3.2 und 3.3). Mittels reverser PCR konnte hier neben dem kompletten Gen (Kapitel 3.5.1) zusätzlich auch die vollständige Promotorsequenz aufgeklärt

werden (Abbildung 3.38). Stromaufwärts zum ATG Startkodon befinden sich eine „AG“-reiche, hypothetische Ribosomenbindestelle (RBS) und eine konservierte TATAAT Box (-10-Region). Im Abstand von 16 bp ist eine Sequenz („CTTACA“) zu finden, die eine -35-Region darstellen könnte. Auffallend in der Promotorsequenz ist die häufige Wiederholung eines „CAA“ Motivs, das verglichen mit anderen Sequenzabschnitten aus *L. sanfranciscensis* in diesem Abschnitt überproportional oft vertreten ist. Des Weiteren sind mindestens zwei Regionen mit einem ungewöhnlich hohen „AT“-Gehalt zu finden. Wie im Schema der Abbildung 3.38 zu erkennen ist, befindet sich die untersuchte Sequenz zwischen zwei Genen mit entgegengesetzter Orientierung. Eine Analyse des komplementären DNA Strangs zeigte, dass auch hier konservierte Regionen eines Promotors vorhanden sind. Dieser Promotor, der die Transkription einer Mannit-Dehydrogenase reguliert, wird im folgenden Kapitel näher charakterisiert.

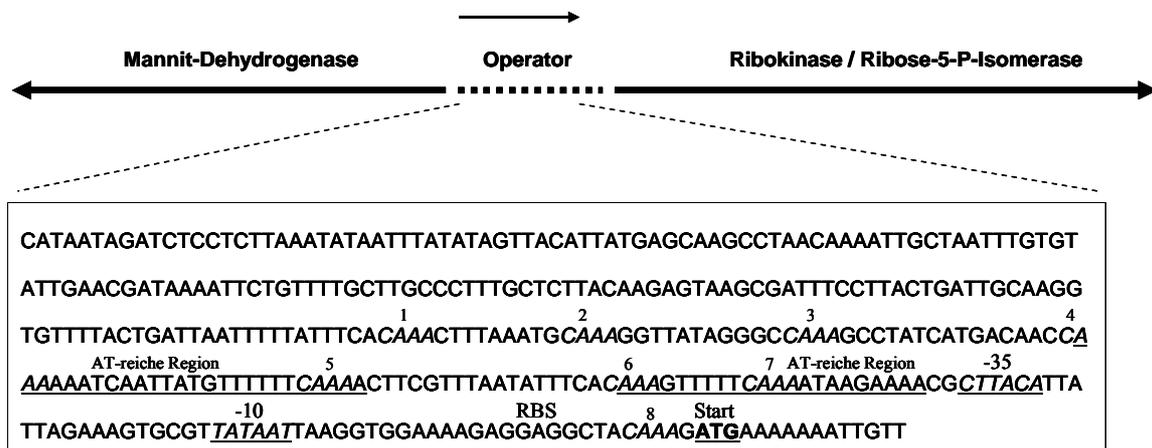


Abbildung 3.38 Potentielle Promotorsequenz des aus dem Protein P1 (RbsK / Rpi) abgeleiteten Gens aus *L. sanfranciscensis*. Gezeigt ist der schematische Aufbau des Genomausschnitts. Die unten dargestellte Sequenz befindet sich zwischen den entgegengesetzt orientierten Genen für eine Mannit-Dehydrogenase und für die Ribokinase / Ribose-5-P-Isomerase. Pfeile geben die Orientierung der Gene an. Das Startkodon ist fett und unterstrichen dargestellt. Hypothetische Sequenzen für Ribosomenbindestelle (RBS), -10-Region und -35-Region sind markiert. Ein wiederkehrendes „CAA“-Motiv ist durch fortlaufende Nummerierung gekennzeichnet. Auffallend „AT“-reiche Regionen sind unterstrichen.

Um die Regulation des Promotors zu untersuchen, sollte im folgenden Teil der Arbeit die Promotorsequenz näher analysiert werden. Zunächst wurde dazu eine klassische Northern Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 3.39). Dieser Versuch diente gleichzeitig auch dazu, um die bereits beschriebenen Methoden der RT-PCR und des neu etablierten Reportersystems weiter zu verifizieren. Nach Inkubation unter optimalen Bedingungen (Kontrolle) und nach einer Inkubation unter subletalem Hochdruck-, Kälte-, bzw. Salzstress wurde RNA aus Zellen von *L. sanfranciscensis* isoliert. Gleiche Mengen wurden in jeweils einer Spur eines

denaturierenden Agarosegels der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit einer DIG markierten, für das *rbsK/rpi* Gen spezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 3.39a). Im Vergleich zur Kontrolle konnten nach Inkubation für 60 min unter HHD bei 80 MPa und nach einer Inkubation für 60 min bei 12,5°C (Kälte) eine deutliche Zunahme an spezifischer mRNA detektiert werden. Die Inkubation für 60 min in Gegenwart von 2% NaCl zeigte eine allerdings etwas geringere Erhöhung der spezifischen mRNA. Um zu beweisen, dass in jeder Spur tatsächlich die gleiche Menge an RNA aufgetragen ist, wurde die hybridisierte Membran gewaschen und mit einer für *xpk* spezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 3.39b). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Signale für *xpk* festgestellt werden, was auf den Einsatz identischer RNA Mengen schließen lässt.

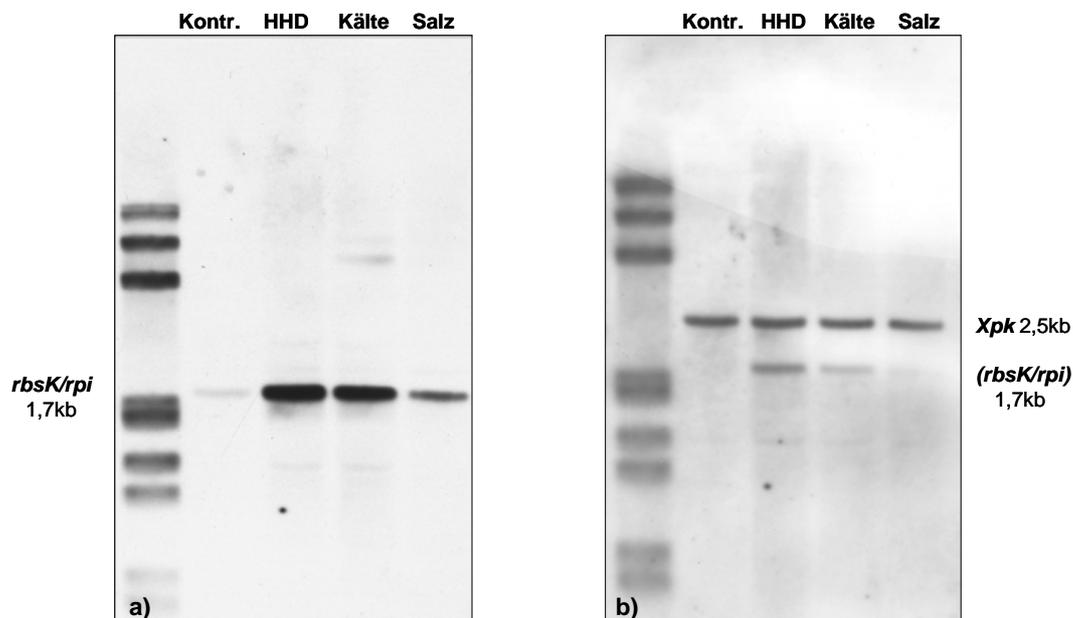


Abbildung 3.39 Northern Blot Analyse der RNA von *L. sanfranciscensis* nach Inkubation unter Hochdruck-, Kälte- und Salzstress. a) Hybridisierung mit einer DIG markierten *rbsK/rpi* spezifischen DNA Sonde. Die Menge an detektierte mRNA ist unter den Stressbedingungen deutlich erhöht. Am linken Rand ist DIG markierter RNA-Größenstandard aufgetragen. Die detektierte RNA besitzt eine Größe von ca. 1700 bp. b) Die gleiche Membran nach Waschen (stripping) und erneutem Hybridisieren mit einer Sonde, spezifisch für das Referenzgen *xpk*. Die Größe beträgt etwa 2500 bp. Die Intensitäten der jeweiligen Signale nach unterschiedlichen Vorbehandlungen der Zellen unterscheiden sich nicht signifikant. Die Signale der ersten Hybridisierung sind zum Teil noch zu erkennen.

Eine absolute Quantifizierung der Northern Blot Resultate war ähnlich schwierig und ungenau wie die der 2D-Gelelektrophorese. Durch verschieden lange Entwicklungszeiten bei der Färbung der einzelnen Gele bzw. bei der Detektion der DIG markierten Sonden auf den verschiedenen Membranen sind die Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten so

hoch, dass nur relative Quantifizierungen innerhalb eines Experiments sinnvoll sind. So wurde nach Inkubation unter Hochdruckstress der Induktionsfaktor auf Proteinebene aus drei verschiedenen 2D-Gelen mit $12,8 \pm 2,3$ (Standardabweichung) berechnet. Nach Auswertung der Northern Blots lag der Induktionsfaktor auf RNA Ebene mit $18,4 \pm 6,8$ etwas höher. Beide Werte liegen aber dennoch in etwa der gleichen Größenordnung. Die Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR ergab nach einer Inkubation unter HHD bezogen auf das Referenzgen *xpk* eine Induktion der *rbsK/rpi* mRNA um den Faktor $15,8 \pm 0,7$. Auch dieser Wert passt sehr gut zu den beiden anderen Resultaten.

Eine weitere Analyse der Promotoraktivität wurde mit Hilfe des *mela* Reportersystems durchgeführt. Dazu wurde die gesamte Promotorsequenz des *rbsK / rpi* Gens vor das *mela* Reportergen kloniert. Der resultierende Vektor pSH85352 wurde in *E. coli* transformiert und auf blaue, α -Galaktosidase positive Klone gescreent. Aus diesen Klonen wurde das Plasmid isoliert, die Promotorregion mittels Sequenzierung kontrolliert und das intakte Plasmid schließlich in *L. sanfranciscensis* durch Elektroporation transformiert. Der neue Stamm wurde dann unter optimalen Bedingungen angezüchtet und die exponentiell wachsende Kultur in Subkulturen aufgeteilt. Diese Kulturen wurden unter den verschiedenen Stressbedingungen weiter inkubiert. Im Anschluss daran wurden daraus Zellextrakte hergestellt. In den verschiedenen Extrakten wurden dann jeweils die α -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Die Messungen zeigten, dass unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehaltes die Zellen nach einer Inkubation unter HHD (80 MPa) für 60 min bis 180 min eine signifikant höhere α -Galaktosidase Aktivität besaßen als vergleichbare Zellen unter Standardbedingungen. In allen Fällen war die Induktion nach 180 min mit einem berechneten Faktor von $12,3 \pm 1,8$ höher als nach einer Inkubation für nur 60 min ($9,8 \pm 2,6$). Eine Inkubation für 180 min bei $12,5^{\circ}\text{C}$ führte zu einem Induktionsfaktor von $5,4 \pm 1,3$, während eine Inkubation für 60 min bei dieser Temperatur eine Steigerung um den Faktor $4,4 \pm 0,9$ aufwies. Schließlich wurde die Induktion der Mela Aktivität auch nach einer Inkubation für 60 min bzw. 180 min in Medium mit einer NaCl Konzentration von 2% gemessen. Mit Werten von $2,2 \pm 1,1$ und $3,1 \pm 0,8$ war auch hier eine leichte Induktion festzustellen. Eine Analyse nach Inkubation unter erhöhter Temperatur war aufgrund der bereits beschriebenen Sensitivität von Mela gegenüber Hitze nicht möglich. Stationäre Zellen dieses Stammes hatten eine sehr hohe Mela Aktivität, die aufgrund einer möglichen Anhäufung des Enzyms aber nicht mit der Aktivität einer exponentiell wachsenden Kontrollkultur verglichen werden sollte. Eine Bestimmung des Induktionsfaktors ist für Zellen in der stationären Phase somit also nicht möglich.

3.6.3.2 *mdh* Promotor

Die in Abbildung 3.38 gezeigte Sequenz beinhaltet wie erwähnt auch in komplementärer Orientierung eine Promotorsequenz (Abbildung 3.40). Dieser Promotor kontrolliert die Transkription des Gens *mdh*, das für eine Mannit-Dehydrogenase kodiert. Neben einer „AG“-reichen Region, die als Ribosomenbindestelle dienen könnte, sind zwei weitere Sequenzen vorhanden, die eine mögliche -10-Region und eine -35 Region darstellen könnten. Ansonsten sind in dieser Promotorregion nur die im vorherigen Kapitel bereits beschriebenen „AT“-reichen Regionen und das nun zum „CAA“ komplementäre „TTT“-Motiv erwähnenswert. Auf Proteomebene konnte unter HHD kein Einfluss auf die Proteinmenge dieses Enzyms beobachtet werden. Um die Aktivität des *mdh* Promotors zu untersuchen, wurde die bereits analysierte, zum *rbsK* / *rpi* Promotor identische Sequenz in komplementärer und entgegengesetzter Orientierung vor das *melA* Reportergen kloniert. Der konstruierte Vektor pSH85353 besitzt somit die Promotorregion des *mdh* Gens (Abbildung 3.40).

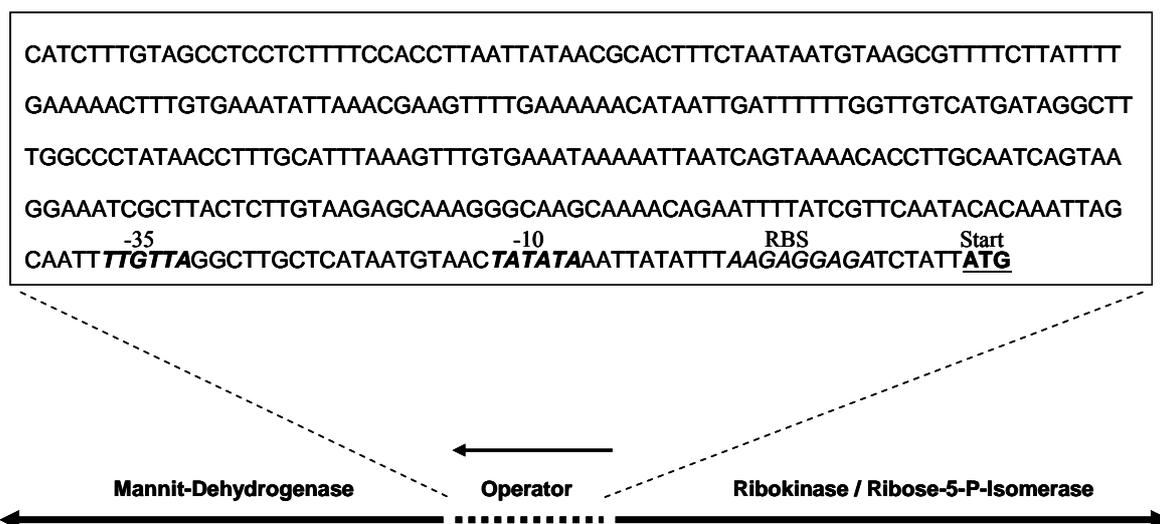


Abbildung 3.40 Promotorsequenz des *mdh* Gens aus *L. sanfranciscensis*. Gezeigt ist der schematische Aufbau des Genomausschnitts. Die oben dargestellte Sequenz befindet sich zwischen den entgegengesetzt orientierten Genen für eine Mannit-Dehydrogenase und für die Ribokinase / Ribose-5-P-Isomerase. Es handelt sich um die komplementäre Sequenz des *rbsK* / *rpi* Promotors. Pfeile geben die Orientierung der Sequenzen an. Das Startkodon ist fett und unterstrichen dargestellt. Mögliche Sequenzen für eine Ribosomenbindestelle (RBS), eine -10-Region und -35 Region sind markiert.

Die Untersuchung der α -Galaktosidase Aktivität in Abhängigkeit des *mdh* Promotors fand mit Stämmen von *L. sanfranciscensis* statt, die das Plasmid pSH85353 tragen und an der blauen Färbung der Kolonien auf Medium mit X- α -Gal zu erkennen sind. Eine Inkubation dieser Stämme für bis zu 180 min unter Hochdruck-, Kälte- oder Salzstress hatte im Vergleich zu Zellextrakten ungestresster Kulturen keine signifikanten Auswirkungen auf deren MelA

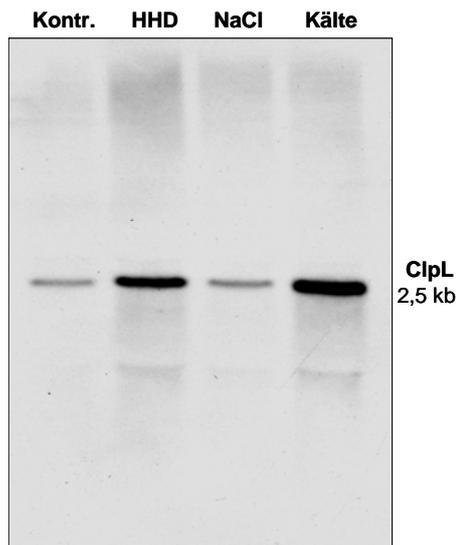


Abbildung 3.42 Northern Blot Analyse gleicher RNA Mengen von *L. sanfranciscensis* isoliert nach Inkubation unter Hochdruck-, Salz- und Kältestress und Hybridisierung mit einer DIG markierten *clpL* spezifischen DNA Sonde. Die Menge an detektierter mRNA ist unter HHD- und Kältestress deutlich erhöht. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge RNA von unbehandelten Zellen aufgetragen. Die detektierte RNA besitzt eine Größe von ca. 2500 bp.

Eine genaue Quantifizierung des Induktionsfaktors für *clpL* mRNA nach Inkubation unter HHD war auch in diesem Fall nicht möglich. Mittels eines zweiten Northern Blots und zwei voneinander unabhängigen RNA Dot Blots wurde aber ein Wert von $5,2 \pm 2,6$ ermittelt.

Die Analyse der quantitativen RealTime-PCR ergab einen Induktionsfaktor von $4,9 \pm 0,3$ für *clpL* mRNA von *L. sanfranciscensis* nach Inkubation für 60 min bei 80 MPa. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung wurde dabei das bereits beschriebene *xpk* Gen verwendet.

Die Untersuchungen mit dem Reportersystem fanden mit Stämmen von *L. sanfranciscensis* statt, die das Plasmid pSH85354 trugen. Dieser Vektor wurde durch Klonierung der *clpL* Promotorsequenz vor das *mela* Reportergen des Vektors pSH85350 generiert. Fünf voneinander unabhängig durchgeführte Versuche zeigten, dass eine exponentiell wachsende Kultur nach Inkubation für 60 min bei 80 MPa im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle eine um den Faktor $4,6 \pm 0,4$ erhöhte α -Galaktosidase Aktivität besitzt. Eine Induktion der Mela Aktivität wurde in diesem Stamm auch nach einer Inkubation für 60 min bei $12,5^\circ\text{C}$ ($5,7 \pm 0,8$) und in Medium mit einer NaCl Konzentration von 2% ($2,4 \pm 0,4$) beobachtet. Die absolute Mela Aktivität exponentiell wachsender Zellen konnte aber auch in diesem Fall nicht eindeutig bestimmt werden. Allerdings besitzt der Stamm mit dem Vektor pSH85354 (*clpL* Promotor) die höchste Mela Aktivität aller in dieser Arbeit getesteten Stämme und liegt im Durchschnitt um das zwei- bis dreifache über der Aktivität von Stämmen mit dem Vektor pSH85352 (*rbsK* / *rpi* Promotor).

3.6.3.4 *clpX* Promotor

Bisher sind von der Sequenz vor dem *clpX* Gen aus dem Genomprojekt (Pavlovic 2006) lediglich 64 bp bekannt (Abbildung 3.43). Weitere, für die Regulation unter Umständen

wichtige Sequenzabschnitte sind noch nicht entschlüsselt. Daher ist eine weitere Sequenzierung geplant.

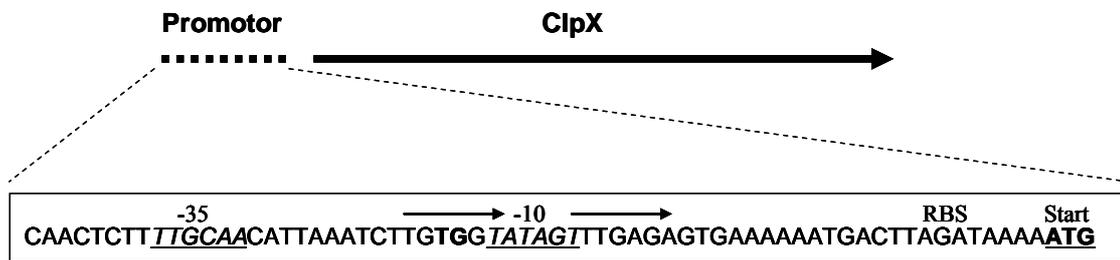


Abbildung 3.43 Promotorsequenz des *clpX* Gens aus *L. sanfranciscensis*. Die Sequenz enthält eine hypothetische -10-Region und -35-Region (kursiv, unterstrichen). Direkt vor der potentiellen -10-Region befindet sich ein für Laktobazillen typisches „TGR“-Motiv (fett). Eine mögliche Ribosomenbindestelle (RBS) und das ATG Startkodon sind ebenfalls gekennzeichnet. Eine potentielle und für Promotoren von *clp* Genen typische CtsR-Bindestelle ist mit Pfeilen markiert. Nähere Erläuterungen siehe Text.

5 bp stromaufwärts vor dem ATG Startkodon befindet sich ein „AGA“ Triplet, das zwar keine klassische Ribosomenbindestelle darstellt, von dem aber angenommen werden muss, dass diese Region für die Bindung des Ribosoms verantwortlich ist. Eine leicht von der Konsensussequenz abweichende -10-Region („TATAAT-Box“) ist vorhanden. Auch eine mögliche -35-Region kann in der Sequenz identifiziert werden. Eine zur Konsensussequenz für CtsR-Bindestellen homologe Region konnte ebenfalls gefunden werden.

Mit Ausnahme der Daten aus den 2D-Gelen existieren für dieses Protein bzw. das entsprechenden Gen keine weiteren Daten zur Regulation unter HHD und anderen Stressarten.

3.6.3.5 *ctsR* Promotor

Neben dem kompletten Operon bestehend aus *ctsR* und *clpC* konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels inverser PCR auch ein großer Teil der stromaufwärts gelegenen Promotorsequenz aufgeklärt werden (Abbildung 3.44). Am 5'-Ende wurde dabei ein hypothetischer Transkriptionsterminator eines weiter stromaufwärts gelegenen Gens gefunden, der aus einer inversen Wiederholung von 7 bp besteht und einen so genannten „stem“ (Stamm) bilden kann. Im Abstand von 12 bp befindet sich eine weitere so genannte „stem-loop“ (Stamm-Schleife) Struktur, die aus einer inversen Wiederholung von 18 bp (stem) besteht, die wiederum von der symmetrischen Basenabfolge TTAATT (loop) getrennt wird. Nach dieser typischen Terminator-Region beginnt der eigentliche Promotor des *ctsR* Operons. Neben einer möglichen -35-Region ist im typischen Abstand von 17 bp eine mit der Konsensussequenz komplett übereinstimmende -10-Region zu finden. Auch eine RBS konnte 7 bp vor dem ATG-Startkodon des *ctsR* Gens identifiziert werden. Eine fast mit der Konsensussequenz

übereinstimmende CtsR Bindestelle komplettiert die Promotorsequenz und hat zur Folge, dass die Transkription des Operons unter anderem auch durch das eigene Genprodukt reguliert werden kann.

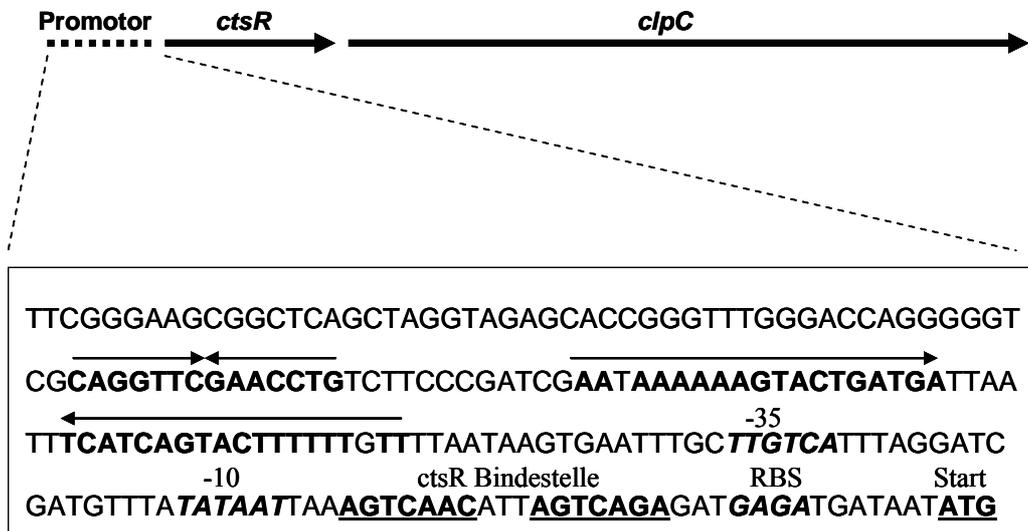


Abbildung 3.44 Promotorsequenz des *ctsR* Operons aus *L. sanfranciscensis* bestehend aus den Genen *ctsR* und *clpC*. Vor der potentiellen Promotorsequenz befindet sich ein hypothetischer Transkriptionsterminator, der sich aus einer „stem“ und „stem-loop“ bildenden Sequenz zusammensetzt (mit Pfeilen markiert). Außerdem enthält der Promotor eine mögliche -10-Region und eine -35-Region (kursiv, fett). Eine mögliche Ribosomenbindestelle (RBS), eine CtsR Bindestelle und das ATG Startkodon sind ebenfalls gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Aufgrund der möglichen Autoregulation des *ctsR* Operons durch den CtsR-Repressor wurde auch die Aktivität des *ctsR* Promotors in Abhängigkeit verschiedener Stressparameter untersucht. Erste Versuche mittels Northern Blot Analyse (ohne Abbildung) zeigten keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar konnte ein ca. 3000 bp großes Transkript mit einer für *clpC* spezifischen DIG markierten DNA Sonde detektiert werden, eine genaue Auswertung war aber nicht möglich. Lediglich ein Trend zu erhöhter Expression des Operons nach einer Inkubation für 10 min bei 42°C (Hitzestress) war zu beobachten. Für Kälte-, Salz- oder Hochdruckstress wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Durch Klonierung der kompletten Promotorsequenz in den Vektor pSH85350 vor das *mela* Reportergen entstand der Vektor pSH85355. Nach Transformation in *L. sanfranciscensis* konnte die Mela Aktivität in Abhängigkeit der verschiedenen Inkubationsbedingungen gemessen werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Eigenschaften von Mela war eine Analyse bei Hitzestress allerdings nicht möglich. Die restlichen Stressarten zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf die Aktivität des *ctsR* Promotors. So änderte sich die α -Galaktosidase Aktivität nach einer Inkubation für 180 min bei 80 MPa um den Faktor $1,2 \pm$

0,4. Der Faktor nach Inkubation für 180 min in Medium mit 2% NaCl betrug $0,9 \pm 0,4$, der nach Inkubation bei einer Temperatur von $12,5^\circ\text{C}$ betrug $1,4 \pm 0,5$. Insgesamt ist die Promotoraktivität eher schwach und unter Standardbedingungen mit der Aktivität des *mdh* Promotors zu vergleichen.

3.6.3.6 *dnaK* Promotor

Die Organisation des *dnaK* Operons und die Charakterisierung der Promotorsequenz wurden in den Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 ausführlich beschrieben. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 3.45 nochmals die Promotorsequenz und ein Schema des Operons dargestellt.

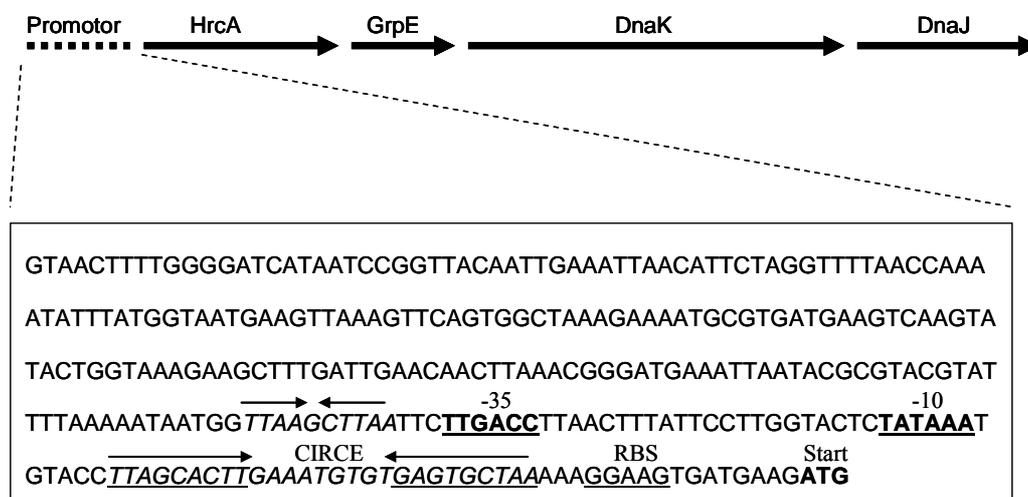


Abbildung 3.45 Promotorsequenz des *dnaK* Operons von *L. sanfranciscensis*. Hypothetische Ribosomenbindestelle (RBS), Startkodon und -10-Region bzw. -35-Region sind markiert. Invertierte Sequenzwiederholungen sind unterstrichen und mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine typische HrcA Repressor Bindestelle ist beschriftet (CIRCE).

Northern Blot Analysen zeigten, dass verschieden große mRNA Transkripte mit Längen zwischen 1900 bp und 4900 bp gebildet werden (vergleiche Abbildungen 3.33 und 3.36). Eine signifikant erhöhte Expression der einzelnen Gene des *dnaK* Operons konnte nach einer Inkubation unter Hitze-, NaCl-, und Hochdruckstress beobachtet werden. Eine Quantifizierung der Induktionsfaktoren war aufgrund der verschiedenen Transkripte aber sehr problematisch. Aus diesem Grund wurden RNA Dot-Blot Analysen mit identischen Mengen isolierter RNA durchgeführt. Die Proben wurden mit DIG markierten DNA Sonden spezifisch für *dnaK*, bzw. spezifisch für das Referenzgen *xpk* als Kontrolle hybridisiert und detektiert (Abbildung 3.46). Die Induktions-Faktoren wurden mittels zwei voneinander unabhängiger Versuchen ermittelt. Eine Inkubation für 10 min bei 42°C führte dabei zu einer um den Faktor $8,9 \pm 2,2$ erhöhten

Expression von *dnaK* im Vergleich zu *xpk*. Die Inkubation für 60 min unter Hochdruck bewirkte bei 45 MPa einen $3,7 \pm 1,8$ fachen und bei 80 MPa einen $2,2 \pm 1,4$ fachen Anstieg von *dnaK* im Vergleich zum Referenzgen. Eine Inkubation für 60 min bei 12,5°C zeigte mit dem Faktor von $0,8 \pm 0,2$ keine signifikante Veränderung der Expression des Operons. Bei einer Inkubation für 100 min bei einer Salzkonzentration von 0,75 M war mit einem Faktor von $10,8 \pm 4,7$ wiederum eine starke Erhöhung der Expression zu beobachten (vergleiche Abbildung 3.38). Für die Salzkonzentration in der Höhe wie sie für die bisherigen Versuche benutzt wurde und die von der Intensität mit den anderen Stresskonditionen vergleichbar ist (2% NaCl), liegen keine gesonderten Ergebnisse vor. Basierend auf den Versuchen aus Kapitel 3.6.1 (Abbildung 3.34) kann aber davon ausgegangen werden, dass der Induktions-Faktor bei einer Salzkonzentration von 2% etwa zwischen 2,0 und 4,0 liegt.

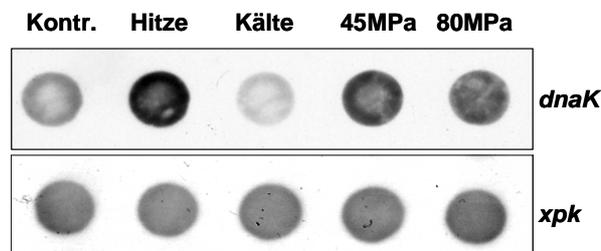


Abbildung 3.46 Dot Blot Analyse mit RNA aus *L. sanfranciscensis* isoliert nach Inkubation unter verschiedenen Stressbedingungen. Die Proben mit gleichen RNA Mengen wurden mit DIG markierten DNA Sonden spezifisch für *dnaK* bzw. spezifisch für das *xpk* Referenzgen hybridisiert und detektiert.

Eine Untersuchung zur Expression von *dnaK* nach Hitze- und Hochdruckstress wurde auch mittels RealTime PCR durchgeführt. Nach Inkubation für 10 min bei 42°C konnte dabei eine Erhöhung der Expression um den Faktor von $2,6 \pm 0,5$ gemessen werden. Eine Inkubation der Zellen für 60 min bei 80 MPa ($1,6 \pm 0,4$) bzw. 30 min bei 45 MPa ($1,3 \pm 0,7$) zeigte hingegen keinen signifikanten Anstieg der mRNA Menge.

Außerdem wurden auch noch Untersuchungen der *dnaK* Promotoraktivität mit dem *mela* Reportersystem durchgeführt. Dazu wurde durch Klonierung des entsprechenden Promotors vor das *mela* Gen im Vektor pSH85350 der Vektor pSH85351 generiert (siehe Kapitel 3.6.1). Anschließend wurde dann der Einfluss verschiedener Stressfaktoren auf die Aktivität des *dnaK* Promotors in Stämmen von *L. sanfranciscensis*, die diesen Vektor tragen, untersucht. Die Abhängigkeit der Promotoraktivität von der NaCl Konzentration wurde bereits in einem früheren Teil dieser Arbeit ausführlich untersucht und beschrieben (vergleiche Abbildung 3.32). Die restlichen Ergebnisse wurden aus je zwei voneinander unabhängigen Versuchen

generiert. Nach Inkubation für 60 min bei 12,5°C konnte keine signifikante Veränderung ($1,2 \pm 0,3$) gegenüber Zellen beobachtet werden, die unter optimalen Bedingungen bei 30°C inkubiert wurden. Eine Inkubation für 60 min bei 80 MPa hingegen erhöhte die MelA Aktivität um den Faktor $2,7 \pm 0,5$ signifikant. Insgesamt ist die *dnaK* Promotoraktivität relativ hoch und liegt nur ca. 30% unter der des *clpL* Promotors, der die höchste Aktivität aller in dieser Arbeit untersuchten Promotoren besitzt.

3.6.3.7 *groESL* Promotor

Nach Sequenzierung und Charakterisierung des kompletten *groESL* Operons (vergleiche Abbildung 3.19) sollte an dieser Stelle die Analyse der nur teilweise bekannten Promotorsequenz dargestellt werden. In Abbildung 3.47 sind die bekannten 85 Basenpaare vor dem ATG-Startkodon des *groES* Gens gezeigt. Die vollständige Sequenz wird mit dem Abschluss der Genomsequenzierung erwartet.

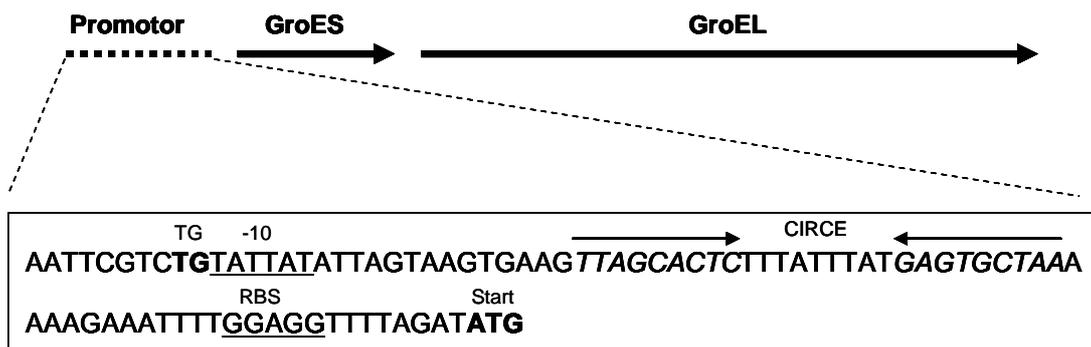


Abbildung 3.47 Promotorsequenz des *groESL* Operons von *L. sanfranciscensis*. Hypothetische Ribosomenbindestelle (RBS), Startkodon und eine mögliche -10-Region inklusive einem typischen „TG-Motiv“ sind markiert. Eine typische HrcA Repressor Bindestelle ist beschriftet (CIRCE) und deren invertierte Sequenzwiederholung mit Pfeilen gekennzeichnet.

Neben einer möglichen RBS besitzt der Promotor eine hypothetische -10-Region, der ein bei Laktobazillen häufig vorkommendes „TG-Motiv“ vorangestellt ist. Die genaue Bestimmung der Promotorsequenz ist schwierig, da keine weiteren Sequenzinformationen vorliegen und so eine mögliche -35-Region im korrekten Abstand nur vermutet werden kann. Wie bei der Promotorregion von *dnaK* ist auch hier eine gut konservierte HrcA Bindestelle (CIRCE-Element) zwischen der -10-Region und der postulierten RBS vorhanden. Weitere regulatorisch aktive Sequenzmotive oberhalb der -10-Region können aufgrund fehlender Sequenzdaten nur vermutet werden.

Analog zum Anstieg der Menge an GroEL in der Proteomanalyse konnte eine erhöhte Expression von *groEL* nach Inkubation unter HHD auch in der Transkriptionsanalyse mittels Microarray und RT-PCR festgestellt werden (Pavlovic 2006). Diese Ergebnisse konnten mittels Northern-Blot und Hybridisierung mit DIG markierten DNA Sonden, die spezifisch für *groEL* sind, auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 3.48).

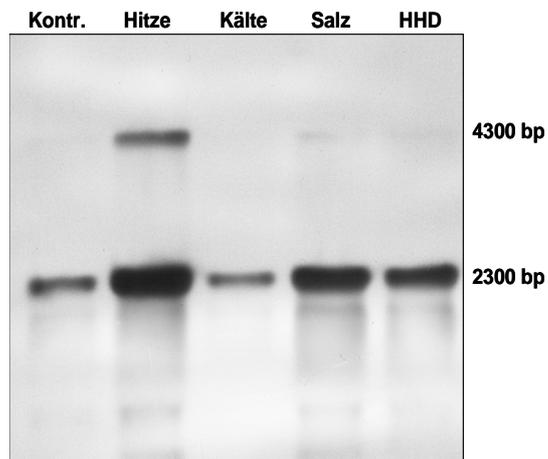


Abbildung 3.48 Northern Blot Analyse gleicher RNA Mengen von *L. sanfranciscensis* isoliert nach Inkubation unter Hitze-, Kälte-, Salz-, und Hochdruckstress. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG markierten *groEL* spezifischen DNA Sonde. Das detektierte Signal mit einer Größe von ca. 2300 bp entspricht der Größe der mRNA für das gesamte *groESL* Operon. Die Intensität ist in Zellen nach Inkubation unter Hitze-, Salz-, und Hochdruckstress deutlich erhöht. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge RNA von unbehandelten Zellen aufgetragen. In Zellen, die unter Hitze inkubiert wurden ist eine zweite, mit ca. 4300 bp deutlich größere Bande zu beobachten.

Nach Inkubation für 60 min bei 80 MPa betrug der ermittelte Induktions-Faktor für *groESL* mRNA aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen $2,7 \pm 0,6$. Die Untersuchung weiterer Stressbedingungen zeigte nach Inkubation für 10 min bei 42°C (Hitzestress) eine Zunahme der Expression um den Faktor $6,3 \pm 1,4$ und nach Inkubation für 60 min in Medium mit einer NaCl Konzentration von 2% (Salzstress) eine Zunahme um den Faktor $3,2 \pm 0,6$. Eine Inkubation bei einer Temperatur von 12,5°C hatte hingegen keine signifikante Auswirkung ($0,8 \pm 0,3$) auf die Expressionsrate von *groESL*. Für die Quantifizierung wurden die Intensitäten der detektierten Signale herangezogen, die einer Größe von 2300 bp und somit in etwa der Größe des gesamten *groESL* Operons entsprechen. Auffallend war eine zweite und mit ca. 4300 bp deutlich größeres RNA Signal, das in Zellen nach Inkubation bei 42°C detektiert werden konnte. Auch nach Inkubation unter den anderen Stressbedingungen konnte dieses Signal teilweise in schwacher Form beobachtet werden (Abbildung 3.48).

Für die Analyse des *groESL* Promotors mit Hilfe des Reportersystems ist die vorliegende bekannte Promotorsequenz zu kurz. Da entscheidende Teile für die normale Aktivität des Promotors fehlen würden, falls nur die in Abbildung 3.48 dargestellte Sequenz vor das Reportergen kloniert werden würde, ist zum jetzigen Zeitpunkt eine Untersuchung mit dem Reportersystem nicht möglich. Auch zur relativen Promotorstärke kann somit keine Aussage getroffen werden.

3.6.3.8 *cpsID* Promotor

In der Microarray Analyse von Pavlovic (2006) konnte das Gen einer Glykosyltransferase mit der Bezeichnung *cpsID* als eines der unter HHD am stärksten induzierten Gene bei *L. sanfranciscensis* identifiziert werden. Dieses Resultat konnte mittels RealTime PCR verifiziert werden (Pavlovic 2006). Neben einer Partialsequenz des Gens *cspID* ist auch ein großer Teil der vor dem ATG-Startkodon gelegenen Sequenz bekannt (Abbildung 3.49).

Vor dem postulierten Startkodon ist eine „AG“-reiche Sequenz vorhanden, die als RBS fungieren könnte. Eine potentielle -10-Region und eine -35-Region konnten ebenfalls gefunden werden. Zwei auffallend Thymidin reiche Sequenzen („TT(T/A)ATTTTTTTATT“) innerhalb der möglichen Bindestelle der RNA Polymerase befinden sich zwischen der -35-Region und der -10-Region, bzw. kurz nach der -10-Region. Auch die Wiederholung eines „TCCCA“-Motivs zwischen der -10-Region und der RBS ist ungewöhnlich.

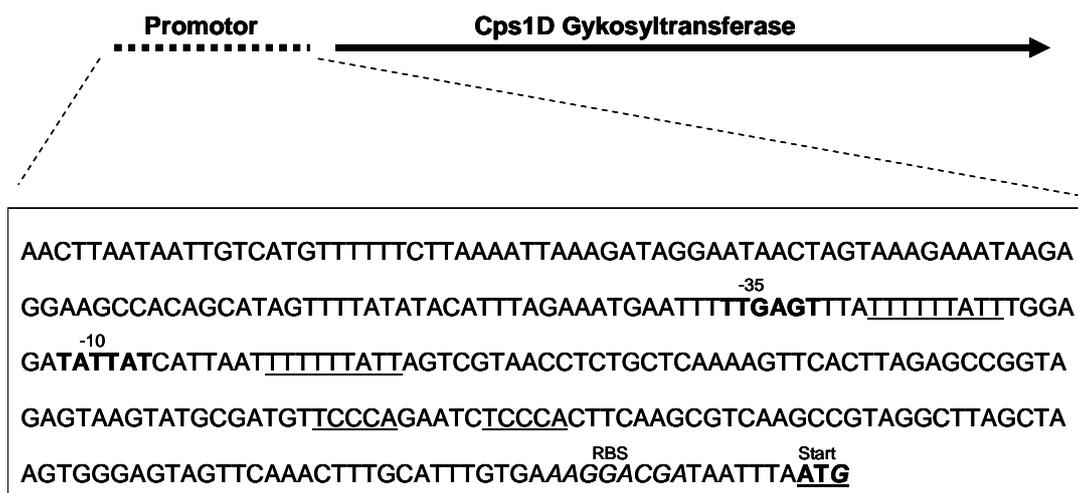


Abbildung 3.49 Mögliche Promotorsequenz des *cpsID* Gens von *L. sanfranciscensis*. Hypothetische Ribosomenbindestelle (RBS), postuliertes ATG-Startkodon und mögliche -10-Region und -35-Region sind markiert. Ungewöhnliche Wiederholungen von Sequenzmotiven, die u. U. Einfluss auf die Genregulation besitzen, sind unterstrichen. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Die Klonierung der gesamten Promotorsequenz inklusive dem ATG-Startkodon vor das *mela* Gen des Vektors pSH85350 resultierte in einem neuen Vektor mit der Bezeichnung pSH85356. Nach Transformation in *L. sanfranciscensis* konnte die α -Galaktosidase Aktivität in Abhängigkeit des *cpsID* Promotors unter verschiedenen Stressbedingungen ermittelt werden. Unter optimalen Wachstumsbedingungen ist die Mela Aktivität in diesen Stämmen nur sehr gering und beträgt im Durchschnitt nur ca. 10% der Aktivität des *L. sanfranciscensis* Stammes, der den Vektor pSH85352 (*rbsK/rpi* Promotor) besitzt. Eine Inkubation exponentiell

wachsender Zellen bei 80 MPa zeigte weder nach 60 min ($1,2 \pm 0,4$), noch nach 180 min ($0,9 \pm 0,3$) eine signifikante Veränderung der MelA Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auch eine Inkubation für 60 min bei $12,5^\circ\text{C}$ ($0,7 \pm 0,4$) oder in Medium mit 2% NaCl ($1,0 \pm 0,3$) führte zu keiner wesentlichen Änderung der α -Galaktosidase Aktivität. Eine Induktion der *cpsID* Promotoraktivität durch die in dieser Arbeit getesteten Stressparameter konnte mit dem MelA-Reportersystem somit nicht bestätigt werden.

3.6.3.9 *xpk* Promotor

Das für eine Phosphoketolase kodierende *xpk* Gen aus *L. sanfranciscensis* wurde bereits in Kapitel 6.3.2 beschrieben und ausführlich auf seine Eignung als Referenzgen für die RealTime-PCR untersucht. Dabei wurde mittels Northern Blot Analyse festgestellt, dass die Transkription weder durch HHD, noch durch Kälte, Hitze oder hohe Salzkonzentrationen beeinflusst wird. Die Ergebnisse aus der DNA Microarray Analyse (Pavlovic 2006) wurden somit bestätigt. In Abbildung 3.50 ist die Promotorsequenz des *xpk* Gens gezeigt.

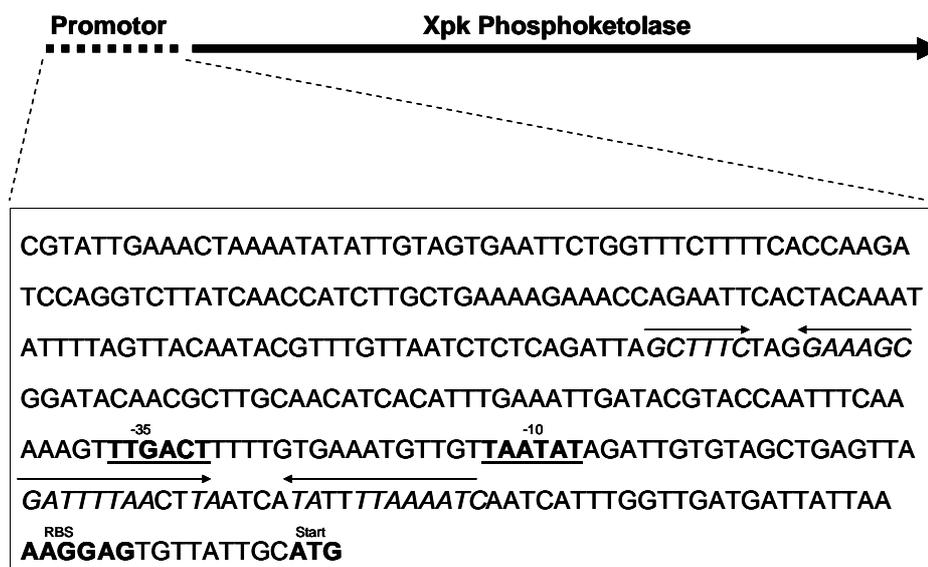


Abbildung 3.50 Promotorsequenz des *xpk* Gens von *L. sanfranciscensis*. Hypothetische Ribosomenbindestelle (RBS), Startkodon und mögliche -10-Region und -35-Region sind hervorgehoben. Inverse Wiederholungen von Sequenzmotiven, die u. U. Einfluss auf die Genregulation besitzen, sind mit Pfeilen markiert. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Vor dem ATG-Startkodon befindet sich eine potentielle Ribosomenbindestelle. Außerdem kann eine mögliche -10-Region inklusive einem unmittelbar davor liegendem „TG-Motiv“ und eine potentielle -35-Region im entsprechenden Abstand von 16 bp gefunden werden. Auffallend ist die inverse Wiederholung eines Sequenzabschnitts aus jeweils 12 bp zwischen

der -10-Region und der RBS. Eine weitere inverse Wiederholung einer jeweils 6 bp langen Sequenz befindet sich stromaufwärts der -35 Region.

Um die Aktivität des *xpk* Promotors und die konstitutive Expression von *xpk* auch mit dem MelA-Reportersystem nachweisen zu können, wurde die gesamte Promotorsequenz vor das Reporter-gen des Vektors pSH85350 kloniert. Der entstandene Vektor pSH85357 wurde daraufhin in Zellen von *L. sanfranciscensis* transformiert und die resultierenden Klone auf ihre MelA Aktivität unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Die konstitutive Expression des *xpk* Gens konnte in allen Fällen durch eine unveränderte *xpk* Promotoraktivität unter den verschiedenen Stressbedingungen bestätigt werden. Nach einer Inkubation exponentiell wachsender Zellen für 60 min bei 80 MPa konnte kein signifikanter Unterschied ($1,2 \pm 0,4$) der α -Galaktosidase Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen werden. Auch eine Inkubation bei 12,5°C ($0,9 \pm 0,2$) oder in Medium mit 2% NaCl ($1,4 \pm 0,5$) bewirkten keine Veränderung. Die basale MelA Aktivität unbehandelter Zellen ist mit der von Zellen mit dem Vektor pSH85352 (*rbsK* / *rpi* Promotor) vergleichbar.

3.6.3.10 *fusA* Promotor

Abschließend sollte zum Vergleich zu den unter HHD induzierten Genen und dem Promotor des konstitutiv exprimierten *xpk* Gens auch ein Promotor analysiert werden, dessen Aktivität unter HHD reduziert ist. Die von Pavlovic (2006) durchgeführte Transkriptionsanalyse zeigte, dass die mRNA des für den Elongationsfaktor G kodierenden *fusA* Gens nach einer Hochdruckbehandlung bei 45 MPa um den Faktor 2,5 reduziert ist. Dabei handelte es sich bereits um eines der am stärksten reprimierten Gene, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten (Pavlovic 2006). Mittels RT-PCR konnte Pavlovic dieses Ergebnis für eine Hochdruckbehandlung bei 45 MPa bestätigen ($-3,3 \pm 0,0$). Nach einer Inkubation bei 80 MPa (Druck, bei der die größte Stressantwort erwartet wird) konnte für dieses Gen jedoch keine Veränderung der Expression ($1,2 \pm 0,1$) festgestellt werden (Pavlovic 2006).

Die entsprechende Promotorsequenz des *fusA* Gens stammt aus dem Genomprojekt (Pavlovic 2006) und ist in Abbildung 3.51 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass vor dem ATG-Startkodon eine „AG“-reiche Sequenz vorhanden ist, die als Ribosomenbindestelle fungieren könnte. Neben einer -10-Region und einem dazugehörigen typischen „TG-Motiv“ konnte auch eine hypothetische -35-Region im passenden Abstand von 13 bp stromaufwärts gefunden werden. Eine inverse Wiederholung von 12 Basenpaaren nach der -10-Region könnte in der Lage sein eine räumliche Struktur auszubilden. Auf diese Weise ist eine Beeinflussung der Regulation sowohl auf Ebene der Transkription, als auch der Translation denkbar.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung der Stressparameter

Obwohl bereits zahlreiche Untersuchungen zur Anwendung von Hochdruck (HHD) als schonende und umweltfreundliche Methode zur Pasteurisierung von Lebensmitteln existieren, ist der Mechanismus der Abtötung von Mikroorganismen durch HHD bisher weitgehend unbekannt. Es ist bekannt, dass Milchsäurebakterien beim Wechsel von optimalen zu suboptimale Wachstumsbedingungen mit der Expression von mindestens 100 allgemeinen Stressproteinen reagieren können (Van de Guchte *et al.* 2002). Neben dem Mangel an Nährstoffen können auch physikalische Veränderungen der Umweltparameter wie Temperatur oder pH-Wert eine physiologische Antwort induzieren. Außerdem gibt es Hinweise, dass Mikroorganismen für viele Stressarten (z. B. Kälte, Hitze, niedriger pH-Wert, osmotischer oder oxidativer Stress) darüber hinaus auch noch eine individuelle Stressantwort besitzen. Für beide, sowohl für die allgemeine, als auch für die spezielle Stressantwort ist bekannt, dass sie die Überlebensfähigkeit einer Zelle unter ungünstigen Umwelteinflüssen signifikant erhöhen können (Gaidenko und Price 1998). Dabei steht neben der Ausbildung von Adaptationen vor allem die Bildung von Kreuzresistenzen im Mittelpunkt des Interesses. Besonders für die Lebensmittelindustrie ist wichtig, inwieweit eine induzierte Stressantwort für die Entwicklung von Adaptation und Kreuzresistenzen im Zusammenhang mit Hochdruck relevant ist. Dazu sollte in dieser Arbeit die HHD induzierte Stressantwort charakterisiert und mit anderen, zum Teil besser verstandenen Stressantworten verglichen werden. Grundlage für alle Versuche bildete die Bestimmung der unterschiedlichen, lebensmittelrelevanten Stressparameter für Hitze-, Kälte-, Säure- und Salzstress, die die maximale Wachstumsrate des Modellorganismus *L. sanfranciscensis* auf 10% reduzieren. Unter diesen Bedingungen ist eine deutliche Stressantwort zu erwarten (Sanders *et al.* 1999). Um Adaptation und Kreuzresistenz nachweisen zu können, mussten auch die letalen Stressparameter gefunden werden, die so hoch sind, dass sie für unbehandelte Zellen zwar letal sind, gleichzeitig aber auch mild genug sind, so dass Zellen mit erworbener Resistenz noch überleben können. Nach Bestimmung dieser Parameter für subletalen und letalen Hochdruck-, Kälte-, Hitze-, Salz- und Säurestress mittels Wachstums- und Absterbekinetiken konnte mit den eigentlichen Versuchen dieser Arbeit begonnen werden.

4.2 Adaptation und Kreuzresistenz

Besonders bei der industriellen Anwendung von HHD spielen Mechanismen, die eine Adaptation oder Kreuzresistenz induzieren und somit den Erfolg einer Pasteurisierung beeinträchtigen können, eine wichtige Rolle. Eine Inaktivierung von Mikroorganismen durch HHD hängt in Lebensmitteln und anderen Produkten wie Kosmetika oder Pharmazeutika dabei nicht nur von den Prozessparametern wie Druckhöhe und Druckhaltezeit, sondern auch von den Produktparametern wie Temperatur, Salzgehalt oder pH-Wert ab. Auch der physiologische Status und die Wachstumsphase der Zellen sowie eine eventuelle Vorbehandlung (Historie) können einen Einfluss auf die Hochdrucktoleranz besitzen.

Auch wenn eine Ausbildung von Adaptation und Kreuzresistenz in Kombination mit verschiedenen Stressarten bei unterschiedlichen Milchsäurebakterien bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Boutibonnes *et al.* 1991, Hartke *et al.* 1996, Kets *et al.* 1996, Broadbent *et al.* 1997, Broadbent und Lin 1999), existieren bislang nur wenige Untersuchungen in Zusammenhang mit HHD.

Bei *L. plantarum* konnte nach Inkubation bei erhöhter Temperatur eine zunehmende Sensitivität gegenüber HHD beobachtet werden (ter Steeg *et al.* 1999). Dieser Effekt war auch in der vorliegenden Arbeit mit *L. sanfranciscensis* zu beobachten. Weitere Untersuchungen mit diesem Organismus zeigten zusätzlich, dass auch eine Vorinkubation der Zellen unter subletalen Bedingungen wie Kälte-, Säure- oder Salzstress die Überlebensrate nach einer anschließenden letalen Hochdruckbehandlung (300 MPa) deutlich erhöhen kann (Kreuzresistenz). Eine erhöhte Druckresistenz von *L. sanfranciscensis* konnte auch in der stationären Phase (Hungerstress) und nach einer subletalen Hochdruckbehandlung bei 80 MPa (Adaptation) beobachtet werden. Mit Ausnahme erhöhter subletaler Temperaturen (Hitze) führte bei *L. sanfranciscensis* eine Vorinkubation unter den anderen untersuchten Stressarten immer zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber einer anschließenden letalen Hochdruckbehandlung.

Eine Vorinkubation unter subletalen Hochdruckbedingungen kann aber nicht nur zu einer Adaptation führen, sondern kann auch die Resistenz von Zellen gegenüber anderen letalen Stressbedingungen beeinflussen. So haben Ananta und Knorr (2003) von einer erhöhten Thermotoleranz bei *L. rhamnosus* nach Inkubation unter subletalem HHD berichtet.

Aus diesem Grund wurden für *L. sanfranciscensis* zusätzlich auch komplementäre Versuche durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach einer Vorinkubation unter subletalem Hochdruck (80 MPa) die Zellen von *L. sanfranciscensis* deutlich sensitiver gegenüber einer Inkubation in stark saurem Medium (pH 2,0) reagieren. Dieselben Zellen wiesen im Vergleich

zu unbehandelten Zellen gleichzeitig aber auch eine signifikant höhere Resistenz gegenüber letaler Hitze auf. Dieser Effekt könnte unter Umständen, wie auch von Ananta und Knorr (2003) vorgeschlagen, für eine optimierte Präparation von Starterkulturen mittels Sprühtrocknung genutzt werden.

Wurden die Zellen nach einer Vorinkubation unter subletalem HHD eingefroren und wieder aufgetaut oder einem letalen Salzstress ausgesetzt, zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen kein deutlicher Unterschied in der Überlebensrate.

Bei diesen Ergebnissen fällt auf, dass kein Zusammenhang zwischen den komplementären Versuchen besteht. Während eine subletale Vorinkubation unter Kälte- und Salzstress eine erhöhte Resistenz gegenüber einer letalen Hochdruckinkubation induzierte, hatte eine subletale Inkubation unter Hochdruck keine Auswirkungen auf die Überlebensrate nach einem letalen Kälte-, bzw. Salzstress. Im Fall von Hitze und Säure sind die Ergebnisse im Zusammenhang mit Hochdruck sogar konträr und bewirken nach einer Vorinkubation sowohl gesteigerte, als auch erniedrigte Resistenz gegenüber den jeweils anderen Stressbedingungen. Während eine Inkubation bei moderater Hitze die Hochdruckresistenz deutlich verringerte, wiesen Zellen nach einer subletalen Vorinkubation unter HHD eine erhöhte Resistenz gegenüber einer letalen Hitzebehandlung auf. Bei Versuchen mit Säurestress war das Ergebnis genau umgekehrt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Komplexität des Einflusses von Hochdruck auf die Zelle deutlich. Eine direkte Beziehung zwischen den verschiedenen Stressarten mit Hochdruck ist auf den ersten Blick nicht zu erkennen. Um die beschriebenen Effekte und somit die Wirkung von Hochdruck auf die Zelle bzw. den Abtötungsmechanismus von HHD zu klären, reichen die physiologischen Versuche alleine daher nicht aus.

Die Versuche mit Chloramphenicol zeigten, dass in Gegenwart dieses Antibiotikums eine Adaptation an HHD bei *L. sanfranciscensis* nicht möglich ist. Daraus kann gefolgert werden, dass für eine durch HHD induzierte Resistenz eine funktionierende Proteinbiosynthese benötigt wird. Auch bei *L. rhamnosus* wurde für die Induktion der Hitzeresistenz nach einer Hochdruckbehandlung die Neusynthese von Proteinen vorausgesetzt (Ananta und Knorr 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint zur Ausbildung einer Adaptation bzw. Kreuzresistenz in Zusammenhang mit Hochdruck die Protein *de novo* Synthese eine wichtige Rolle zu spielen.

Um die Veränderungen im Proteom nach Inkubation der Zellen unter HHD und den anderen Stressbedingungen charakterisieren zu können, sollten im weiteren Teil der Arbeit mittels

hochauflösender 2D-Gelelektrophorese die verschiedenen Stressantworten untersucht und mit der Hochdruckstressantwort verglichen werden.

4.3 Charakterisierung der Stressantwort auf Proteomebene

Bei mesophilen Bakterien, in deren natürlichen Lebensraum in der Regel keine signifikanten Druckschwankungen vorkommen, ist prinzipiell nicht wie bei anderen Stressarten mit einer hochdruckspezifischen Stressantwort zu rechnen. Wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, scheint unter Hochdruck dennoch eine Veränderung auf Ebene des Proteoms von *L. sanfranciscensis* stattzufinden, die zu den beobachteten Adaptationen und Kreuzresistenzen führt. Bisher existieren zur HHD induzierten Stressantwort bei Mikroorganismen nur wenige Studien. Vor allem für den Modellorganismus *E. coli* (Gram negatives Bakterium) und den Eukaryoten *S. cerevisiae* existieren Daten (Welch *et al.* 1993, Aertsen *et al.* 2004, Fernandes *et al.* 2004, Iwahashi 2003).

Erste Versuche zur Änderung der Proteinexpression unter verschiedenen Druckhöhen bei einem Gram positiven Bakterium wurden von Drews *et al.* (2002) an *L. sanfranciscensis* durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Stressantwort von *L. sanfranciscensis* nach einer Inkubation für eine Stunde bei 80 MPa näher charakterisiert und anschließend mit den Kälte-, Hitze-, Salz-, Hunger-, und Säurestressantworten vergleichbarer Intensität verglichen.

Nach Auswertung der 2D-Gelanalysen wurden insgesamt 16 Proteine detektiert, deren Menge sich in Zellen nach einer Hochdruckbehandlung signifikant von der Menge in unbehandelten Zellen unterschied. Dabei ist zu beachten, dass trotz der sehr sensitiven Silberfärbung mit dieser Methode niemals das komplette Proteom einer Zelle erfasst und visualisiert werden kann. Das Proteom ist dabei als die Menge aller Proteine definiert, die aufgrund der genetischen Information in der Zelle potentiell synthetisiert werden können (Wasinger *et al.* 1995). Proteine, die nur unter bestimmten Umweltbedingungen synthetisiert werden oder in nur sehr niedriger Konzentration bzw. geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen, können auf diese Weise nicht detektiert werden. Auch können mit den verschiedenen Extraktionsmethoden nie alle Proteine einer Zelle (zytoplasmatische, membrangebundene,... Proteine) gleichzeitig in Lösung gebracht werden. Schließlich gibt es auch keine Möglichkeit die Proteine mit extremen *pI* Werten (sehr sauer oder sehr basisch) oder Größen (sehr kleine und sehr große) zusammen auf einem Gel darzustellen. Auch wenn die 2D-Gelelektrophorese nach wie vor die Methode der Wahl für komplexe Proteomanalysen ist, können immer nur kleinere Ausschnitte des gesamten Proteoms im Detail betrachtet werden. Champomier-

Verges *et al.* (2002) haben die Differenz der theoretisch erwarteten mit den tatsächlich gefundenen Ergebnissen der Proteomanalyse verschiedener Bakterien untersucht und gleichzeitig einen Überblick über Details und Perspektiven der Proteomanalyse bei Milchsäurebakterien gegeben. Aufgrund dieser theoretischen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit die Bedingungen so gewählt, dass ein Großteil des Proteoms von *L. sanfranciscensis* analysiert werden konnte. Dennoch konnten sehr kleine ($M_r < 7\text{kDa}$), sehr basische ($pI > 10$) und sehr saure ($pI < 3$) Proteine, sowie Membranproteine und Proteine in sehr niedrigen Konzentrationen mit den hier angewandten Methoden nicht erfasst werden.

So wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass von den 16 durch Hochdruck beeinflussten Proteinen unter HHD 9 Proteine verstärkt und 7 Proteine vermindert synthetisiert werden. Da diese 16 Proteine unter den anderen untersuchten Stressbedingungen zum Teil sehr ähnlich reguliert sind, konnte eine spezifische Hochdruckstressantwort bei *L. sanfranciscensis* nicht festgestellt werden. Lediglich ein einziges Protein (P6) wird spezifisch durch HHD induziert. Andererseits gibt es auch nur ein einziges Protein (P13), das unter allen Stressbedingungen gleich reguliert wird.

Die Hochdruckstressantwort scheint bei *L. sanfranciscensis* somit aus einer Mischung verschiedener Stressantworten zu bestehen. Dies lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass sich die physikalische Wirkung von Druck auf die Zelle zum Teil mit den Wirkungen der anderen Stressarten überschneidet. Es ist denkbar, dass die Zelle auf die einzelnen physikochemischen Effekte von Hochdruck nicht mit einer spezifischen Stressantwort, dafür aber mit einer individuellen Kombination aus mehreren Komponenten verschiedener Stressantworten reagiert. Die möglichen Effekte reichen dabei von Konformationsänderungen an DNA, RNA und Proteinen, über Modifikationen an den Ribosomen bis hin zu Veränderungen an der Zellmembran (Russel *et al.* 1995, Eriksson *et al.* 2002, VanBogelen und Neidhardt 1990, Vigh *et al.* 1998, Bartlett 2002). Auch bei Versuchen mit *E. coli* konnte die Beobachtung gemacht werden, dass sich die Antwort auf Hochdruckstress aus verschiedenen Stressantworten zusammensetzt (Welch *et al.* 1993; Ishii *et al.* 2005). Da verschiedene physikalische Stressparameter in der Zelle ähnliche Effekte hervorrufen können, reagiert die Zelle wahrscheinlich auf die einzelnen Wirkungen, die eine Stressart in einer Zelle hervorruft mit einer spezifischen Stressreaktion. Die Summe dieser Reaktionen bildet dann die für jede Stressart individuelle Stressantwort. So ist auch die gleichzeitige Expression von Hitze- und Kälteschockgenen als Reaktion auf Hochdruckstress zu erklären.

Zusätzlich ist bei Milchsäurebakterien die spezifische Regulation der Genexpression im Gegensatz zu anderen Bakterien aufgrund der geringeren Auswahl an alternativen Sigma-

Faktoren eingeschränkt (Van de Guchte *et al.* 2002, Bolotin *et al.* 2001). So kann bei Milchsäurebakterien generell ein geringerer Unterschied der einzelnen Stressantworten erklärt werden.

Die individuelle Stressantwort auf Hochdruck besteht bei *L. sanfranciscensis* somit aus der Kombination verschiedenster Stressproteine, deren Expression in der Regel auch unter anderen Stressbedingungen beeinflusst wird. Spezifische Stressproteine, die nur durch Hochdruck reguliert werden, konnten mit einer Ausnahme nicht gefunden werden.

Durch die Identifizierung der einzelnen, an der Hochdruckstressantwort beteiligten Proteine sollte versucht werden, genauere Aussagen über die Wirkung von HHD auf die Zelle zu treffen.

4.4 Proteinidentifizierung

Wie die Versuche mit Chloramphenicol zeigten, spielt die funktionierende Proteinbiosynthese eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Adaptation und Kreuzresistenz im Zusammenhang mit Hochdruck. In diesem Teil der Arbeit sollten die insgesamt 16 gefundenen HHD „sensitiven“ Proteine diskutiert werden.

Von allen 16 Proteinen konnte mittels klassischen Edman-Abbaus oder mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren Aminosäuresequenzen interner Peptidfragmente ermittelt werden. Über computergestützte Homologievergleiche waren somit statistische Aussagen zu den jeweiligen Funktionen möglich. Wie bereits erwähnt sind bei der Bildung von Adaptationen und Kreuzresistenzen vor allem die unter Hochdruck induzierten Proteine interessant. Aus diesem Grund konzentrierte sich die weitere Arbeit vorrangig auf die insgesamt 9 durch Hochdruck induzierten Proteine (P1 bis P9). Diese Proteine werden im Kapitel 4.5 ausführlicher diskutiert und so weit möglich nach erfolgreicher Sequenzierung auch charakterisiert.

Bei den restlichen 7 Proteinspots ist davon auszugehen, dass sie bei der Bildung der verschiedenen Stressantworten und somit bei der Entstehung von Kreuzresistenzen und Adaptationen nur eine untergeordnete Rolle spielen, da diese Effekte zum Großteil auf einer Neusynthese und Akkumulation von Proteinen beruhen. Eine Identifizierung und Charakterisierung der Proteine P10 bis P16, deren Menge unter HHD abnimmt, wurde in dieser Arbeit daher nicht weiter betrieben, obwohl eine gezielte Verminderung bestimmter Proteine im Rahmen einer spezifischen Stressantwort generell nicht ausgeschlossen werden kann. So könnten die Zellen z. B. bestimmte Stoffwechselwege blockieren, um unter Stress spezifische Zwischenprodukte oder Energieträger wie ATP für überlebenswichtige

Funktionen zur Verfügung zu haben. Auch eine gezielte Reduktion von Regulationsfaktoren der Transkription und Translation, sowie von Proteinen, die für das Zellwachstum benötigt werden, könnte unter Stressbedingungen hilfreich für das Überleben der Zelle sein. Auf diese Weise können Hochdruck sensible und hochpräzise Vorgänge wie z.B. die Replikation, deren Fehlerrate unter Druck zunimmt, gezielt abgeschaltet und weiterer Schaden in der Zelle verhindert werden.

4.5 Charakterisierung ausgewählter Gene und Proteine

Von einigen der durch Hochdruck induzierten Proteine konnte die komplette Gensequenz ermittelt werden. Aus den genetischen Informationen konnte dann die vollständige Proteinsequenz abgeleitet werden, so dass von manchen Proteinen nun die vollständige Information über die jeweilige Aminosäuresequenz vorliegt. Die Sequenzinformationen der Gene bzw. Proteine sind für Homologievergleiche nötig und darüber hinaus essentiell für molekularbiologische Arbeiten. Erst so sind Klonierungen oder Modifikationen wie dem Anhängen so genannter „tags“ für eine effiziente Proteinreinigung und die rekombinante Expression möglich. Diese Arbeiten wiederum sind für die Charakterisierung der Proteinfunktionen und Proteineigenschaften unerlässlich.

Im Folgenden sollen die Untersuchungsergebnisse der durch Hochdruck induzierten Gene bzw. Proteine diskutiert werden.

4.5.1 Ribokinase / Ribose-5P-Isomerase (P1)

Das Protein P1 ist das unter subletalem Hochdruck am stärksten induzierte Protein. Dieses Protein wurde bereits in den Arbeiten von Drews *et al.* (2002) und Scheyhing (2004) als ein durch HHD induziertes Protein beschrieben. In beiden Fällen wurde unabhängig voneinander eine starke Homologie zu Ribokinasen aus verschiedenen Mikroorganismen gefunden. Wie in Kapitel 3.4 erwähnt, konnte bisher jedoch noch nicht geklärt werden, weshalb dieses Protein aus *L. sanfranciscensis* mit einer Masse von ca. 60 kDa (Größenbestimmung im SDS-Gel) fast doppelt so groß ist wie alle bisher bekannten Ribokinasen. Die Erklärung, es könnte sich um ein Dimer handeln (Drews *et al.* 2002), kann aufgrund der denaturierenden Wirkung im SDS-Gel als unwahrscheinlich betrachtet werden. Mittels nano-ESI-LC-MS/MS konnte im Rahmen dieser Arbeit noch eine zweite Domäne in diesem Protein entdeckt werden, die Homologien zu verschiedenen Ribose-5-P-Isomerasen besitzt. Im Normalfall existieren in jeder Zelle für diese beiden Funktionen getrennte Enzyme. Ein ähnliches Enzym, welches die Aktivitäten einer Ribokinase und einer Ribose-5-P-Isomerase kombiniert, konnte bisher noch in keinem Organismus identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde mittels reverser Genetik

Teil (Ribokinase-Domäne) des gesamten Proteins P1 analysiert wurden, blieb die Existenz einer zweiten Domäne zunächst verborgen. Erst die Aufklärung der gesamten Gensequenz mittels inverser PCR offenbarte die Kombination von Ribokinase und Ribose-5-P Isomerase in einem Gen bzw. in einem Enzym. Damit ist die offene Frage bezüglich dem ungewöhnlich hohen Molekulargewicht des Proteins P1 geklärt.

Auch die Untersuchung auf Proteinebene bestätigte dieses Ergebnis. Wie bereits erwähnt, kodiert das Gen für ein Enzym mit zwei unterschiedlichen Domänen und besitzt eine Größe von insgesamt 540 Aminosäuren bzw. ein Molekulargewicht von 58,2 kDa. Diese Größe stimmt sehr gut mit dem aus den 2D-Gelen abgeschätzten Wert für das Protein P1 überein. Auch der berechnete isoelektrische Punkt von 4,99 liegt im Bereich des für P1 ermittelten Wertes (pI 4,9). Eine Analyse des gesamten Proteins mittels Protein-Protein BLAST (blastp) bestätigte ebenfalls den Aufbau aus zwei Domänen. Die ersten 308 Aminosäuren entsprechen einer Ribokinase (RbsK), die zweiten 232 Aminosäuren einer Ribose-5-Phosphat Isomerase (RpiA) (Abbildung 4.2).

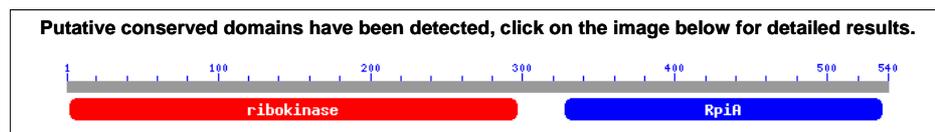


Abbildung 4.2 Ausschnitt aus der Trefferliste der blastp-Analyse des Proteins P1. Das gesamte Protein besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlichen Enzymfunktionen. Der erste Teil besitzt die vorhergesagte Funktion einer Ribokinase, der zweite Teil besitzt die Funktion einer Ribose-5-P Isomerase.

Die Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz zwischen Ribokinasen und Ribose-5-P Isomerasen verschiedener Organismen ist in einigen Abschnitten sehr hoch. Selbst zwischen weit entfernt verwandten Lebewesen gibt es Regionen, die für Ribokinasen (Abbildung 4.3, Bork *et al.* 1993, Jung *et al.* 2000) bzw. Ribose-5-P Isomerasen (Abbildung 4.4, Ishikawa *et al.* 2002, Hamada *et al.* 2003) stark konserviert sind. Mit berechneten Molekulargewichten von 32,8 kDa für die Ribokinase-Domäne und 25,4 kDa für die Ribose-5-P Isomerase-Domäne stimmen beide Werte auch gut mit den Größen der entsprechenden Proteine aus anderen Organismen überein.

Ribokinasen, die wie Adenosinkinassen, verschiedene Fruktokinassen, Inosin-Guanosin-Kinasen und weitere Kinasen zur Familie der PfkB Carbohydratkinasen zählen (Bork *et al.* 1993), wurden aufgrund ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel der meisten Lebewesen bereits gut untersucht. Vor allem am Modellorganismus *E. coli* sind zahlreiche Arbeiten dazu durchgeführt worden (Hope *et al.* 1986, Sigrell *et al.* 1997). Dank kristallographischer Untersuchungen sind selbst die Struktur des Enzyms (Dimer aus zwei identischen

Untereinheiten) und der Mechanismus der Enzymreaktion weitestgehend aufgeklärt (Sigrell *et al.* 1998 und 1999, Schumacher *et al.* 2000). In diesen Arbeiten wurden auch essentielle Sequenzmotive wie z. B. ein stark konserviertes „GG-Motiv“ bzw. eine konservierte ATP-Bindestelle beschrieben, die auch in der Ribokinase-Domäne des Proteins P1 aus *L. sanfranciscensis* wiedergefunden werden können.

```

> gi|15220039|ref|NP_173159.1| U G kinase/ribokinase [Arabidopsis thaliana]
Length=379
Score = 151 bits (381), Expect = 2e-35, Method: Composition-based stats.
Identities = 106/309 (34%), Positives = 169/309 (54%), Gaps = 12/309 (3%)
Query 4 IIVVSTNVKVLNVEKYPALPGETLAINTYQQSHGGKGANQAIAAARSGADTFITKLG
63
Sbjct 71 ++VVGSN D + +E+ GET++ T Q+ GGKGANQA A+ T F+ +LG
129
Query 64 NDEDAKMMVKGFKADG--MNDIVITTTDQETGKAYITVKSQNSIYVYGANMAMTPT
121
D K++ + DG +++D V + + TG A + + QQNSI + GGANM P
Sbjct 130 EDAHGKLIARLGGDDGCVHLDYVRSVNNPTGHAVVMLQSDGQNSI IIVYGANMKAWE
189
Query 122 DVDADKSAII-NADRVIAQLEIPVPAVIEAFKIAKEHGVQITILNPAPAKE-LPEELLKLT
179
+ I+ NA V+ Q EIP I+ K K+ GV IL+ +P ELL
Sbjct 190 IMSDDLEIVRNAGVLLQREIPDSINIQVAVKAGVVPVLDVGGMDTP IPNELLDSI
249
Query 180 DIITPNESEAATLTGIEVKDETSMLANAKFFFERGIKMWIITVGGRSFF---ATPDDH
235
DI++PNE+E + LTG+ + + + G+K V++ +G +GS P
Sbjct 250 DILSPNETELSRLTGMPETTFEIQISQAVAKCHKLVKQVQLVKGSKGSALF IQGKPIQQ
309
Query 236 ALIPPPAKVVDVTTAAGDTF IGSLASQLEIDLNSIRKAMLYASHASSLTIQVAGQNSIP
295
++IP A+VVDIT AGDTF + A + + + + + +A+ A+SL +QV GA S+P
Sbjct 310 SIIP--AAQVVDVTTAAGDTFTAFAVAM-VEGKSHEECLRFASAAAASLVCVQKGAIPSP
366
Query 296 TREAILNVI 304
E++L ++
Sbjct 367 DRKSVLKLL 375

> gi|81427812|ref|YP_394811.1| G Ribokinase [Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K]
gi|4959404|gb|AAD34338.1|AF115391.7 G ribokinase RbsK [Lactobacillus sakei]
gi|78609453|emb|CAI54499.1| G Ribokinase [Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K]
Length=302
Score = 314 bits (804), Expect = 4e-84, Method: Composition-based stats.
Identities = 177/301 (58%), Positives = 225/301 (74%), Gaps = 2/301 (0%)
Query 1 MKKIIIVGSTNVKVLNVEKYPALPGETLAINTYQQSHGGKGANQAIAAARSGADTFIT
60
Sbjct 1 MKK+IV+GSTNVD +LNV+++ PGETLA++ + GGGKGANQAIAA RSGA T FI+
59 MKKVILVGSSTNVDTILNVRFQPGETLAMDG-RAVAGGGKGANQAIAAVRSAGQTAFIG
Query 61 KLGNDKAKMMVKGFKADGMNIDVITTTDQETGKAYITVKSQNSIYVYGANMAMTPT
120
K+G + A M+ FK DGMN+D V + TG+AYI VD QQNSI +YGGAN +YT
Sbjct 60 KVGKEGAADFMDITFKDKGMNVHDVRCSETAGTQYAYIMVDAHGQNSI IIVYGANQDVT
119
Query 121 TDVDAKSAIINADRVIAQLEIPVPAVIEAFKIAKEHGVQITILNPAPA-KELPEELLKLT
179
DV ++AI ADR++AQ E+P+PA+IEAFKIA+ +GVQITILNPAPA K +P ELL +T
Sbjct 120 EDVHEAETAIKAADRVIAQFEVPIPAIEAFKIA RANGVQITILNPAPAIKNIPTTELLAVT
179
Query 180 DIITPNESEAATLTGIEVKDETSMLANAKFFFERGIKMWIITVGGRSFFATPDHALIP
239
D+I PNE+EA +TGI+V DE SM ANA+ F+ GIK+VIIITVG +GSF+ATP +P
Sbjct 180 DMIVPNTEAEIITGKVTDEASMQANAEAMFKGIKVVIIITVGGKGSFYATPTATGFVP
239
Query 240 PFPKAVVDVTTAAGDTF IGSLASQLEIDLNSIRKAMLYASHASSLTIQVAGQNSIPTREA
299
F VDTTAAGDTFIG+L+++LE+D SNI AM YA+ ASS+ +Q GAQNSIP +
Sbjct 240 AFKVNVDVTTAAGDTFIGALSTKLELDYSNIEAMTYANKASSIAVQTKGAQNSIPVEKD
299
Query 300 I 300
Sbjct 300 I 300

```

Abbildung 4.3 Ausschnitte aus der Trefferliste der blastp-Analyse der ersten 308 Aminosäuren des Proteins P1. Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen *L. sanfranciscensis* und einem Vertreter eines nah verwandten Organismus (rechte Seite: *Lactobacillus sakei*) und einem weit entfernt verwandten Organismus (linke Seite: *Arabidopsis thaliana*). Selbst bei wenig verwandten Organismen sind einige Regionen wie die ATP-Bindestelle VDTTAAGDTF oder ein „GG-Motiv“ der Ribokinase stark konserviert.

```

> gi|94536844|ref|NP_033101.2| U G ribose 5-phosphate isomerase A [Mus musculus]
Length=303
Score = 111 bits (278), Expect = 2e-23, Method: Composition-based stats.
Identities = 76/225 (33%), Positives = 126/225 (56%), Gaps = 8/225 (3%)
Query 1 MTKTEIEKQKQAARAAAYAKLVDPDHVLGLSGTAAAYFVKAINQRINDEHLDIQCVATSV
60
M+K E K+ A A V ++ VLG+GSG+T + V+ I +R+ E+LD+ C+ TS
Sbjct 68 MSKAEAKKLASHTA-VENHKNVQVLIGSGSTIVHAVQRIARQENLDDICIPTSF
126
Query 61 GTEKLAELKGMRLDVNTIDQVLDVTDGADVDVHQLNGIKGGGAALLFEKLVADMRSKQNI
120
+L + G+ + D++ ++DL +DGAD VD +LN IKGGG L EK+VA + + I
Sbjct 127 QARQLLQYGLTSLDLDQHPHIDLAIDGAEVDAAELNLIKGGGCLTQEKIVAGYASRFI
186
Query 121 WIVDQSKYTDLSLHAGH---LTIEVIPFGGMGVFRYLKEN-GYQPEFRFDN--GDILETD
174
I D K + +L + IEVIP + V R + + G + E R N G ++ TD
Sbjct 187 VIADFRKDSKGLDRWKGKIPVIEVIMAYVPSRAVAQFQGGVEVLRMAVKNAGPVV-TD
245
Query 175 SGNVLIINIIIPKADLEKLSIDLKKTQGVVEHGLFLNVCDELIIG 219
+GN++++ + +++ +K GVV+ GLF+N+ + + G
Sbjct 246 NGNFIIDWKFDVRHVKWSEVNTAIKMTGVDVGLFINMAERVYFG 290

> gi|116496102|ref|YP_807836.1| G Ribose 5-phosphate isomerase [Lactobacillus casei ATCC 334]
gi|116106252|gb|ABJ71394.1| G Ribose 5-phosphate isomerase [Lactobacillus casei ATCC 334]
Length=229
Score = 182 bits (463), Expect = 9e-45, Method: Composition-based stats.
Identities = 99/212 (46%), Positives = 139/212 (65%), Gaps = 0/212 (0%)
Query 8 KQKQAARAAAYAKLVDPDHVLGLSGTAAAYFVKAINQRINDEHLDIQCVATSVGTEKLAE
67
K K +AA AA+ V D + +GLG+G+T Y V+AI QRI DEHL++ VATSV T K AE
Sbjct 5 KLKQEAARAAEFVEDGMTIGLGTGTVVYLVVLAIAQRKIDHEHLNLTGVATSVRTRKQAE
64
Query 68 KLGMRMLDVNTIDQVLDVTDGADVDVHQLNGIKGGGAALLFEKLVADMRSKQNIWVDQSK
127
LG+ M ++ + Q+DLT+DGAD VD GIKGGG + L EK+VA S +NIIWVD++K
Sbjct 65 SLGIPMKALDEVGQIDLTDGAEVDKHPGQIKGGRSHLIEKIVAINARNIIVDETK
124
Query 128 YTDSLHGHILTIEVIPFGGMGVFRYLKENGYQPEFRFDKNGDILETDSGNLIINIIIPKD
187
D+L L +EVIPFG + + L + G +P +R ++G TDS NY+I++ + K
Sbjct 125 LVDTLGKFPPLFIEVIPFGSGKLLQLADDEGLKPAYRLNEDGSKALTDKSNYIIDLHLGKI
184
Query 188 ADLEKLSIDLKKTQGVVEHGLFLNVCDELIIG 219
L+ L KQ G+VEHGLFL+ + + + G
Sbjct 185 EHPHLLAEWLKQVIGVEHGLFLDLVKTIVVVG 216

```

Abbildung 4.4 Ausschnitte aus der Trefferliste der blastp-Analyse der zweiten 232 Aminosäuren des Proteins P1. Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen *L. sanfranciscensis* und einem Vertreter eines nah verwandten Organismus (rechte Seite: *Lactobacillus casei*) und einem weit entfernt verwandten Organismus (linke Seite: *Mus musculus*). Selbst bei nur wenig verwandten Organismen sind einige Regionen wie das „IKGGG“-Motiv, das „VLGLSGT“-Motiv, das „DGAD“-Motiv, das „EVIP“-Motiv bzw. das „GLF“-Motiv der Ribose-5-P Isomerase stark konserviert.

Aufgrund der Ähnlichkeit möglicher Reaktionszentren und der dreidimensionalen Struktur können Untersuchungsergebnisse zur Enzymreaktion wie in der Arbeit von Maj und Gupta (2001) oder von Andersson und Mowbray (2002) auf homologe Enzyme aus anderen Organismen übertragen werden. Die Dissertation von Andersson (2004) über die Enzyme des Ribose Metabolismus von *E. coli* lieferte weiteres wertvolles Wissen zu Ribokinasen. Neben diesem Enzym hat sich die Autorin in ihrer Arbeit auch mit zwei Varianten von Ribose-5-P Isomerasen (RpiA und RpiB) aus *E. coli* beschäftigt, die auf jeweils separaten Genen kodiert sind. Genau diese Enzymfunktion ist auf der zweiten Domäne des beschriebenen Proteins P1 kodiert. Die Homologie zu RpiA ist dabei höher als zu RpiB. Da es sich wie bei RbsK auch bei RpiA um ein für alle Lebewesen essentielles Protein handelt, existieren hierzu ebenfalls bereits zahlreiche Arbeiten (Skinner und Cooper 1971 und 1974, Sprenger 1995). Neben molekularbiologischen Analysen (Hove-Jensen und Maigaard 1993, Sorensen und Hove-Jensen 1996, Reuter *et al.* 1998, Jung *et al.* 2000) sind auch für dieses Enzym bereits Strukturen aus verschiedenen Organismen aufgeklärt und der Reaktionsmechanismus bekannt (Ishikawa *et al.* 2002, Rangarajan *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2003, Hamada *et al.* 2003). Wie Ribokinasen bestehen auch Ribose-5-P Isomerasen in allen Fällen aus Homo-Dimeren, die eine komplexe Struktur aus α -Helices und β -Faltblättern bilden (Andersson 2004).

Im hier untersuchten *L. sanfranciscensis* sind beide Enzyme auf einem einzigen Protein vereint. Zu welcher Auswirkung auf die Enzymaktivität diese zum ersten Mal beschriebene Kombination dieser beiden essentiellen Enzyme führt, ist bislang nicht bekannt.

Die Southern-Blot Analyse mit einer für *rbsK* spezifischen DIG markierten DNA-Sonde zeigte, dass im Genom von *L. sanfranciscensis* kein zweites Gen dieser Art vorhanden ist. Dieses Ergebnis konnten an zwei weiteren Stämmen (TMW 1.52 und 1.392) bestätigt werden. Das bedeutet, dass *L. sanfranciscensis* anscheinend kein weiteres Gen mit Ribokinase-Aktivität besitzt und somit die Phosphorylierung von Ribose komplett vom Protein P1 bewerkstelligt werden muss.

Um die prognostizierten Enzymaktivitäten dieses Proteins verifizieren zu können, sollte das Protein P1 weiter charakterisiert werden. Dazu wurde das komplette Gen (*rbsK/rpi*) nach anfänglichen Schwierigkeiten (Bildung von „inclusion bodies“) erfolgreich in *E. coli* heterolog überexprimiert und aufgereinigt. Zum Vergleich wurden auch die beiden Genabschnitte, die jeweils nur eine Enzymdomäne kodieren (*rbsK* bzw. *rpi*) einzeln überexprimiert und ebenfalls aufgereinigt.

Im Anschluss daran konnte die Aktivität der gereinigten Enzyme untersucht werden. Zum Nachweis der Ribokinase Aktivität wurde dabei der von Andersson (2004) beschriebene, pH-

Wert abhängige Enzymtest verwendet. Auch wenn diese Methoden keine genaue Quantifizierung erlaubt, ist sie dennoch dem von Hope beschriebenen und mit drei weiteren Enzymreaktionen gekoppelten Nachweis vorzuziehen (Hope *et al.* 1986, Sigrell *et al.* 1997). Auch der Nachweis reduzierender Zucker gemäß Nelson's Assay (Nelson 1944, Lopilato *et al.* 1984) oder der von Maj und Gupta beschriebene radiochemische Assay (Maj und Gupta 2001) stellen keine besseren Alternativen dar. Die Änderung der Farbe bei einem pH-Indikator wie Phenolrot (pH 6,8 gelb; pH 7,8 rot) ist nicht linear. Der Farbwechsel geschieht umso schneller, je mehr sich der pH-Wert dem Umschlagsbereich nähert. Daher war eine absolute Quantifizierung mit dieser Methode nicht möglich. Für einen semiquantitativen Nachweis der Ribokinase-Aktivität war der Test aber ausreichend. So erkannte man deutlich, dass eine Erhöhung der Enzym- oder der Substratmenge im Ansatz die Geschwindigkeit der Enzymreaktion den Erwartungen entsprechend ansteigen lässt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Standzeit zwischen Herstellung des Ansatzes (Puffer + Enzym) und dem Reaktionsstart (Zugabe der Ribose) Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit besitzt. So dauerte es z. B. mehrere Minuten bis zu einer photometrisch messbaren Farbänderung des Indikators, wenn die Reaktion unmittelbar nach Herstellung des Puffer-Enzym Ansatzes durch Zugabe der Ribose gestartet wurde. War der identische Ansatz hingegen einige Minuten gealtert, konnte nach Zugabe gleicher Substratmengen die Enzymreaktion sofort gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym, welches zunächst in Elutionspuffer gelöst ist, die entsprechenden Pufferbedingungen benötigt, um zu einem aktiven Enzym dimerisieren zu können. Diese These wurde durch die Arbeiten von Andersson und Mowbray (2002), sowie von Maj und Gupta (2001) und Sigrell *et al.* (1999) gestützt, die die Aktivierung von Ribokinase in Abhängigkeit verschiedener Parameter untersucht haben.

Alle beschriebenen Beobachtungen konnten sowohl mit dem gesamten Protein P1 (RbsK/Rpi), als auch mit der Ribokinase-Domäne alleine (RbsK) gemacht werden. Qualitative Unterschiede konnten dabei nicht festgestellt werden. Da mit dem Enzymtest keine genauere Quantifizierung der Enzymaktivität möglich war, konnte ein Unterschied der Reaktionskinetiken (Michaelis-Menten-Kinetik) zwischen dem gesamten Protein und der Ribokinase-Domäne nicht untersucht werden. Eine Behandlung der Enzymlösung für 10 min bei 85°C führte zu einer kompletten Inaktivierung. Der Einsatz der Ribose-5-P Isomerase-Domäne (Rpi) alleine zeigte wie erwartet keine Ribokinase-Aktivität.

Um die Aktivität der Ribose-5-P Isomerase nachzuweisen, stand kein passender und leicht durchführbarer Enzymtest zur Verfügung. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren sind

entweder mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht durchführbar oder nicht sensitiv genug. So konnte mittels Absorptionsmessung eine Isomerisierung von Ribose-5-P zu Ribulose-5-P weder direkt bei einer Wellenlänge von 290 nm (OD_{290}), noch indirekt durch eine Farbreaktion mit Carbazol und Bestimmung der Absorption bei 540 nm (Nachweis von Kestosen) nachgewiesen werden (Wood 1970, Dische und Borenfreund 1951, Mizanur *et al.* 2001). Die Durchführung des von Jung *et al.* (2000) beschriebenen und an mehrere Enzymreaktionen gekoppelten Aktivitätstests war mit den vorhandenen Mitteln ebenfalls nicht möglich.

Aus diesem Grund sollte die RPI-Aktivität mittels HPLC Analytik und den geeigneten Standardsubstanzen Ribose, Ribose-5-P und Ribulose-5-P nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde auch die RbsK-Aktivität mittels HPLC-Analytik untersucht. Dabei konnten die vermuteten Enzymaktivitäten qualitativ nachgewiesen werden. So konnte die Rpi-Domäne Ribose-5-P zu Ribulose-5-P und umgekehrt isomerisieren. Für die RbsK-Domäne wurde bestätigt, dass in Anwesenheit von ATP Ribose zu Ribose-5-P phosphoryliert wird. Das gesamte Protein P1 (RbsK/Rpi) ist somit in der Lage beide Reaktionen zu katalysieren.

Somit wurde experimentell bestätigt, dass die bislang einmalig beobachtete Kombination beider Enzymfunktionen im Protein P1 voll funktionsfähig ist. Ob die gekoppelte Enzymreaktion Vorteile gegenüber zwei getrennten Enzymreaktionen besitzt und dieses Protein eine evolutionäre Weiterentwicklung darstellt, ist unklar. Um den genauen Mechanismus des Proteins P1 mit den bereits bekannten Mechanismen der einzelnen Enzyme vergleichen zu können, wäre es interessant, wenn auch hier kristallographische Untersuchungen durchgeführt werden könnten.

Welche Funktion dieses Enzym im Rahmen einer Stressantwort spielt, ist nicht klar. Bisher ist weder eine Ribokinase, noch eine Ribose-5-P-Isomerase als ein durch Stress induziertes Protein bekannt. Interessant ist, dass das Protein P1 aus *L. sanfranciscensis* nicht nur unter Hochdruck, sondern auch bei Kältestress und in der stationären Phase sehr stark induziert wird (Induktionsfaktor > 10). Auch nach subletalem Salz- und Säurestress konnte eine starke bzw. mäßige Zunahme (Induktionsfaktor 5-10 bzw. 2-5) festgestellt werden. Nach einer Inkubation bei erhöhter Temperatur (Hitzestress) konnte hingegen keine Veränderung der Proteinkonzentration beobachtet werden. In Abbildung 4.5 ist ein Schema dargestellt, das neben den beiden Enzymreaktionen im Ribose-Metabolismus (Ribose => Ribose-5-P => Ribulose-5-P) auch die angrenzenden Stoffwechselwege in der Zelle zeigt, die dem Organismus bei Stress unter Umständen von Vorteil sein könnten. Neben dem normalen

Pentose Katabolismus zur Energiegewinnung könnte vor allem die Synthese von Phosphoribosyl-Pyrophosphat als Vorläufer zur Synthese der Aminosäuren Tryptophan und Histidin, bzw. zur *de novo* Synthese von Nucleotiden eine wichtige Rolle bei der Stressantwort spielen. Vor allem eine gesteigerte Synthese von GTP, das als Boten- und Signalmolekül für die Aktivierung einer Stressantwort von Bedeutung ist, könnte in diesem Zusammenhang vermutet werden.

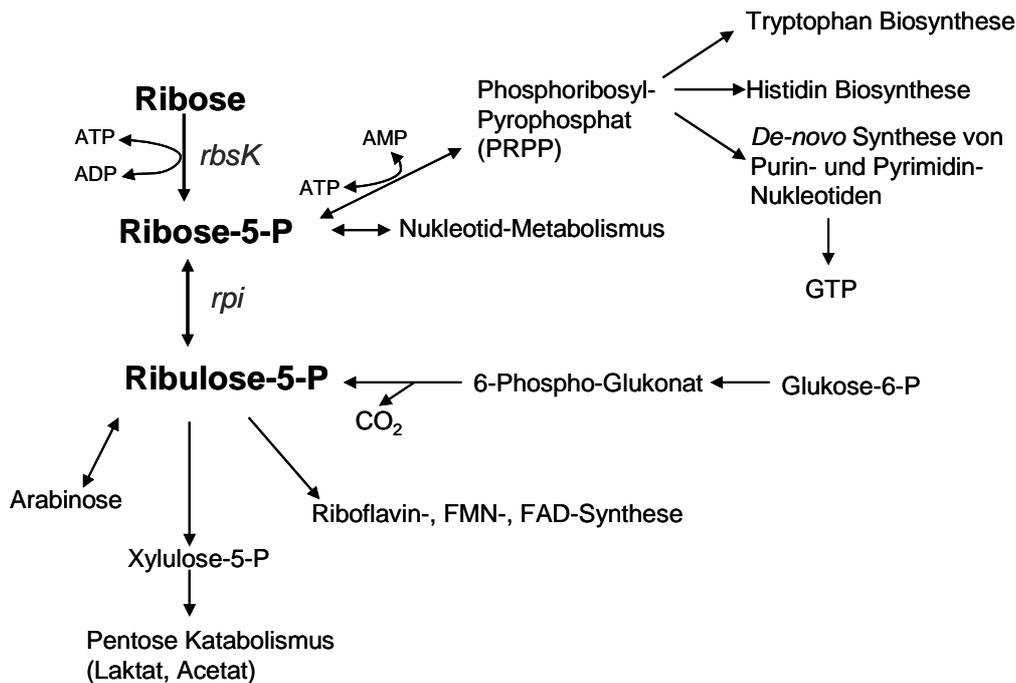


Abbildung 4.5 Stoffwechselwege ausgehend von Ribose, Ribose-5-P und Ribulose-5-P. Gezeigt sind die Enzymreaktionen der Ribokinase (*rbsK*) und Ribose-5-P-Isomerase (*rpi*) und verschiedene angrenzende Stoffwechselreaktionen, in denen die beiden Produkte Ribose-5-P und Ribulose-5-P involviert sind.

Die genaue Bedeutung des Proteins P1 im Zusammenhang mit einer Stressantwort, bzw. der Bildung von Adaptation und Kreuzresistenz ist aber noch offen, so dass darüber momentan nur spekuliert werden kann. Hier könnten Mutationsstudien, bei denen Teile des entsprechenden Gens (falls möglich) inaktiviert werden, noch weitere Erkenntnisse bringen.

4.5.2 ClpL (P2)

Das Protein P2 ist in *L. sanfranciscensis* unter Hochdruck ebenfalls stark induziert und wird außerdem auch nach Kälte- und Salzstress, sowie in stationären Zellen vermehrt angehäuft. Hitze- und Säurestress haben hingegen keinen Einfluss auf die Konzentration von P2 in den Zellen. Wie die Analyse des Peptidfragmentes bereits zeigte, besitzt das Protein P2 sehr starke Homologien von bis zu 82% zu ClpL-Proteasen aus anderen Milchsäurebakterien. (vgl. Abbildung 4.6). Nach Aufklärung der kompletten Aminosäuresequenz dieses Proteins

konnten ein isoelektrischer Punkt von 5,26 und ein molekulares Gewicht von 78,9 kDa berechnet werden. Diese Werte stimmen gut mit den aus den 2D-Gelen ermittelten Werten (M_w 85 kDa, pI 5,2) für das Protein P2 überein.

```

> gb|AAW22449.1 ClpL [Lactobacillus rhamnosus]
Length=716

Score = 877 bits (2265), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 478/690 (69%), Positives = 571/690 (82%), Gaps = 4/690 (0%)

Query 8  NDFPFGSGMDDIFNSLFFNNMGNDANARYSVNGHVLTPQEAMRRTGQIPGQIGSHNGAT 67
      NDFP  GMDD+FN + MG +ARY VNGH +TP++ A+ R TQGP+P Q
Sbjct 5  NDFPFNHGMDDVFNQMLQGMGKGESARYVNVNGHEMTPDEFAQYRATGQLPKQ--GDEIPV 62

Query 68  PTQAKQQQKAESYLDKIGRNLTDQAKQGLDPVIGRDKQEIQTAEILSRRIKNNPILVGD 127
      T KQ K L+K+GRNLT EAK G LDPVIGRD EIQTAEILSRR KNNPILVGD
Sbjct 63  ETTGKQAVKGGILEKLRNLTQEAKDGLLDPVIGRDEHEIQTAEILSRRTKNNPILVGD 122

Query 128  AGVGKTAIVEGLAQKIVKGDVPATIKDKQVISIDLSSLEAGTQYRGAYEENIQKLVVEVK 187
      AGVGKTA+VEGLAQ IVKG+VP +IKDKQ+ SIDLS+LEAGTQYRG++EE IQ L++EVK
Sbjct 123  AGVGKTAIVEGLAQAIIVKGNVPESIKDKQIWSIDLNSLEAGTQYRGSFEEKIQNLIKEVK 182

Query 188  ERKNVILFFDEIHQIVGAGASG-DETGKGLSDILKPALSRGEISVIGATTQDEYRNTIM 246
      NVILFFDEIHQI+GAGA+G +E+GGKGL+DI+KPALSRGEI+VIGATTQDEYRNTIM
Sbjct 183  AAGNVILFFDEIHQILGAGATGGEESGGKGLADIKPALSRGEITVIGATTQDEYRNTIM 242

Query 247  KDAALARRFNDVVNAPS KDTTFFELKGIKRSYEDHHQVLPDDVLKAAIEYSEQYIPQR 306
      KD+ALARRFNDV +N PS T +IL+G++K YE HH V+LP++VLKAA++YS QYIPQR
Sbjct 243  KDSALARRFNDVNTINEPSAADTVKILEGVKLYEQHHHVQLPENVLKAAVDYSIQYIPQR 302

Query 307  SLPDKAIDLIDMTAAHLAAKNPVTDKVSLEKELKAAKAQKAAHAKAEKFEAAKDKAKIA 366
      SLPDKAIDLIDMTAAHLA+K+P+ DKV LEK++K AQK A AKAE FE+AA K +IA
Sbjct 303  SLPDKAIDLIDMTAAHLASKHPIVDKVELEKQIKDLNAQKDAAKAEDFEKAANLKKETA 362

Query 367  EIEKKLSETDDTETPVAKPSDIADSVRLTGIPVVSQMSTDDMERLKSMDSRKSHIIGQ 426
      + + +L+ T++ + VA P+D+A +VERLTGIPVVS++ D+ERLK + RLK +IGQ
Sbjct 363  DKQHQLLEG-TNNEKPVVATPNVDVAAVERLTGIPVSKLGASDIERLKGIGKRLKGVIGQ 421

Query 427  DEAVDAVDAIRRNRAFDDGNRP IGSFLFVGPTGVGKTELKQALAKDMFNDEDSIIRLD 486
      DEAVD V AIRRNRAFDD+GNRP IGSFLFVGPTGVGKTEL KQLA D+F +D+IIRLD
Sbjct 422  DEAVDMVARAIRRNRAFDEGNRP IGSFLFVGPTGVGKTELAKQLALDLFGSKDAIIRLD 481

Query 487  MSEYQDETAVSKMIGATAGYVGYNDNGNTLTERVRRNPYSIVLLDEIEKANPQVITLLQ 546
      MSEY D TAVSK+IG +AGYVGYNDN NTLTE+VRRNPYSIVLLDEIEKA+PQV+TLLQ
Sbjct 482  MSEYSDRTAVSKLIGTSAGYVGYNDNKNTLTEQVRRNPYSIVLLDEIEKADPQVITLLQ 541

Query 547  VIDDGRLTDGQGNVVFKNVTVI IATSNAGFSSDAITKNQKEDMKIMDRLAPYFRPEFLNR 606
      V+DDGRLTDGQGNVV+FKNTVI IATSNAGF ++A+T +++D +M RLAPYFRPEFLNR
Sbjct 542  VLDDGRLTDGQGNVVDKNTVI IATSNAGFNEALTGEKEKEDLMDKRLAPYFRPEFLNR 601

Query 607  FNAIVEFSLTKEDLSKIVDLMIDNLDTLARKDMKLEISDEVKNWLMEQGYDEAMGARP 666
      FN IVEFSLTK DL KIVDLM++++N TLA+K + L ++D K+WL+ QGYDEAMGARP
Sbjct 602  FNGIVEFSLTKNDLKGIVDLMLEDVNTLAKKGITLTVTDAAKDWLIAQGYDEAMGARP 661

Query 667  LRRVIEQLRDKIAMFYLDHQEIKNIKAVL 696
      LRRVIE+ +RDK+ FYLDH + K ++A L
Sbjct 662  LRRVIERNIRDKVTFYLDHLKAKKLQADL 691

```

Abbildung 4.6 Blastp-Analyse der 713 Aminosäuren des Proteins P2. Eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen P2 aus *L. sanfranciscensis* und ClpL des nah verwandten Organismus *Lactobacillus rhamnosus* kann beobachtet werden. Für Clp-ATPasen typische und stark konservierte Motive wie ATP-Bindestellen können identifiziert werden (detaillierte Analyse siehe Text).

Die genauen Funktionen von ClpL sind bisher noch nicht geklärt. Bis dato gibt es nur wenige Publikationen, in denen die Expression von ClpL, das spezifisch für Gram positive Bakterien zu sein scheint, unter verschiedenen Stressbedingungen beschrieben wird. So beobachteten Varcamonti *et al.* (2006) die Induktion des „Hitzeschock-Gens“ *clpL* in *Streptococcus thermophilus* bei Hitze- und gleichzeitig auch bei Kälteschock. Bei Kältestress ist eine erhöhte Synthese von ClpL auch in Zellen von *L. sanfranciscensis* zu messen, bei Hitzestress

hingegen nicht (vgl. Tab. 3.3). Untersuchungen mit Mutanten von *S. aureus* zeigten, dass ClpL zur Bildung einer Thermotoleranz der Zellen benötigt wird (Frees *et al.* 2004). *L. rhamnosus* besitzt sogar zwei Gene, die für ClpL kodieren und bei Hitzestress verschieden stark induziert werden (Suokko *et al.* 2005). Und auch bei *O. oeni* ist eine Induktion der Expression des *clpL* Gens unter Hitzestress gezeigt (Beltramo *et al.* 2004).

Eine besonders starke Induktion von *clpL* konnte bei Zellen von *O. oeni* nach dem Eintritt der Zellen in die stationäre Phase beobachtet werden (Beltramo *et al.* 2004). Und auch bei *L. sanfranciscensis* ist die Konzentration an ClpL nach Eintritt in die stationäre Phase stark erhöht.

Wall *et al.* (2007) konnten die gesteigerte Synthese von ClpL als Antwort auf einen Säureschock bei *Lactobacillus reuteri* beobachten. Eine Knock-out Mutation im *clpL* Gen führte in diesem Bakterium zu einer signifikanten Zunahme der Sensitivität gegenüber Säurestress. Wall *et al.* (2007) haben daraus geschlossen, dass ClpL eine essentielle Funktion für das Überleben von *L. reuteri* im Gastrointestinaltrakt besitzt. Auch in der Arbeit von Len *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass ClpL bei der Säurestressantwort in Zellen von *Streptococcus mutans* eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Bei *L. sanfranciscensis* hingegen konnte weder in der vorliegenden Arbeit, noch in der Veröffentlichung zur Säurestressantwort bei *L. sanfranciscensis* von De Angelis *et al.* (2001 und 2004) eine vermehrte Bildung von ClpL im Zusammenhang mit Säurestress festgestellt werden.

Die bisher ausführlichsten Untersuchungen zu ClpL und *clpL* existieren für das pathogene Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Auch in diesem Organismus wird die Synthese von ClpL durch Hitzestress induziert (Choi *et al.* 1999). Die Bestätigung dieses Ergebnisses, sowie eine ausführliche Analyse des Gens und des Proteins stammen von Kwon *et al.* (2003). Unter anderem konnte in dieser Arbeit die Chaperon-Aktivität von ClpL experimentell bestätigt werden. Neben einer Beteiligung an der Hitzestress-Antwort scheint ClpL in diesem Organismus zusätzlich auch die Expression der Virulenzgene zu modulieren (Kwon *et al.* 2003, 2004). Außerdem wird dem Protein durch Beeinflussung des Andockens an die Wirtszelle und deren Invasion, sowie der Sekretion von TNF- α eine wichtige Rolle in den frühen Phasen der Infektion zugeschrieben (Tu *et al.* 2007). Robertson *et al.* (2002 und 2003) beschäftigten sich in ihren Arbeiten mit den physiologischen Auswirkungen der verschiedenen Clp-Proteine in *S. pneumoniae*. Neben der Erkenntnis, dass ClpL bei der Hitzestress-Antwort involviert ist, fanden sie heraus, dass im Gegensatz zu ClpX, weder ClpL, noch ClpP, ClpC oder ClpE für *S. pneumoniae* essentiell zum Überleben und Wachstum sind.

Wahrscheinlich zum ersten Mal erwähnt wurde ClpL durch Huang *et al.* (1993) bei *L. lactis*. Auf einer Transposon-ähnlichen Struktur wurde ein Gen identifiziert, das ähnlich zu Genen von ATPasen der Clp/HSP100-Familie ist und entsprechend der Nomenklatur *clpL* genannt. ClpL zählt zur Familie der Clp/HSP100 Proteine, die wiederum zur Superfamilie der AAA⁺ (ATPase associated with various cellular activities) ATPasen gehören. AAA⁺ Proteine assemblieren zu oligomeren Strukturen (meist Hexamere) und nutzen die Energie in Form von ATP um verschiedenste Zielmoleküle spezifisch zu prozessieren und mechanische Reaktionen wie Lokomotion, Entwindungs- und Entfaltungsprozesse, usw. zu katalysieren (Zietkiewicz *et al.* 2004, Maurizi und Xia 2004). Die verschiedenen Clp-ATPasen besitzen neben der Funktion als Chaperon auch Peptidase- und im Zusammenspiel mit ClpP sogar spezifische Protease-Aktivität und spielen somit eine wichtige Rolle im Protein-Qualitätskontroll-System, sowie bei der Regulation des intrazellulären Levels globaler Regulatorproteine (Abbildung 4.7, Schirmer *et al.* 1996, Gottesmann *et al.* 1997 und 2003, Hengge und Bukau 2003). Vor allem bei Stressbedingungen, die zur Denaturierung von Proteinen führen, ist die Aktivität der verschiedenen HSP100 Proteine von essentieller Bedeutung. Neben Hitzestress (Heat Shock Protein), führen auch Salz- oder Ethanol-Stress, sowie Hochdruckstress zur Denaturierung und Aggregation von Proteinen. Eine Induktion von Clp Proteinen scheint unter subletalem Hochdruck daher absolut plausibel.

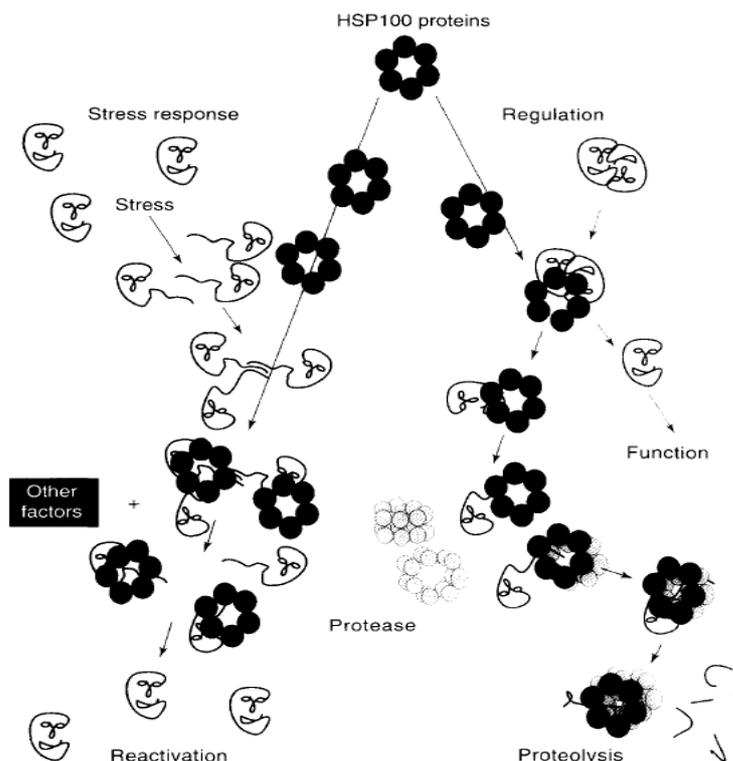


Abbildung 4.7 Übernommen aus Schirmer *et al.* 1996. Es werden die verschiedenen Funktionen von HSP100 Proteinen gezeigt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Aufgrund der komplexen und verschiedenartigen Prozesse, dem Zusammenspiel unterschiedlicher Proteinmaschinerien und den unzähligen Zielmolekülen existieren wie bereits erwähnt nur ungefähre Vorstellungen über die Regulation und Aufgaben der einzelnen Mitglieder dieser Proteinfamilie. Bisher sind nur wenige Details zu den einzelnen Clp-ATPasen geklärt. Die meisten Untersuchungen bezüglich Clp-Proteine existieren für bakterielle Clp-ATPasen. Aber auch in Eukaryoten ist diese Proteinfamilie konserviert und wurde dort im Zytosol und in Chloroplasten von Pflanzen, sowie in Mitochondrien nachgewiesen (Beyer 1997, Maurizi und Xia 2004).

Clp-Proteine werden in zwei große Klassen mit ursprünglich insgesamt 8 Unterfamilien unterteilt (Schirmer *et al.* 1996). Vertreter der Klasse I (ClpA, ClpB, ClpC, ClpD und gemäß Derré *et al.* (1999b) auch ClpE) besitzen generell zwei stark konservierte Nukleotid-Binde-Domänen (NBD), die auch als Walker-Consensus-Motiv bezeichnet werden und an die jeweils ein ATP Molekül binden kann (Schirmer *et al.* 1996, Maurizi und Xia 2004). Typisch ist dabei ein „G-X₄-GKT“-Motiv, welches auch bei ClpL aus *L. sanfranciscensis* zweimal identifiziert werden kann (Aminosäuren: 126 – 133 und 458 – 465, vgl. Abbildung 4.7). Darüber hinaus werden in der ClpL Sequenz von *L. sanfranciscensis* weitere konservierte Motive gefunden. Ein „TGIPV“-Motiv (397 - 401) (entspricht Sequenz III nach Schirmer *et al.* 1996) in der Spacer-Region zwischen den beiden NBDs ist auch in vielen anderen Clp-Proteinen der Klasse I vorhanden. Auch am C-terminalen Ende sind bei ClpL von *L. sanfranciscensis* zwei typische Sequenzen zu finden. Zum einen handelt es sich dabei um ein „FRPEFLNR“-Motiv (599 - 606) und ein „GARPLRR-X-I“-Motiv (663 - 671) (entspricht Sequenzen IV und V nach Schirmer *et al.* 1996, vgl. Abbildung 4.7). Die Funktionen der meisten dieser konservierten Regionen sind bisher noch nicht endgültig geklärt. Der N-terminale Bereich von Protein P2 aus *L. sanfranciscensis* besitzt kein für bisher bekannte Clp-ATPasen typisches Sequenzmotiv. Da das Protein aber ein für ClpL-ATPasen typisches „MDD-I/L-FN-Q/S-L“-Motiv aufweist (16 – 23, vgl. Abbildung 4.7, Kwon *et al.* 2003), kann P2 aus *L. sanfranciscensis* zu den bereits bekannten ClpL-ATPasen gezählt und gemäß der von Schirmer *et al.* (1996) geprägten Einteilung zusammen mit diesen zu einer neuen ClpL-Subfamilie der Klasse I HSP100 Proteine zusammengefasst werden (vgl. auch Beltramo *et al.* 2004, Frees *et al.* 2004).

Die in der Regel deutlich kürzeren Clp-ATPasen der Klasse II (ClpM, ClpN, ClpX, ClpY), besitzen als klassisches Merkmal nur eine NBD. Neben den bereits erwähnten möglichen Funktionen der verschiedenen Clp-ATPasen besitzen die meisten Vertreter in Kombination mit der Serin-Protease ClpP zusätzlich spezifische Protease Aktivität. Kim *et al.* (2001)

finden anhand von Homologiestudien verschiedener Clp-ATPasen aus unterschiedlichen Organismen ein Tripeptid-Motiv „L/I/V-G-F/L“, welches zur Bindung mit ClpP benötigt wird. Mutationen in diesem Bereich haben zur Folge, dass die spezifische Protease-Aktivität in der Zelle verloren geht. Sie hat aber keine Auswirkungen auf die anderen Aktivitäten der beispielhaft untersuchten ClpX-ATPase aus *E. coli* (Kim *et al.* 2001). Die ClpB-Unterfamilie bildete die bislang einzige Ausnahme unter den Clp-ATPasen, die diese Erkennungssequenz zur Bindung mit ClpP nicht besitzt (Ingmer *et al.* 1999, Mogk *et al.* 2003, Chandu und Nandi 2004). Bei ClpL Proteinen aus *L. sanfranciscensis* und *S. aureus* ist diese Erkennungssequenz aber ebenfalls nicht vorhanden (vgl. Abbildung 4.7, Frees *et al.* 2004). ClpL-ATPasen besitzen somit als zweite Unterfamilie neben ClpB anscheinend keine spezifische Protease-Aktivität zusammen mit ClpP.

Anhand von röntgenkristallographischen Strukturanalysen, elektronenmikroskopischen Untersuchungen und verschiedenen Mutationsstudien konnten in den letzten Jahren zumindest für die bekanntesten Clp-ATPasen Aussagen zu möglichen Funktionen getroffen werden (Maurizi und Xia 2004). So wurde beispielsweise entdeckt, dass ClpA als hexamere Ringstruktur in Kombination mit zwei ClpP-Ringen (jeweils ein Heptamer) die regulatorische Einheit der spezifischen Protease ClpAP bildet (siehe Abbildung 4.8).

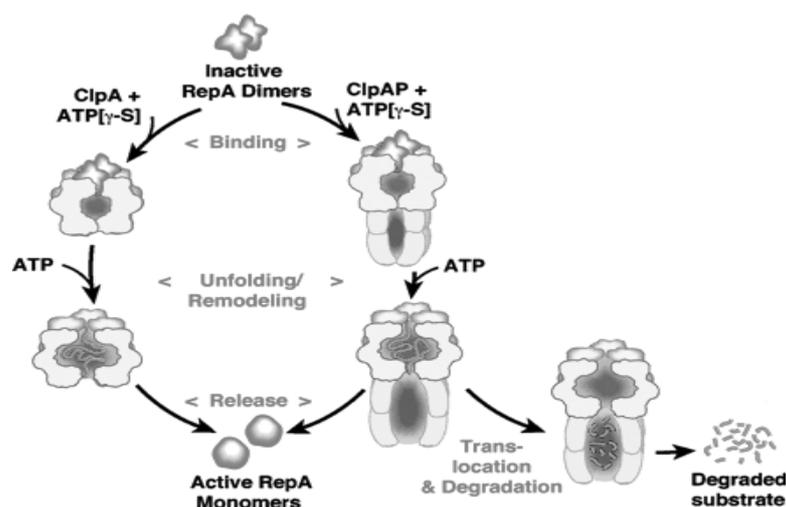


Abbildung 4.8 Schema zur Veranschaulichung möglicher Funktionen von Clp-ATPasen alleine oder in Kombination mit der Serinprotease ClpP. Gezeigt ist der beispielhafte Abbau bzw. die Renaturierung von inaktivem RepA durch ClpA bzw. ClpAP. Details siehe Text. Abbildung aus Pak *et al.* 1999 bzw. in Anlehnung an Hoskins und Wickner 2006.

ClpAP ist in der Lage entweder als spezifische Protease bestimmte inaktive Zielmoleküle wie RepA abzubauen oder zu renaturieren. Letztere Funktion kann auch ClpA alleine bewerkstelligen. In allen Fällen wird Energie in Form von ATP benötigt. Während ClpP das

proteolytische Zentrum bildet sind die verschiedenen Clp-ATPasen für die spezifische Substraterkennung und -bindung, sowie die Entfaltung und Translokation des Zielmoleküls durch eine Pore ins katalytische Zentrum von ClpP zuständig (Hoskins und Wickner 2006).

Mit Ausnahme von ClpB und ClpL kann in Abbildung 4.8 anstelle von ClpA jede andere bisher untersuchte Clp-ATPase aufgeführt werden, solange sie eine Bindung mit ClpP eingehen kann. Die einzelnen ATPasen unterscheiden sich dabei größtenteils nur in der Substratspezifität. So kann ClpA zum Beispiel bestimmte Struktur motive wie etwa gewisse Sequenzen von RepA erkennen, die zur Prozessierung des Proteins führen. Dabei spielt es nur eine geringe Rolle ob das Substratprotein alleine vorliegt oder ob es zum Beispiel an GFP fusioniert ist. ClpA kann aber auch unspezifisch Proteine erkennen, bzw. mit Hilfe eines Adaptorproteins wie ClpS weitere Zielmoleküle spezifisch binden und entsprechend prozessieren (vgl. Abbildung 4.9 Mitte).

Eine Besonderheit von ClpX bzw. ClpXP ist die Erkennung von Substraten, die ein spezifisches Target besitzen oder deren Zielmoleküle ebenfalls über spezielle Adaptoren präsentiert werden (vgl. Abbildung 4.9 unten).

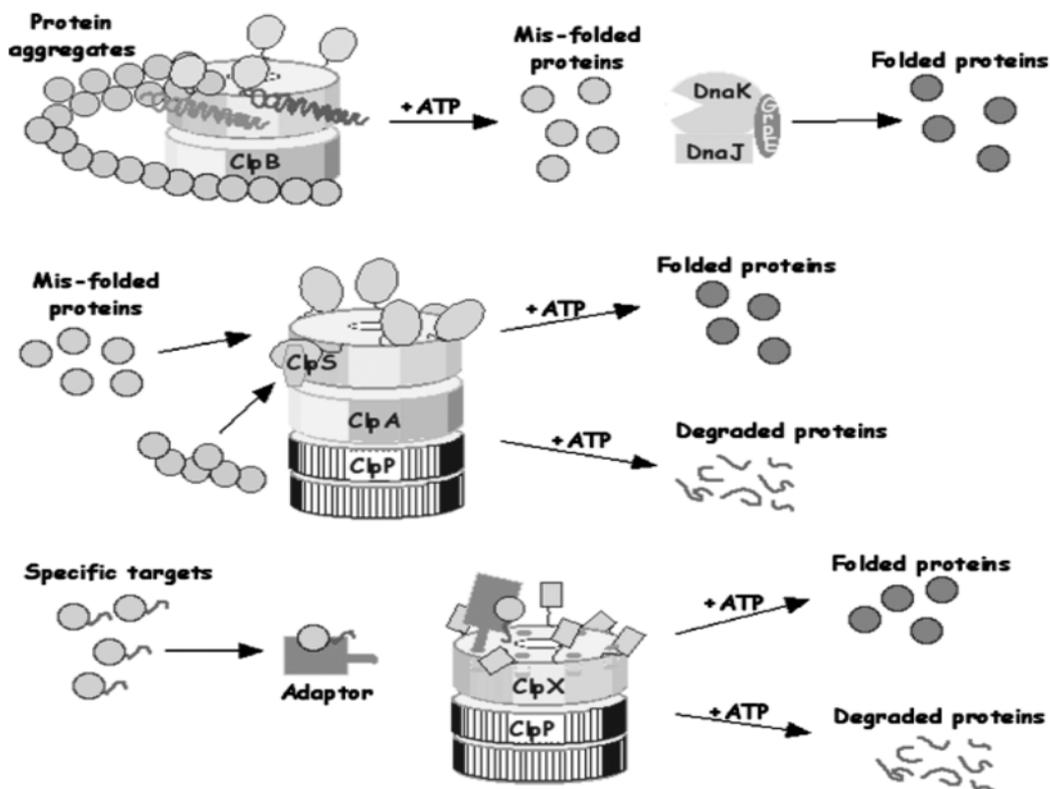


Abbildung 4.9 Schema zu den verschiedenen Funktionen ausgewählter Clp-ATPasen. Gezeigt sind Funktionen und Interaktionen von ClpB (oben), ClpA/ClpAP (Mitte) und ClpX/ClpXP (unten). Details siehe Text. Abbildung aus Maurizi und Xia 2004.

Clp-ATPasen wie ClpB und ClpL, die anscheinend keine Bindung mit ClpP eingehen können, besitzen wie bereits mehrfach erwähnt wahrscheinlich keine spezifische Protease Funktion. Stattdessen kann ClpB zusammen mit weiteren Stressproteinen wirkungsvolle Chaperon-Maschinerien bilden, die auch komplexe Proteinaggregate renaturieren können (vgl. Abbildung 4.9 oben). ClpB übernimmt in diesem Fall den ersten ATP abhängigen Schritt bei der Disaggregation dieser Komplexe.

Solange für ClpL keine spezifischen Funktionen bekannt sind und auch nicht sicher ist, ob *L. sanfranciscensis* eine ClpB-ATPase besitzt, liegt es nahe, dass der ClpL-ATPase ähnliche Eigenschaften wie dem nah verwandten ClpB zugeschrieben werden. Dafür spricht auch, dass bei *E. coli*, der wiederum kein ClpL besitzt unter Hochdruckstress die Synthese von ClpB induziert wird (Aertsen *et al.* 2004a). Somit könnte ClpL in *L. sanfranciscensis* unter Umständen die Rolle von ClpB in *E. coli* übernehmen. Ein weiterer Hinweis dafür ist die Induktion von DnaK und GroEL sowohl bei *E. coli*, als auch bei *L. sanfranciscensis* unter hohem hydrostatischem Druck, der zur Aggregation von Proteinen führt. Zusammen mit diesen beiden bekannten Stressproteinen könnte ClpB, bzw. ClpL das von Ben-Zvi und Goloubinoff (2001) postulierte Chaperon-Netzwerk zur Renaturierung komplexer Proteinaggregate bilden (Abbildung 4.10).

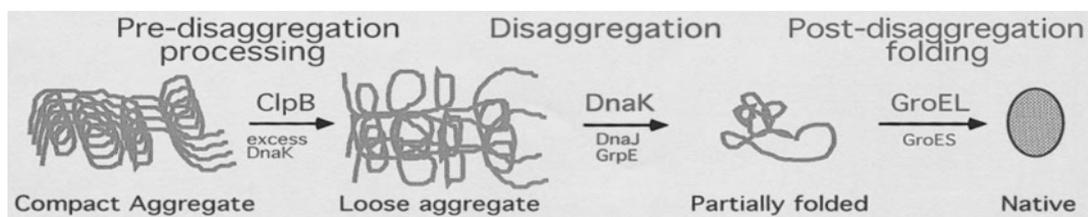


Abbildung 4.10 Schema der verschiedenen Funktionen eines Chaperon-Netzwerkes. Gezeigt ist das Chaperon-Netzwerk bestehend aus ClpB, DnaK mit den Co-Chaperonen DnaJ und GrpE, sowie GroESL. Die Clp-ATPase übernimmt dabei die Disaggregation kompakter Proteinaggrgate. Unter Umständen besitzt ClpL die gleiche Funktion wie ClpB in *E. coli*. Abbildung aus Ben-Zvi und Goloubinoff (2001)

In Abbildung 4.11 ist der Mechanismus gezeigt, wie ClpB unter Verbrauch von ATP komplexe Aggregate so verändert, dass diese durch DnaK weiterprozessiert werden können (Goloubinoff *et al.* 1999).

Auch wenn die genaue Funktion von ClpL aus *L. sanfranciscensis* im Zusammenhang mit Hochdruck und anderen Stressarten nicht geklärt ist, kann für ClpL eine ähnliche Funktion wie für ClpB in *E. coli* vermutet werden. Zu derselben Annahme kamen Frees *et al.* (2007) in einer aktuellen Arbeit über *S. aureus*. Auch die Tatsache, dass bei *E. coli*, der als Gram negatives

Bakterium kein ClpL besitzt, unter Hochdruck gleichzeitig die Synthese von ClpB, DnaK und GroEL induziert wird, unterstützt diese Hypothese (Welch *et al.* 1993).

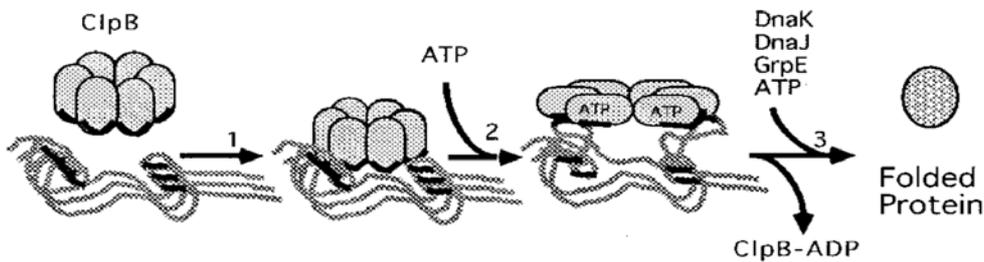


Abbildung 4.11 Möglicher Mechanismus der Disaggregation durch ClpB. ClpB-Ring interagiert mit dem Protein-Aggregat (1). Die Bindung von ATP induziert strukturelle Änderungen im ClpB-Ring, so dass die Aggregate aufgelöst werden und spezifische hydrophobe Bereiche zugänglich werden (2). DnaK bindet zusammen mit den Cochaperonen DnaJ und GrpE an diese hydrophoben Stellen und prozessiert die einzelnen Proteine zur nativen Form weiter (3). Abbildung aus Ben-Zvi und Goloubinoff (2001) und Goloubinoff *et al.* 1999.

In Zellen von *L. sanfranciscensis*, in denen bisher kein ClpB nachgewiesen wurde, ist es daher denkbar, dass ClpL gemeinsam mit DnaK und GroEL die Rolle übernimmt komplexe Proteinaggregate zu renaturieren. Um sicher zu gehen müssten in Folgearbeiten weitere Analysen und des Proteins durchgeführt werden. Die heterologe Expression und Aufreinigung von ClpL aus *L. sanfranciscensis* wurde bereits in dieser Arbeit gezeigt und durchgeführt.

4.5.3 DnaK (P8)

Die erhöhte Konzentration von DnaK in Zellen von *L. sanfranciscensis* nach einer Hochdruckbehandlung unterstützt die These, dass ClpL eine ähnliche Funktion wie ClpB besitzt. DnaK könnte zusammen mit ClpL dafür sorgen, dass durch Hochdruck gebildete Proteinaggregate wieder renaturiert werden und der Zelle dadurch kein weiterer Schaden entsteht. Auch in *S. pneumoniae* konnte die gemeinsame Induktion von ClpL, DnaK und GroEL nach einem Hitzeschock beobachtet werden (Kwon *et al.* 2003), was wiederum für eine Zusammenarbeit der drei verschiedenen Chaperone gemäß dem in Abbildung 4.10 dargestellten Schema spricht. Aber auch für andere Clp-ATPasen wurden synergistische Aktionen mit DnaK beschrieben (Zavilgelsky *et al.* 2002, Zietkiewicz *et al.* 2004). Da das auch als HSP70 bezeichnete DnaK Chaperon sowohl bei Eu-, als auch bei Prokaryoten eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung spielt und bereits seit über 35 Jahren im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen steht, handelt es sich heute um das wohl am besten untersuchte Stressprotein überhaupt (Brehmer 2001, Deuerling und Bukau 2004, Mayer und Bukau 2005).

Eine Blastp-Analyse zeigt dabei die hohe Übereinstimmung mit DnaK-Chaperonen aus anderen Organismen (Abbildung 4.12).

```

> gi|116333935|ref|YP_795462.1| G Molecular chaperone [Lactobacillus brevis ATCC
367]
gi|116099282|gb|ABJ64431.1| G Molecular chaperone [Lactobacillus brevis ATCC 367]
Length=619

Score = 867 bits (2241), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 504/619 (81%), Positives = 557/619 (89%), Gaps = 5/619 (0%)

Query 1 MASNKVIIGIDLGTTNSAVAVMEGGKPKIITNPDGSRTPPSVAVFKNGEIQVGEVAKRQEI 60
MASNK+IGIDLGTTNSAVAV+EG PKII N +G+RTTPSVVAFK+GE QVGEVAKRQ I
Sbjct 1 MASNKIIGIDLGTTNSAVAVLEGSTPKIIANKEGARTTPSVVAFKDGETQVGEVAKRQAI 60

Query 61 TNPNTVRSIKSHMGEEGYTVDIDGKKYTPQQISAMILQYIKGYAEDYLGDTVSEAVITVP 120
TNPNT+ SIKSHMGE GY V +DGK YTPQQ+SAMILQ++K +AEDY+GDTV +AVITVP
Sbjct 61 TNPNTISSIKSHMGEAGYKVSVDGKDYTPQQVSAMILQHLKFAEDYIGDTVVEKAVITVP 120

Query 121 AYPNDAQRQATKDAGKIAGLDVKRIINEPTAAALAYGLDKQDKDEKILVYDLGGGTFDVS 180
AYFNDAQRQATKDAGKIAGL V+RIINEPTAAALAYGLDKQDKDEK+LVYDLGGGTFDVS
Sbjct 121 AYPNDAQRQATKDAGKIAGLSVERIINEPTAAALAYGLDKQDKDEKVLVYDLGGGTFDVS 180

Query 181 VLELGDGVFQVLSNMGDTHLGGDDFDQRIIDYLVAEFKKENGVDLAQDKMALQRLKDAAE 240
VLELGDGVF VLSNMGDTHLGGDDFDQ+I+D+LVA FK+ENGVDL++DKMALQRLKDAAE
Sbjct 181 VLELGDGVFVLSNMGDTHLGGDDFDQKIMDWLVAGFKEENGVDLSKDKMALQRLKDAAE 240

Query 241 KAKKELSGVNQTEISLPIIASNDNGPLHLQTTLTRAKFNEALTHDLVEKTKIPFENALKDA 300
KAKK+LSGV + +ISLPII++ +NGPLHL+ +L+RAKFNELT DLVEKT+IP +NALKDA
Sbjct 241 KAKKDLSGVTEAQISLPIISAGENGLHLEKSLRAKFNELTADLVEKTRIPVQNALKDA 300

Query 301 GLTSDSIDVILNGGSTRIPAVQEAVKWEGKEPNHNSINPDEAVALGAAVQGGVLTGDVK 360
L SDID VILNGGSTRIPAVQEAVK W+GKEPNHNSINPDEAVALGAAVQGGV+TGDVK
Sbjct 301 DLQASDIDVVILNGGSTRIPAVQEAVSWTGEKPNHNSINPDEAVALGAAVQGGVITGDVK 360

Query 361 DVVLLDVTPLSLGIETMGGVMTKLEKNTTIPTSKSQTFSTAADNQTAVDIHLVQGERPM 420
DVVLLDVTPLSLGIETMGGV TKLI++NTTIPTSKSQ FSTAADNQ AVDIHLVQGERPM
Sbjct 361 DVVLLDVTPLSLGIETMGGVFTKLIIDRNTTIPTSKSQVFTAADNQPAVDIHLVQGERPM 420

Query 421 AADNKLGRFQLTDIPAAPRGPQIEVTFDIDKNGIIVNVSADKGTGKEQKITIKSDNGL 480
AADNK+LG FQLTDIPAAPRG+PQI+VTFDIDKNGIIVNVSADK GT KEQKITIK S+GL
Sbjct 421 AADNKTLGRFQLTDIPAAPRGPVQIQVTFDIDKNGIIVNVSADKMGTNKEQKITIKSSDGL 480

Query 481 SDEEIEKMMNEAKNEEADKKKEEVDLNNNEVDQLIFQTDKTLKDVGEKVSDEIEKGVKD 540
SDEEIEKMMNEAK NEEADKK+KEEVD NEVDQL+FQTDKTLKDV+GKVS+DEIK +D
Sbjct 481 SDEEIEKMMNEAKNEEADKKRKEEVDTKNEVDQLLFQTDKTLKDVKGKVSDEIEKKAED 540

Query 541 AEEELKKAADGNLDDMKAKKDTLNEKVQAVAVKLYQQQSQ----GGEAGAANGDASK 595
A + LKKA+ NLDDMKAKK L + +Q ++VKLYQQ QS+ A A DA K
Sbjct 541 ARDALKKAQEANNLDDMKAKKDDLTKIIQDLSVKLYQQAQSEAGDGNAAGADGATADADK 600

Query 596 KDDNTVDGDFHEVHDDDKK 614
KDDNTVDGDFHEV+DDDKK
Sbjct 601 KDDNTVDGDFHEVNDDDKK 619

```

Abbildung 4.12 Blastp-Analyse der 614 Aminosäuren des Proteins P8. Die hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen dem Protein P8 aus *L. sanfranciscensis* und DnaK aus *Lactobacillus brevis* zeigt die starke Konservierung des Chaperons. Aufgrund der bereits bekannten Gensequenz von *dnaK* aus *L. sanfranciscensis* war die Proteinidentifizierung ohne weiteres möglich. Mit einem theoretisch errechneten Molekulargewicht von 66 kDa und einem *pI* von 4,8 stimmte es auch gut mit den aus den 2D-Gelen ermittelten Daten von 75 kDa und einem *pI*-Wert von ca. 4,4 überein.

Karlin und Brocchieri (1998) analysierten die Sequenzen von Hsp70 Proteinen aus verschiedenen Organismen aller Reiche (Eukaryoten, Prokaryoten, Archaeobakterien). Dabei konnten sie selbst bei den unterschiedlichsten Lebensformen auffallend viele konservierte Sequenzmotive in den Hsp70 Proteinen identifizieren, die auch im DnaK Protein aus *L. sanfranciscensis* wiederzufinden sind. Aber nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf

genetischer Ebene ist das *dnaK*-Operon und dessen Regulation ausführlich untersucht (siehe Kapitel 4.6.1 und 4.6.3.6). Die genetische Regulation ist in Gram negativen und Gram positiven Bakterien dabei grundlegend verschieden und auch innerhalb einer Gattung bestehen zum Teil Unterschiede, die in erster Linie auf der Transkriptionsregulation basieren (Koch *et al.* 1998, Ventura *et al.* 2005). Daraus kann man schließen, dass auch die Expression von *dnaK*, sowie die Synthese von DnaK in den verschiedenen Organismen nicht unbedingt immer identisch sind. Untersuchungen mit Milchsäurebakterien sind selten, zeigen aber, dass DnaK nicht nur unter Hitzestress vermehrt synthetisiert wird. So ist bei *L. lactis* neben Hitzestress (Whitacker und Batt 1991, Auffrey *et al.* 1992) auch Salzstress Auslöser für eine erhöhte Konzentration an DnaK in den Zellen (Kilstrup *et al.* 1997). Ebenso führt bei verschiedenen Bifidobakterien, sowie bei *Enterococcus faecalis* Salzstress zu einer verstärkten Transkription von *dnaK* (Schmidt und Zink 2000, Laport *et al.* 2004 und 2006, Ventura *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch bei *L. sanfranciscensis* nicht nur Hitzestress, sondern auch Salz-, Säure- und auch Hochdruckstress zu einer erhöhten Synthese von DnaK in den Zellen führt, während hingegen Kälte- und Hungerstress keine Auswirkungen auf die Menge dieses Proteins haben.

Funktionelle Studien wurden vor allem mit DnaK aus Eukaryoten und dem Gram negativen Bakterium *E. coli*, zum Teil aber auch mit dem Gram positiven Bakterium *B. subtilis* durchgeführt (Schulz *et al.* 1995, Koch *et al.* 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass DnaK zusammen mit den beiden Co-Chaperonen DnaJ und GrpE als Chaperon-Komplex aktiv ist und bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt (Mayer und Bukau 2005). Neben der Unterstützung bei der richtigen Faltung neu synthetisierter Proteine (Deuerling *et al.* 1999), minimiert und verhindert DnaK auch die Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen (Mogk *et al.* 1999), bzw. ist an der Rückfaltung von denaturierten Proteinen beteiligt (Zietkiewicz *et al.* 2004). In zahlreichen Fällen kooperiert das DnaK-DnaJ-GrpE Chaperon-System dabei auch mit anderen Chaperonen wie zum Beispiel dem GroESL-System oder der bereits erwähnten ClpB-ATPase (vgl. dazu Abbildung 4.10).

Darüber hinaus ist DnaK auch an der Translokation von sekretorischen Proteinen durch Membranen, sowie der Assemblierung und Disassemblierung von oligomeren Proteinstrukturen und der Aktivitätskontrolle von Regulatorproteinen beteiligt. Es kann also vermutet werden, dass DnaK-Chaperone am Faltungsweg der meisten Proteine beteiligt sind (Brehmer 2001). In allen Fällen ist Energie in Form von ATP notwendig. DnaJ triggert dabei die Hydrolyse von an DnaK gebundenem ATP und beschleunigt dadurch den Durchsatz an Substrat (Liberek *et al.* 1991). Darüber hinaus unterstützt DnaJ die Substratbindung an DnaK

(Han und Christen 2003, Laufen *et al.* 1999). GrpE, das als Nukleotid-Austauschfaktor arbeitet, ist für die Freisetzung des umgesetzten Substrats zuständig. Durch den ADP/ATP Austausch wird DnaK vom Substrat befreit und steht für neue Reaktionen zur Verfügung. Ausführlichere Darstellungen sind in zahlreichen Review-Artikeln und Dissertationen im Detail beschrieben und publiziert, auf die an dieser Stelle nur hingewiesen werden soll (z.B. Brehmer 2001, Deuerling und Bukau 2004, Mayer und Bukau 2005).

4.5.4 GroEL (P9)

Ein weiteres der unter Hochdruck induzierten Proteine konnte als GroEL (Proteinspot P9) identifiziert werden. Bei dem auch als Hsp60 bekannten GroEL handelt es sich um ein weiteres typisches Stressprotein, das ebenso wie DnaK sowohl in Prokaryoten, als auch bei Eukaryoten vorkommt und ebenfalls stark konserviert ist. Die für GroEL identifizierte Aminosäuresequenz aus *L. sanfranciscensis* besitzt sehr starke Homologien zu den entsprechenden GroEL Chaperonen anderer Milchsäurebakterien (Abbildung 4.13).

```

> gi|116333267|ref|YP\_794794.1|  Chaperonin GroEL (HSP60 family)
[Lactobacillus brevis ATCC 367]
gi|116098614|gb|ABJ63763.1|  Chaperonin GroEL (HSP60 family) [Lactobacillus
brevis ATCC 367]
Length=541

Score = 725 bits (1872), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 422/521 (80%), Positives = 474/521 (90%), Gaps = 1/521 (0%)

Query 1 MAKEIKFSDDARSEMLKGVDKLADTVKSTMGPKGRNVVLEETAGNPTITNDGVTIARAIS 60
      MAKE+KFS+DARS+ML GVDKLA+TVK+T+GPKGRNVVLE++ GNPTITNDGVTIA+AI
Sbjct 1 MAKELKFSSEDARSKMLAGVDKLANTVKTTLGPKGRNVVLEQSYGNPTITNDGVTIAKAI 60

Query 61 LPDHFQNMGAQLVAEVASKTNDVAGDGTTTATVLTQAIVKEGMKNVTAGANPVGVRRGIE 120
      L DHF+NMGAQLV+EVASKTND+AGDGTTTATVLTQAIV EGMKNVTAGANPVG+RRGIE
Sbjct 61 LEDHFENMGAQLVSEVASKTNDIAGDGTTTATVLTQAIVNEGMKNVTAGANPVGIRRGIE 120

Query 121 KATAAAVAGLHKMESHKVENKEDIAQIASISSASEKVGKLIADAMEKVGNDGVITIEDSKG 180
      KAT AAV LHKMESH V+ K+DIAQIASISSAS++ GKLIADAMEKVGNDGVITIE+S+G
Sbjct 121 KATGAAVDALHKMESHVKTDDIAQIASISSASKETGKLIADAMEKVGNDGVITIEESRG 180

Query 181 VETSLDVEEGMEFDRGYMSQYMTDQEKMEADLDNPFYLLVTDKKINNMQDIMSLLEQEVVQ 240
      V+TSLDVEEGM+FDRGYMSQYMTD +KMEA+LDNPFYLL+TDKKI N+QDI+ LLQ VV+
Sbjct 181 VDTSLDVEEGMQFDRGYMSQYMTDNDKMEANLDNPFYLLITDKKIANIQDILPLLQSVVE 240

Query 241 QRSRLLIADDIGGEVLPPTLVLNKMRGTFNVVAVKAPGFGDRRXXXXIALLTGATVIT 300
      Q RSLLIADDI GE LPTLVLNKMRGTFNVVAVKAPGFGDRRK DIA+LTG TVIT
Sbjct 241 QRSRLLIADDITGEALPPTLVLNKMRGTFNVVAVKAPGFGDRRKAQLQDI AVL TGGTVIT 300

Query 301 DDLGLELKDTTLEQLGQANKVNVTKDKTTIVEGKGSKEAIAKRVNEIKTQLAATTSQFDR 360
      DDLGL LKDDT+QLGQA KVNVTKD TT+VEG GSK+ IA RV EIK Q+ TTS FDR
Sbjct 301 DDLGLNLKDDTTIDQLGQAQKVNVTKDDTTVVEGAGSKDQIARVAEIKQIEDTTSDFDR 360

Query 361 EKLQERLAKLAGGVAVIKVGAAATELKERKYRIEDALNATRAAVEEGFVPGGTAFINI 420
      +KL+ERLAKL+GGVAV++VGAATELKERKYRIEDALNATRAAVEEGFV GGGTA IN+
Sbjct 361 DKLKERLAKLGGVAVVRVGAATELKERKYRIEDALNATRAAVEEGFVAGGTTALINV 420

Query 421 LKDVDVAEATGDEKTGVEIVSRALEAPVKQIAANAGVDGAVVVDHLKQKPGIGYNAADD 480
      + DV +EA GDEKTG+ IV RALE PV+QIA NAGV+G+VVV+HLK EKP+GYNAAD+
Sbjct 421 IGDVAKLEAEGDEKTGINIVLRALEEPVRQIAQNAGVEGVSVVVEHLKGEKPGVGYNAADN 480

Query 481 KYEDMIAAGVVDPTKVSRSALQNAASVSSLLLTTEAVVAE 521
      KYEDM+AA+ DPTKV+RSALQNAASVS+ LLLTTEAVVAE
Sbjct 481 KYEDMVAAGITDPTKVRSALQNAASVSA-LLLTTEAVVAE 520

```

Abbildung 4.13 Blastp-Analyse der 538 Aminosäuren des Proteins P9. Der Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen dem Protein P9 aus *L. sanfranciscensis* und GroEL aus *Lactobacillus brevis* bestätigt die hohe Übereinstimmung des Chaperons in verschiedenen Organismen.

Auch das berechnete Molekulargewicht von 57,3 kDa und der isoelektrische Punkt von 5,2 stimmen gut mit den experimentell ermittelten Werten des Proteinspots P9 (M_r 65 kDa, pI 4,8) überein. Die Sequenzierung des Gens zeigte, dass wie bei allen anderen bisher untersuchten Milchsäurebakterien *groEL* zusammen mit dem Gen für das Co-Chaperon GroES im gemeinsamen Operon *groESL* liegt. Aufgrund der geringen Größe von lediglich 94 Aminosäuren (10,3 kDa) konnte das Co-Chaperon GroES im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalyse nicht nachgewiesen werden. Da wie später noch gezeigt, beide Proteine aber gemeinsam reguliert werden, ist davon auszugehen, dass ähnlich wie bei *E. coli*, auch bei *L. sanfranciscensis* die Synthese von GroES durch Hochdruck induziert wird (Welch *et al.* 1993, Aertsen *et al.* 2004). Auch bei vielen anderen Stressbedingungen kann in der Regel neben der Induktion von GroEL immer auch eine erhöhte Konzentration an GroES in der Zelle gemessen werden.

Dies erscheint sinnvoll, da GroEL zusammen mit GroES neben dem DnaK-DnaJ-GrpE-System ein weiteres Chaperon-System bildet, dessen Struktur und Funktion ebenfalls in zahlreichen Publikationen beschrieben wurde. Die grundlegenden Arbeiten zur Funktion von GroEL in Bakterien wurden auch in diesem Fall vor allem an den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* durchgeführt (Segal und Ron 1996). Aber auch für einige Milchsäurebakterien existieren Untersuchungen zu GroEL auf Genom- und Proteomebene (Kilstrup *et al.* 1997, Broadbent *et al.* 1998, Walker *et al.* 1999, De Angelis und Gobbetti 2004, Laport *et al.* 2004). Das funktionelle GroEL Chaperon besteht aus 14 identischen Untereinheiten, die zwei übereinanderliegende Ringe mit einem fassähnlichen Hohlraum bilden. Exponierte hydrophobe Aminosäuren dienen als Substratbindestellen. Das Co-Chaperon GroES liegt als heptamerer Ring vor, interagiert über flexible Polypeptidschleifen mit GroEL und kann als sogenannter "Deckel" den durch GroEL gebildeten Hohlraum mit dem darin gebundenen Substrat verschließen. Die Bindung von ATP führt dann zu einer sukzessiven Vergrößerung des Hohlraums bei gleichzeitiger Veränderung der Hydrophobizität von hydrophob zu hydrophil. Dies geschieht durch das räumliche Verschieben der exponierten hydrophoben Aminosäuren (Substratbindestellen) im Inneren. Durch die Verschiebung dieser Bindestellen erfolgt eine Kraftübertragung auf das Substrat ("stretching forces"), so dass eine Entfaltung induziert wird. Auf diese Weise können falsch gefaltete Proteine ihre lokalen Energieminima überwinden und sich in die native Form rückfalten (nach Brehmer 2001, Deuerling und Bukau 2004). Diese Prinzip der „Faltung durch initiale Entfaltung“ wurde auch von Shtilerman *et al.* (1999) und Dougan *et al.* (2002) beschrieben.

Im Gegensatz zu DnaK wird GroEL bei *L. sanfranciscensis* nicht nur unter Hitze-, Salz- und Hochdruckstress induziert, sondern auch bei Kälte- und Hungerstressbedingungen. Eine Induktion unter Säurestress konnte hingegen nicht beobachtet werden. Somit zählt GroEL wie DnaK zu den generellen Stressproteinen und ist ebenfalls in den verschiedensten Organismen zu finden (Hightower 1991, Segal und Ron 1996, Rince *et al.* 2000).

Das GroEL-System wird aber ebenso wie das DnaK-System nicht nur unter verschiedenen Stressbedingungen, die zur Denaturierung von Proteinen führen, vermehrt in der Zelle angesammelt. Genauso wie DnaK besitzt es auch noch weitere wichtige Funktionen bei der *de novo* Synthese von Proteinen, sowie als Teil der Qualitätskontrolle, bei der Sekretion und auch bei der Proteolyse von Proteinen und ist daher auch in ungestressten Zellen immer zu finden (Kandror *et al.* 1994, Rosen *et al.* 2002, Deuerling und Bukau 2004). Versuche mit Deletionsmutanten zeigten, dass GroEL das einzige Chaperon-System darstellt, das für das Wachstum von *E. coli* auch unter optimalen Bedingungen essentiell ist (Fayett *et al.* 1989, Dougan *et al.* 2002). Das DnaK-System hingegen ist nur bei Temperaturen über 37°C und unter 20°C zum Wachstum der Zellen nötig (Bukau und Walker 1989, Dougan *et al.* 2002). Dies zeigt einmal mehr, dass einige der als Stressproteine bezeichneten Chaperone auch bei Nicht-Stress-Bedingungen überlebenswichtige Funktionen in der Zelle ausführen und bestimmte Proteine für die korrekte Faltung nach der *de novo* Synthese auf die Unterstützung solcher Chaperone angewiesen sind (Deuerling und Bukau 2004).

Auch konnte gezeigt werden, dass GroEL mit neu synthetisierten Proteinen ausschließlich nach deren Freisetzung vom Ribosom interagiert. DnaK hingegen bindet darüber hinaus bereits auch an neu entstehende Polypeptidketten und noch nicht vollständig translatierte Proteine, die noch am Ribosom gebunden sind (Deuerling und Bukau 2004). Dies weist darauf hin, dass auch DnaK unter normalen Bedingungen wichtige Aufgaben bei der Proteinfaltung übernimmt. Beide Chaperone, DnaK und GroEL bilden darüber hinaus auch funktionelle Netzwerke, die den Substrat-Transfer von einem Chaperon auf das andere Chaperon über eine lösliche Zwischenstufe ermöglichen (Buchberger *et al.* 1996). Der Transfer ist dabei prinzipiell in beide Richtungen möglich, wobei die Weitergabe von DnaK zu GroEL deutlich überwiegt (Deuerling und Bukau 2004). Die gesteigerte Synthese von GroEL bei *L. sanfranciscensis* unter Hochdruckeinfluss unterstützt somit sehr gut die in Abbildung 4.10 gezeigte These, dass ein Zusammenspiel von ClpL, dem DnaK-System und dem GroEL-System die Renaturierung einzelner Proteine über Zwischenstufen aus komplexen Proteinaggregaten ermöglicht.

4.5.5 ClpX (P6)

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Proteinspot P6 um das einzige Protein, das in Zellen von *L. sanfranciscensis* spezifisch unter Hochdruck induziert wird. Die anderen untersuchten Stressarten bewirken keine erhöhte Synthese dieses Proteins. Nach Inkubation unter Hitze ist die Konzentration dieses Proteins in der Zelle sogar reduziert. Die Analyse der massenspektrometrischen Daten und der Vergleich des Molekulargewichts ergaben, dass es sich bei diesem Protein mit größter Wahrscheinlichkeit um ClpX handelt. Die aus dem Genomprojekt existierende Partiaalsequenz zeigt, dass ClpX aus *L. sanfranciscensis* hohe Homologien von bis zu 85% zu ClpX-ATPasen aus anderen Organismen aufweist (Abbildung 4.14).

```

> ref|NP\_785630.1 |  ATP-dependent protease ATP-binding subunit [Lactobacillus
plantarum
WCFS1]
sp|Q88VE2|CLPX\_LACPL ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX
emb|CAD64480.1 |  ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpX
[Lactobacillus
plantarum WCFS1]
Length=421

Score = 373 bits (958), Expect = 6e-102, Method: Composition-based stats.
Identities = 195/262 (74%), Positives = 224/262 (85%), Gaps = 11/262 (4%)

Query 5 LVVDETNKTVTCSFQKSDQVKKIVAGPGVYICNECIDLCEQIMDEIKSQSADEEID 64
++ + ETN V CSFQKSDQVKKIVAGPGVYICNECIDLC++I+D E + E D
Sbjct 1 MFENTETNGPVNCSFQKSDQVKKIVAGPGVYICNECIDLCKEIIDEEFSSEQTHELTD 60

Query 65 VLPKEIVDRDLQYVIGQTEAKKTLAVAVYNHYMRKELAKRDQEDTEGSDIYKTIESE 124
+ TPKEIVD LDQYVIGQ EAK+TL+VAVYNHY R+K +A D+E +G
Sbjct 61 IPTPKEIVDELDQYVIGQNEAKRTLAVAVYNHYKRVKAMADNDEETEDG----- 109

Query 125 TEIQKSNIAMIGPTGSGKTYIAQTLAKLINVFFAIADATTLTEAGYVGEDVENILLKLLQ 184
E+QKSNI+++GPTGSGKT++AQ+LA+I++VFFAIADATTLTEAGYVGEDVENILLKLLQ
Sbjct 110 PELQKSNIISLVGPTGSGKTFLAQSLARILDVFFAIADATTLTEAGYVGEDVENILLKLLQ 169

Query 185 NADFVERAEHGIIYIDEIDKIAKKNENSVITRDVSGEGVQQLKILEGTIANVPPKGG 244
NAD+DVERAE GLIYIDEIDKIAKK ENVSITRDVSGEGVQQ+LLKILEGTIANVPP+GG
Sbjct 170 NADYDVERAEKGLIYIDEIDKIAKKNENSVITRDVSGEGVQQLKILEGTIANVPPQGG 229

Query 245 RKNPQQEFIKIDTKNILFIVGG 266
RK+PQQEFI+IDT NILFIVGG
Sbjct 230 RKHPQQEFIQIDTTNILFIVGG 251

```

Abbildung 4.14 Blast-Analyse der bekannten Partiaalsequenz des Proteinspots P6. Der Vergleich der vorliegenden Partiaalsequenz des Proteins P6 aus *L. sanfranciscensis* und ClpX aus *Lactobacillus plantarum* zeigt hohe Homologien. Darüber hinaus können einige für ClpX typische Sequenzmotive wie die Nukleotid-Binde-Domäne (136 – 143), der „GYVG-Loop“ (169 – 172) oder der „RKH-Loop“ (239 – 253) identifiziert werden (nähere Erläuterungen siehe Text).

Wie ClpL (Protein P2) zählt auch ClpX zu den typischen Clp-ATPasen bzw. HSP100 Proteinen, die in Kapitel 4.5.2 näher beschrieben sind. Da ClpX im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Clp-ATPasen ClpL, ClpB oder ClpA allerdings nur eine Nukleotid-Binde-Domäne (NBD) aufweist (G-X₄-GKT), welche zur Bindung und Hydrolyse von ATP benötigt wird, zählt dieses Stressprotein zur Klasse II der HSP100 Familie (Schirmer *et al.* 1996, Dougan *et al.* 2002). Neben der konservierten NBD (GPTGSGKT) findet man in ClpX von *L. sanfranciscensis* aber auch noch weitere konservierte und typische Sequenzmotive wieder (Abbildung 4.14). So existiert auch ein „GYVG-Loop“, der zusammen mit anderen Loop-

Motiven bei verschiedenen proteolytischen AAA⁺-ATPasen eine zentrale Pore bildet durch die das ungefaltete Proteinsubstrat passieren muss, bevor es in die durch ClpP gebildete proteolytische Kammer gelangt (Farrell *et al.* 2007). Außerdem konnte in leicht veränderter Form auch ein bereits in *E. coli* charakterisierter und für die Substraterkennung von ClpX essentieller „RKH-Loop“ (VPPQGGRKHPQQEFL) bei ClpX von *L. sanfranciscensis* (VPPKGGRKNPQQEFI) gefunden werden (Abbildung 4.14). ClpX ist eine der am besten untersuchten Clp-Proteasen. Die meisten Untersuchungen zur Funktion von ClpX wurden dazu an *E. coli* durchgeführt und dann an weiteren Mikroorganismen bestätigt (Gottesmann *et al.* 1997 und 1998, Porankiewicz *et al.* 1999, Singh *et al.* 2000, Dougan *et al.* 2002, Chandu und Nandi 2004, Farrell *et al.* 2005 und 2007). Mittlerweile wurde mehrfach bestätigt, dass ClpX zusammen mit ClpP die spezifische Protease ClpXP bildet. Das für Clp-ATPasen, die mit ClpP assoziieren, typische ClpP Bindemotiv (LIVMP)-G-(FL) konnte aufgrund des bisher noch unbekanntes C-Terminus von ClpX bei *L. sanfranciscensis* nicht nachgewiesen werden (Kim *et al.* 2001). ClpXP baut unter ATP Verbrauch hunderte verschiedener intrazellulärer Proteine spezifisch ab. ClpX erkennt dabei hauptsächlich solche Substrate, die durch Bindung spezifischer Peptidtags markiert sind. Diese Tags werden in der Regel am C- oder N-Terminus des abzubauenen Proteins angehängt (Farrell *et al.* 2007). Bisher sind fünf Klassen solcher Tags bekannt (Flynn *et al.* 2003). Hier ist vor allem das *ssrA*-Tag zu erwähnen, welches im Zusammenhang mit der so genannten Trans-Translation steht und in allen Prokaryoten vorkommt (Williams 2002, Whitey und Friedman 2002). Die Markierung von Peptiden mit einem *SsrA*-Tag wird über eine spezielle hochstrukturierte tmRNA (transfer-messenger-RNA, bzw 10Sa RNA) bewerkstelligt und erfolgt sobald die Translation ins Stocken gerät oder zum Stillstand kommt. *SsrA* oder tmRNA ist das Genprodukt von *ssrA* und in der Regel relativ klein (bei *E. coli* insgesamt 350 Nukleotide). Ein Nachweis erhöhter Synthese von *SsrA* war im Rahmen der Proteomanalyse aufgrund der geringen Größe nicht möglich. Die tmRNA ähnelt einer tRNA^{ala}, die Eigenschaften einer tRNA und mRNA kombiniert und so die Translation des entsprechenden Peptid-Tags und Markierung des Proteinsubstrats ermöglicht (Ranquet und Gottesmann 2007). Das Peptid-Tag selbst besteht aus 11 Aminosäuren (Komine *et al.* 1994, Keiler *et al.* 1996, Karzai *et al.* 2000). Bei *E. coli* besteht die Peptid-Sequenz aus „AANDENYALAA“ (Tu *et al.* 1995). Die Trans-Translation ermöglicht der Zelle bei einer Blockade der Proteinbiosynthese aufgrund mangelnder tRNAs, einer fehlerhaften mRNA als Matrix oder ungünstiger thermodynamischer Bedingungen blockierte Ribosomen vom unvollständig translatierten

Peptid zu befreien, diese in die Untereinheiten zu dissoziieren und so für neue Translationsvorgänge wieder verfügbar zu machen (Abbildung 4.15, Dulebohn *et al.* 2007).

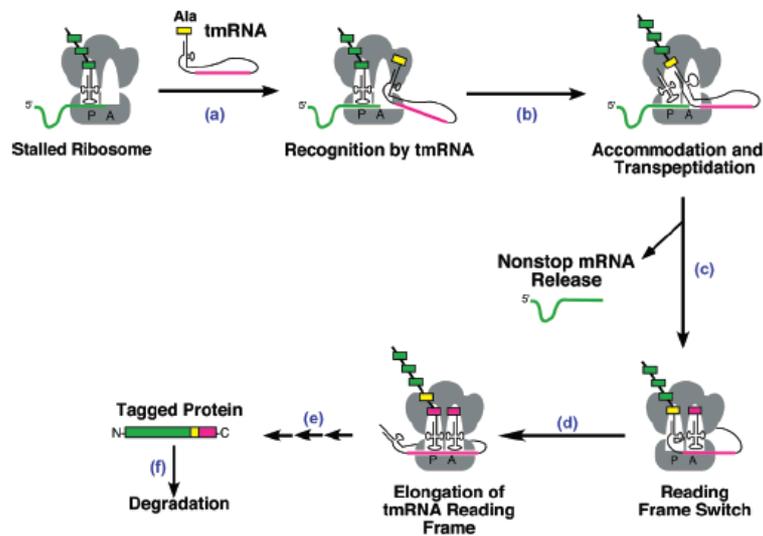


Abbildung 4.15 Schematische Darstellung der Trans-Translation. Die Translation an einem Ribosom kommt zum Stillstand, woraufhin eine aminoacylierte tmRNA an die ribosomale A-site bindet (a). Nach Transpeptidierung (b) der tmRNA erfolgt die Freisetzung der mRNA (c) und ein Wechsel des Leserahmens innerhalb der tmRNA (d). Weitere Elongationsschritte folgen bis zum Erreichen eines Stoppkodons (e). Das mit einem SsrA-Tag markierte Protein wird vom Ribosom freigesetzt und kann durch entsprechende Proteasen (vor allem SspB-ClpXP) abgebaut werden (f). Abbildung aus Dulebohn *et al.* 2007.

Die Trans-Translation bewirkt neben dem Recycling von Ribosomen, dass durch die Markierung der unvollständigen Peptide deren Abbau von spezifischen Proteasen wie ClpXP sichergestellt wird. Im Rahmen dieser Qualitätskontrolle kann eine Akkumulation und eine daraus folgende Aggregation falsch gefalteter Peptide in der Zelle und somit größerer Schaden verhindert werden. Zusätzlich wird durch Proteolyse der fehlerhaften Peptide der Pool an freien Aminosäuren in der Zelle aufgefüllt und zusammen mit dem Recycling blockierter Ribosomen die Effizienz der Proteinbiosynthese beträchtlich gesteigert (Whitney und Friedman 2002). Burton *et al.* (2001) haben gezeigt, dass unvollständig synthetisierte Proteine deutlich schneller von spezifischen Proteasen abgebaut werden, wenn diese durch die tmRNA markiert werden. Neben ClpXP erkennen in *E. coli* mindestens auch noch die Proteasen ClpAP, Tsp und FtsH die mit diesem Tag markierten Proteine (Keiler *et al.* 1996, Gottesman *et al.* 1998, Burton *et al.* 2001, Wiegert und Schumann 2001, Farrell *et al.* 2005). Der Kontakt erfolgt dabei über verschiedene Interaktionsdomänen wie dem „RKH-Loop“ bei ClpX (Hoskins *et al.* 2002, Farrell *et al.* 2007). Die Bindung zwischen markiertem Substrat und Protease kann, muss dabei aber nicht immer direkt stattfinden. Bei den Clp-Proteasen, die

aus der katalytischen Untereinheit ClpP und der jeweiligen Substrat spezifischen Untereinheit (ClpA, ClpX,...) bestehen, spielen so genannte spezifische Adaptor-Proteine oder „targeting factors“ eine wichtige Rolle bei der Feinregulierung des Proteinrecyclings (Dougan *et al.* 2002, Maurizi und Xia 2004, Sharma *et al.* 2005). Diese Adaptor-Proteine können durch Bindung entweder an das Substrat oder an die Protease die Interaktion der beiden Bindungspartner entscheidend beeinflussen und werden dementsprechend unterschieden. Adaptor-Proteine können dabei für eine spezifische Bindung und somit für den proteolytischen Abbau des Substrats absolut essentiell sein. Sie können aber auch lediglich die Kinetik einer proteolytischen Reaktion beeinflussen. So existieren in *E. coli* zum Beispiel die zwei Adaptorproteine ClpS, spezifisch für ClpA und SspB (stringent starvation protein B), spezifisch für ClpX. Während SspB direkt an SsrA markierte Proteine bindet, um so die spezifische Degradation dieser Proteine durch ClpXP zu unterstützen und zu beschleunigen (Thibault *et al.* 2006), interagiert ClpS direkt mit dem N-Terminus von ClpA und inhibiert dadurch sowohl die Bindung mit ClpA, als auch den Abbau von SsrA markierten Proteinen durch ClpAP (vgl. auch Abbildung 4.9, Dougan *et al.* 2002 und 2003, Maurizi und Xia 2004, Hengge und Bukau 2003). Dies führt dazu, dass obwohl ClpAP und ClpXP gleichermaßen in der Lage sind mit SsrA markierte Proteine abzubauen, aufgrund der unterschiedlichen Adaptor-Proteine *in vivo* diese Aufgabe hauptsächlich durch ClpXP bewerkstelligt wird (Hoskins *et al.* 2002, Dougan *et al.* 2002, Dulebohn *et al.* 2007). Eine erhöhte Synthese von ClpX unter Hochdruckeinwirkung könnte also dafür sprechen, dass die Trans-Translation unter diesen Bedingungen verstärkt genutzt wird. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Pavlovic (2006). In der Transkriptionsanalyse wurde gezeigt, dass bei *L. sanfranciscensis* nach einer Hochdruckbehandlung für 30 min bei 50 MPa die Expression des tmRNA kodierenden Gens *ssrA* deutlich induziert ist. Noch deutlich höher ist die Expression von *ssrA* bei einer an HHD adaptierten Mutante von *L. sanfranciscensis*, die von Pavlovic (2006) nach mehreren Wachstumszyklen unter milden Druckbedingungen isoliert werden konnte. Da bei diesen niedrigen Drücken noch keine Denaturierung intakter Proteine zu erwarten ist (Balny *et al.* 1989), die Peptidsyntheserate pro Ribosom durch eine inhibierte Bindung von aa-tRNAs an das Ribosom (Albright 1969, Schwarz und Landau 1972a) aber sinkt und somit negativ beeinflusst wird, erscheint eine gesteigerte Trans-Translation und somit die Induktion von SsrA sowie ClpX plausibel. Eine Induktion der Trans-Translation wird bei diesem Stamm unter Druckbedingungen dann nicht mehr oder zumindest weniger benötigt. Diese These wurde durch die gesteigerte Resistenz der piezotoleranten Mutante von *L. sanfranciscensis* gegenüber einer Reihe von Antibiotika gestützt, die mit Veränderungen in der ribosomalen

Funktion zu erklären sind (Pavlovic 2006). So konnte z. B. gezeigt werden, dass eine Deletion von *ssrA* in *Synechocystis* sp. zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Aminoglycosiden führt (de la Cruz und Vioque 2001). Eine Induktion von *ssrA* könnte dagegen die Resistenz gegenüber solchen Antibiotika erhöhen. Die gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante unter atmosphärischem Druck weist auch auf eine optimierte Translationselongation im Vergleich zum Wildtyp hin (Maaloe 1979, Neidhardt *et al.* 1990). Ein weiteres für ClpXP spezifisches Adaptor-Protein ist RssB. Dieser Zwei-Komponenten Response-Regulator bindet spezifisch an den Sigma Faktor σ^s und sorgt nach entsprechender Phosphorylierung für dessen Proteolyse durch ClpXP (Dougan *et al.* 2002 und 2003, Hengge und Bukau 2003).

Dies zeigt, dass Adaptor-Proteine zusammen mit den jeweiligen Proteasen nicht nur im Rahmen der Qualitätskontrolle von Proteinen eine entscheidende Rolle spielen, sondern auch übergeordnete regulatorische Funktionen bei der Translation und Replikation besitzen (Dougan *et al.* 2002). Während der bereits erwähnte Transkriptionsregulator RpoS (σ^s) durch RssB markiert wird, werden der Transkriptions-Repressor HrcA in *B. subtilis* (Wiegert und Schumann 2001) sowie der LacI-Repressor (Abo *et al.* 2000) oder λ cI Repressor (Roche und Sauer 2001) in *E. coli* durch Anfügen eines SsrA-Tags zur Proteolyse durch ClpXP markiert. Dies wiederum hat weitreichende Auswirkungen auf die Regulation komplexer Netzwerke und Stressantworten (Withey und Friedmann 2002, Hengge und Bukau 2003). Auch besitzt ClpX eine wichtige Rolle in der globalen Regulation der Virulenzgene bei *S. aureus* (Frees *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang sei nur kurz erwähnt, dass bei *E. coli* auch die Regulation der Ribokinase (RbsK), bzw. des entsprechenden Gens *rbsK* teilweise über Trans-Translation reguliert wird (Roche und Sauer 2001, Hayes *et al.* 2001, Collier *et al.* 2002, Hengge und Bukau 2003). Ein Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit charakterisierten Protein P1 (RbsK/Rpi) und der Trans-Translation konnte aber bisher nicht festgestellt werden. Wie gezeigt nimmt ClpX die verschiedensten Aufgabe in der Zelle wahr. Neben der spezifischen Protease-Aktivität zusammen mit ClpP besitzt ClpX auch die Funktion als Chaperon (Singh *et al.* 2000). Bei den meisten Bakterien wird ClpX unter Hitzestress vermehrt synthetisiert und ist unter diesen Stressbedingungen für ein Überleben der Zellen auch essentiell (Dougan *et al.* 2002). Bei *S. pneumoniae* wird ClpX nicht durch Hitzestress induziert, sondern besitzt bereits bei optimalen Wachstumsbedingungen eine essentielle Funktion unabhängig von ClpP (Robertson *et al.* 2003). Auch bei *L. sanfranciscensis* war eine Induktion von ClpX durch Hitzestress oder andere Stressarten nicht zu beobachten. Die einzige Ausnahme bildete Hochdruckstress. Passend dazu war auch die Beobachtung von Pavlovic (2006) an der bereits beschriebenen piezophilen Hochdruckmutante von

L. sanfranciscensis. Das Wachstum der Mutante war im Vergleich zum Wildtyp unter Hochdruck signifikant erhöht. Hitzestress hingegen inhibierte das Wachstum dieses Stammes drastisch. Passend dazu konnte beim *L. sanfranciscensis* Wildtypstamm unter Hochdruck eine Überexpression von ClpX und bei Hitzestress eine Reduktion der ClpX Konzentration in den Zellen gemessen werden. Dies zeigt, dass die Regulation von ClpX trotz starker Konservierung und wahrscheinlich ähnlicher Funktionen bei verschiedenen Bakterien komplett unterschiedlich verläuft. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass bei *B. subtilis* eine erhöhte Konzentration an ClpX und tmRNA in den Zellen das Wachstum bei Hitzestress signifikant fördert (Muto *et al.* 2000). Hier wird die unterschiedliche Regulation von ClpX besonders deutlich. ClpX scheint in *L. sanfranciscensis* prinzipiell zwar ähnlich komplexe Funktionen wie in anderen Mikroorganismen zu besitzen, unter Umständen wird das Protein bei *L. sanfranciscensis* aber noch spezifischer nur bei ganz bestimmten Stressarten benötigt.

4.5.6 Thioredoxin Reduktase (P4)

Der Proteinspot P4 wurde ebenfalls schon in der Publikation von Drews *et al.* (2002) als ein durch Hochdruck induziertes Protein identifiziert. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine Aussagen über die mögliche Funktion getroffen. In der vorliegenden Arbeit konnte das Protein aufgrund der deutlichen Homologien der Peptidsequenz und des Molekulargewichts mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Thioredoxin Reduktase B (TrxB) zugeordnet werden. Dieses für zahlreiche Lebewesen essentielle Enzym konnte bisher aus den verschiedensten Organismen isoliert werden (Williams 2000). Im Lauf der Evolution haben sich zwei verschiedene Typen entwickelt. Mit ca. 35 kDa pro Untereinheit ist die Thioredoxin Reduktase von Prokaryoten, Archaea und den niederen Eukaryoten kleiner als die der höheren Eukaryoten mit 55 kDa pro Untereinheit (Luthman und Holmgren 1982, Williams *et al.* 2000). Neben der Größe unterscheiden sich die Enzyme aber auch im Mechanismus der Katalyse und ihrer physiologischen Rolle in den jeweiligen Organismen (Williams *et al.* 2000, Arner und Holmgren 2000). Moore *et al.* (1964) konnten zeigen, dass es sich bei der Thioredoxin Reduktase von *E. coli* um ein als Dimer aufgebautes Flavoenzym handelt, das pro Untereinheit ein Redox aktives Disulfid und ein Molekül FAD aufweist. Somit zählen Thioredoxin Reduktasen zu den Flavoproteinen und sind essentieller Bestandteil des Thioredoxin-Systems. Zusammen mit NADPH sorgen sie für die ständige Reduktion des namensgebenden Thioredoxins. Bei Thioredoxin selbst handelt es sich um kleine, hitzestabile und in allen Zellen vorkommende Proteine, die als H⁺-Donatoren für zahlreiche essentielle Enzymreaktionen wie z. B. die Reduktion von Nukleotiden zu Deoxy-Nukleotiden dienen (Williams *et al.* 2000). Bei *B. subtilis* wird die Synthese von Thioredoxin durch

verschiedenste Stressbedingungen wie Hitze-, Salz-, Ethanol- oder oxidativen Stress induziert, so dass dieses Enzym ebenfalls zu den allgemeinen Stressproteinen gezählt werden kann (Scharf *et al.* 1998). Auch bei *E. coli*, *S. aureus* und *O. oeni* existieren Untersuchungen zur Regulation der beiden Gene unter verschiedenen Stressbedingungen (Prieto-Alamo *et al.* 2000, Uziel *et al.* 2004, Jobin *et al.* 1999, Guzzo *et al.* 2000). Ob bei *L. sanfranciscensis* neben der Thioredoxin-Reduktase auch Thioredoxin selbst durch Hochdruckstress induziert wird, konnte aufgrund des geringen Molekulargewichts von nur 12 kDa im Rahmen der durchgeführten Proteomanalyse nicht festgestellt werden (Williams *et al.* 2000). Interessant ist, dass bei *L. monocytogenes* durch einen Kälteschock neben dem Gen für die Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) unter anderem auch die Gene für *groEL* und *clpB* induziert werden (Liu *et al.* 2002). Bei *L. sanfranciscensis* ist die Synthese von TrxB, GroEL und ClpL ebenfalls bei Kälte, aber auch bei Hunger- und Hochdruckstress erhöht. Die gemeinsame Induktion von *trxB* und *clpB* bei *L. monocytogenes* auf der einen Seite und *trxB* und *clpL* bei *L. sanfranciscensis* auf der anderen Seite bekräftigt die These, dass ClpL und ClpB ähnliche oder identische Aufgaben besitzen. TrxB wurde bei *L. sanfranciscensis* darüber hinaus auch nach Hitze- und Säurestress vermehrt gefunden, was die Funktion als generelles Stressprotein unterstreicht. Eine wichtige Entdeckung gelang Kern *et al.* (2003), indem sie für Thioredoxin und die Thioredoxin-Reduktase von *E. coli* über die bereits bekannte Funktion hinaus zusätzlich noch eine DnaK ähnliche Funktion als Chaperon nachgewiesen haben. So ist eventuell also auch ein Zusammenspiel von TrxB, GroEL und ClpL im Rahmen eines komplexen Chaperon Netzwerkes denkbar.

Schließlich stellten Malone *et al.* (2006) erst kürzlich fest, dass zur Ausbildung einer Hochdrucktoleranz bei *E. coli* die Regulation mehrerer Gene des Thioredoxin Systems, darunter auch *trxB* verändert ist. Auch beobachteten sie, dass eine *trxB* Mutante signifikant sensitiver gegenüber subletalem Hochdruck ist als der entsprechende Wildtyp-Stamm.

4.5.7 Trehalose/Maltose Hydrolase (P5)

Die Analyse des Proteins P5 zeigte, dass Ähnlichkeiten zu Trehalose/Maltose Hydrolasen aus anderen Laktobazillen bestehen. Die Synthese dieses Enzyms wird bei *L. sanfranciscensis* nicht nur unter Hochdruckstress, sondern auch in der stationären Phase und unter Hitze- und Salzstress induziert. Die Aufgabe im Rahmen einer Stressantwort könnte bei diesem Enzym darin liegen, dass nach Hydrolyse der beiden Zucker Trehalose und Maltose die resultierenden Zucker der Zelle entweder zur Energiegewinnung oder als Grundbausteine für neue Verbindungen zur Verfügung stehen könnten. Eine genaue Aussage über die Funktion des Enzyms in Bezug auf eine durch Hochdruck induzierte Stressantwort war aber nicht

möglich. Die Hydrolase wurde nach dem heutigen Kenntnisstand bisher auch noch für keinen anderen Mikroorganismus bei einer Stressantwort beschrieben.

4.5.8 Unbekannte Funktion (P3)

Die Konzentration des Proteins P3 war nicht nur nach einer Behandlung mit subletalem Hochdruck, sondern auch nach Inkubation unter Salz- und Säurestress in *L. sanfranciscensis* signifikant erhöht. Während der stationären Phase oder einer Inkubation bei Kälte (12,5°C) konnte kein Einfluss auf die Konzentration dieses Proteins in den Zellen festgestellt werden. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen nahm die Proteinmenge nach einer Hitzebehandlung sogar noch deutlich ab. Untersuchungen zur Homologie interner Peptidsequenzen und ein Vergleich von Masse und isoelektrischem Punkt zeigten Ähnlichkeiten zu einem Protein aus *L. lactis* mit noch unbekannter Funktion. Auch wenn es sich um ein unter HHD relativ stark induziertes Protein handelt, ist im Rahmen dieser Arbeit eine genauere Aussage über die Funktion des Proteins in der Zelle nicht möglich.

4.5.9 hypothetisches Protein (P7)

Das identifizierte interne Peptid des Proteins P7 besitzt Homologie zu einem hypothetischen Protein aus *L. lactis*. Auch das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt stimmen mit den Angaben zu dem hypothetischen Protein gut überein. Eine Charakterisierung war bisher nicht möglich, so dass die Funktion eines Stressproteins nur vermutet werden kann. Auffallend ist die Ähnlichkeit der Regulation während der untersuchten Stressbedingungen mit der Regulation des Proteins P2 (ClpL-Protease). Neben subletalem Hochdruckstress bewirkt auch eine erhöhte Konzentration an NaCl, Kälte oder Hungerstress eine gesteigerte Synthese dieser beiden Proteine. Bei Hitze- und Säurestress hingegen konnte weder bei P7 noch bei P2 eine Änderung festgestellt werden. Eine gemeinsame Regulation ist daher denkbar. Unter Umständen handelt es sich bei P7 um ein bisher nicht bekanntes, ebenfalls durch CtsR reguliertes Stressprotein der Klasse III.

4.5.10 CtsR und ClpC

Wie bereits erwähnt, sollte das *ctsR* Gen deswegen sequenziert werden, um den für Gram positive Bakterien typischen CtsR-Transkriptionsrepressor für Stressproteine der Klasse III (class three stress gene repressor) zu der die Clp-ATPasen gehören, charakterisieren und schließlich für weitere Versuche heterolog exprimieren zu können. Bei der Sequenzierung stellte sich heraus, dass *ctsR* zusammen mit *clpC* ein Operon bildet. Zwischen den beiden Genen befinden sich 18 Basenpaare, die zwar eine Ribosomenbindestelle, aber keine

vollständige Promotorsequenz darstellen. Die Anordnung von *ctsR* und *clpC* in einem gemeinsamen Operon ist bei den meisten Mikroorganismen, die *ctsR* im Genom aufweisen, wie beispielsweise *B. subtilis*, *O. oeni*, *L. monocytogenes* oder *L. lactis*, typisch (Krüger und Hecker 1998, Grandvalet *et al.* 2005, Nair *et al.* 2000, Varmanen *et al.* 2000). Während bei *S. aureus* und verschiedenen Gram positiven Stäbchen (Bacillen, Clostridien und Listerien) im ClpC-Operon neben *clpC* und *ctsR* noch zwei weitere Gene (*mcsA* und *mcsB*) zu finden sind (Rouquette *et al.* 1996, Krüger *et al.* 1997 und 2001, Chastanet *et al.* 2003), besteht das Operon bei *L. lactis* aus insgesamt drei Genen (*ctsR-clpC-orf55*) (Varmanen *et al.* 2000). Nur bei Streptokokken und einigen Laktobazillen besteht das Operon ausschließlich aus den Genen für *ctsR* und *clpC* (Grandvalet *et al.* 2005).

Der aus 156 Aminosäuren bestehende CtsR-Repressor weist Homologien von bis zu 74% mit analogen Proteinen aus anderen Bakterien auf (Abbildung 4.16). CtsR besitzt verschiedene funktionelle Domänen und bindet an für Stressgene der Klasse III typische CtsR-Bindestellen mit der DNA-Erkennungssequenz „A/GGTCAAA-NAN-A/GGTCAAA“. Die Bindung erfolgt dabei immer als Dimer (Derre *et al.* 2000). Eine besonders ausgeprägte und wichtige Struktur stellt ein „Gly-Gly-Gly-Gly“ Repeat (65-68) dar (Abbildung 4.16). Derre *et al.* (2000) vermuteten hier unter anderem eine Art Thermo-sensing als Funktion für dieses Motiv. Darüber hinaus sind auch eine Helix-Turn-Helix DNA-binde Domäne am N-Terminus von CtsR und eine Dimerisierungsdomäne im Mittelteil relativ stark konserviert (siehe Abbildung 4.16).

```

> ref|YP\_804907.1  Transcriptional repressor of class III stress genes
[Pediococcus
pentosaceus ATCC 25745]
gb|ABJ68465.1  Transcriptional repressor of class III stress genes
[Pediococcus
pentosaceus ATCC 25745]
Length=154

Score = 151 bits (381), Expect = 1e-35, Method: Composition-based stats.
Identities = 83/155 (53%), Positives = 115/155 (74%), Gaps = 1/155 (0%)

Query 1  MASHMSDTIGEYLKLLAERDEEVEIRRSDIAEHFDVVPSQINYVIKTRFTIQDGFVVQ 60
M ++SD I YLK++LA EE+EIRRS+IA+ FDVVPSQINYVIKTRFTIQ+G+VV+
Sbjct 1  MQGQNISDIIERYLKEILAN-SEEIEIRRSEIADQFDVVPSQINYVIKTRFTIQNGYVVE 59

Query 61  SKRGGGGYIRIEKINLMEDSNVPDRLIDSIGDMISQKDEEDILKTLNGLLNKREVHMV 120
SKRGGGGYIRIEK+ L++D +V D LI IGD + ++D IL +L + +L+KRE ++
Sbjct 60  SKRGGGGYIRIEKVKLLDDIDVLDLSLIRVIGDSLDERDAISILGSLYEDSVLSKREASLL 119

Query 121 ASILTHDAINVSNYETEEKVRANVLSALLCRLKYE 155
AS L+ +N+ + EE+RA V+ +L L+YE
Sbjct 120 ASTLSKSTLNI GDRNLEE QIRAKVMIGILNHLRYE 154

```

Abbildung 4.16 Blastp-Analyse der CtsR Aminosäuresequenz. Der Vergleich der vorliegenden Aminosäuresequenz von CtsR aus *L. sanfranciscensis* weist Homologien von bis zu 74% zu CtsR-Proteinen aus anderen Bakterien auf. Besonders stark konserviert sind bestimmte, für CtsR charakteristische Domänen (Detail siehe Text).

Karatzas und Bennik (2002) konnten eine gegenüber Hochdruck tolerante Mutante von *L. monocytogenes* isolieren, die gleichzeitig auch erhöhte Resistenz gegen Hitze-, Säure- und H₂O₂-Stress besitzt. Wie sich herausstellte, war die Mutation im Verlust eines Glycins begründet, so dass anstelle von vier nur noch drei aufeinanderfolgende Glycine in der oben beschriebenen Domäne vorhanden sind (Karatzas *et al.* 2003). Gleichzeitig besitzt die Mutante erhöhte Konzentrationen an verschiedenen Clp-ATPasen und an CtsR selbst, was auf die gestörte Transkriptionsrepression dieser Gene durch das mutierte CtsR zurückzuführen ist. Die ungewöhnlich hohe Konzentration an Clp-ATPasen, die normalerweise durch CtsR reguliert werden, führte in diesem Fall also zu einer Resistenz gegenüber Hochdruckstress und anderen Stressarten (Karatzas *et al.* 2003).

CtsR stellt somit einen der wichtigsten Regulatoren für die Stressantwort bei Gram positiven Bakterien dar. Dabei greift CtsR bei vielen Arten wie *S. aureus*, *S. epidermidis* oder *S. pneumoniae* nicht nur in die Regulation der Klasse III Stressgene ein, sondern ist zusätzlich auch an der Regulation von DnaK und GroEL beteiligt, die als Stressproteine der Klasse I typischerweise über den HrcA-Repressor reguliert werden (Chastanet *et al.* 2003). Bei *O. oeni* werden DnaK und GroEL sogar ausschließlich über CtsR und nicht über HrcA reguliert. CtsR stellt in diesem Organismus somit eine Art „Master Regulator“ für die Stressantwort dar (Grandvalet *et al.* 2005).

Die Konzentration an CtsR in der Zelle spielt in allen Fällen eine wichtige Rolle und wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert und reguliert. Auf Transkriptionsebene findet gewöhnlich eine Autoregulation von *ctsR* durch CtsR selbst statt (Krüger *et al.* 2001). Darüber hinaus wird die Stabilität von CtsR von weiteren Proteinen moduliert. Während McsA (modulator of CtsR repression) in nicht-gestressten Zellen von *B. subtilis* die Konformation von CtsR als Dimer stabilisiert, moduliert die Tyrosin Kinase McsB den Repressor in gestressten Zellen derart, dass eine Bindung an die CtsR-Bindestelle und somit eine Repression nicht mehr möglich ist. Somit können die entsprechenden Stressgene, aber auch *ctsR* selbst vermehrt transkribiert werden (Abbildung 4.17, Krüger *et al.* 2001). Die Bindung von McsB an CtsR (tagging) führt gleichzeitig auch dazu, dass CtsR verstärkt durch ClpCP degradiert wird (Kirstein *et al.* 2007). Durch den Abbau von CtsR steigt wiederum die Expression von Stressgenen und *ctsR*, so dass nach einer gewissen Zeit (15 bis 30 min) nach einer bestimmten Stresssituation wieder das ursprüngliche Gleichgewicht an CtsR und allen dadurch regulierten Stressproteinen hergestellt wird (Krüger *et al.* 2001). Neben dem spezifischen Abbau des CtsR Repressors durch ClpCP und ClpXP unter Stressbedingungen, sind auch ein geregelter Übergang zwischen inaktivem Monomer und aktivem Dimer oder eine anderweitige

Konformationsänderung zwischen aktiver und inaktiver Form als weitere Möglichkeiten der Regulation denkbar (Derre *et al.* 2000).

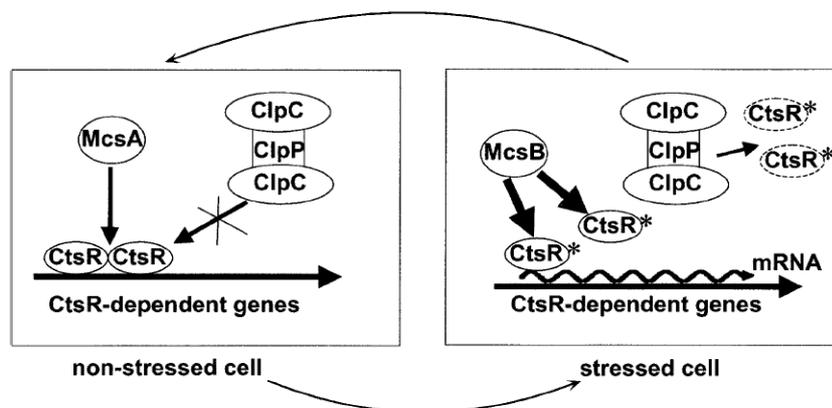


Abbildung 4.17 Schema zur Regulation des Transkriptionsrepressors CtsR durch McsA und McsB in gestressten und nicht gestressten Zellen. In nicht gestressten Zellen stabilisiert McsA den Transkriptionsrepressor CtsR. Dieser bindet als Dimer an typische Erkennungssequenzen von Promotoren für Stressgene der Klasse III. Bei Stress beeinflusst McsB die Konformation von CtsR derart, dass der Repressor keine Dimere bilden kann und die Bindestelle verlässt. Darüber hinaus werden die CtsR-Moleküle durch McsB markiert (*), so dass sie von Proteasen wie ClpCP degradiert werden. Dies führt bei Stress zu einer gesteigerten Transkription von Stressgenen der Klasse III. Auf diese Weise werden bei Stress nicht nur sämtliche Clp-ATPasen, sondern auch CtsR, McsA, McsB und auch ClpC vermehrt gebildet. Auf diese Weise regulieren diese Proteine unter anderem auch ihre eigene Synthese, so dass sich immer wieder ein Gleichgewicht an Stressproteinen in den Zellen einstellen kann (Abbildung aus Krüger *et al.* 2001).

Somit regulieren sich CtsR und die entsprechenden Clp-ATPasen zum Teil gegenseitig und bewerkstelligen somit ein Feintuning bei spezifischen Stressantworten (Gerth *et al.* 2004). Darüber hinaus spielen die genannten Proteine aber auch bei der Virulenz pathogener Arten eine wichtige Rolle (Karatzas *et al.* 2003).

Um die Antwort von *L. sanfranciscensis* auf Hochdruckstress verstehen zu können, ist es unerlässlich auch die Wirkungsweise und Regulationsfunktionen von CtsR in diesem Organismus zu kennen. Die nähere Charakterisierung von CtsR erschien daher sinnvoll und sollte im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden, auch wenn in der Proteomanalyse das kleine Repressorprotein CtsR nicht als Hochdruck sensitiv identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde CtsR aus *L. sanfranciscensis* heterolog in *E. coli* exprimiert. Trotz erfolgreicher Überexpression war eine Aufreinigung über ein 6xHis-tag nicht möglich. Unter Umständen ist aufgrund der ausgeprägten Struktur und Dimerisierung von CtsR das His-tag im Molekülinneren verborgen, so dass eine Bindung an die Ni-Säule nicht möglich ist und andere Verfahren getestet werden müssen. Dies war in der vorliegenden Arbeit allerdings

nicht durchführbar, so dass die nähere Charakterisierung von CtsR auf nachfolgende Arbeiten verschoben werden muss.

Wie erwähnt bildet *ctsR* zusammen mit dem Gen *clpC* ein für Gram positive Bakterien typisches *ctsR-clpC*-Operon (Krüger und Hecker 1998, Charpentier *et al.* 2000). ClpC zählt ebenfalls zu den Clp-ATPasen. Die insgesamt 819 Aminosäuren weisen eine hohe Übereinstimmung von bis zu 81% mit ClpC-ATPasen aus verschiedenen Milchsäurebakterien auf (Abbildung 4.18).

```

> ref|NP\_784715.1 | G ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpC
[Lactobacillus plantarum WCFS1]
emb|CAD63562.1 | G ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpC
[Lactobacillus plantarum WCFS1]
Length=837

Score = 1003 bits (2593), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 542/822 (65%), Positives = 666/822 (81%), Gaps = 7/822 (0%)

Query 1 MEDSLTPSAKKTLMIAQEQARGFQHQVSGTEHLLALSIEKSGIAYQTLNQLSVTEQDVK 60
M++ TPSAK L++AQEQA+ F+HQ+VGTEHLLAL+IEK+GIA + L Q +V+E D++
Sbjct 1 MDNLFTPSAKSVLVLAQEQAKYFKHQAVGTEHLLALAIEKNGIANKVLQYAVSEDDIR 60

Query 61 EEIEQIAGYGNLQNDGT-TYLPYSPKMRDILNLAGQIAKQYGSKRVTGTEHLLALTSENE 119
EEIE+ GYG L N G TYLPYSPK ++IL++AG AK+ G+ ++GTEHLLA+ S+
Sbjct 61 EEIERFTGYGTLSNVGKDTYLPYSPKAKEILSVAGDEAKRLGANKIGTEHLLAMLSDS 120

Query 120 IVSSRILNLGLISPEDVRKITIRKMGVDP-----QGIPTESKNDKKEKTPLDSPAKDLT 174
I+SSRIL +L + RK+ +RK+GV D +G E TPTLDS A+DLT
Sbjct 121 ILSRILMNLNLDLGGQTRKVVLRKLGVS DAMSKRKGNAANRGKKTEGTPLDLARDLT 180

Query 175 KAARDGQLDPIIGRDQEVRRAIQILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIAEGLAQKIVEKKVP 234
+ A + ++DP++GR +EV+R IQILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIAEGLAQKIV VP
Sbjct 181 QLASEQEMDPVVGSRKEVKRVIQILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIAEGLAQKIVAGDVP 240

Query 235 QDMTNKRVMLDMGSLVAGTKYRGEFENRLKKIINEIKSNHGVILFVDELHTLIGAGGAE 294
DM +KR+M LDMGSLVAGTKYRGEF+RLKK+I+EI ++GHVILF+DELHTLIGAGGAE
Sbjct 241 TDMADKRLMLDMGSLVAGTKYRGEFEDRLKVKVIDEINYDGHVILFIDELHTLIGAGGAE 300

Query 295 GAIDASNILKPTLARGEIQMIGATTLNEYQKHIEADAALERRFATVQIEEPRVDEAKKIL 354
GAIDASNILKP LARGE+Q IGATTLNEYQK+IE+DAALERRFATV + EP DEA +IL
Sbjct 301 GAIDASNILKPALARGELQTI GATTLNEYQKYIESDAALERRFATVMVNEPTEDEAVEIL 360

Query 355 AGLRPKYEEYHHVKITDDAINAAVDLSSRYISGRFLPKAIDLMDAAAAKVRIDAMGDST 414
GLRP+YEE+H V ITD+A++ AV LSSRYIS RFLPKAIDLMDAAAAKVRID M T
Sbjct 361 DGLRPRYEEHHRVITDEAVDQAVKLSRYISDRFLPKAIDLMDAAAAKVRIDQMDQPT 420

Query 415 ELVKQRELDDEARSNKDRAIEEQRFDDAVTFRSQEQLEKSVAALMEKDKKREHENKQH 474
+L K Q +L + R +K+ AIE Q F+ A R QE QL++ + + E D+ E
Sbjct 421 KLSKNQDKLAQLREDKETAIEAQDFEQAADIRKQEMQLKQRLDRI -EADQDAEVTEGATP 479

Query 475 NYLKLKENSEVAQIVAETWGIPTVHLKKTADRLVNLLENLHKKRVIGQDEAVTAVAKAVR 534
+Y L+ E +AQ+VAEWG+P+T L+K++++RLVNLE +LH+RV+GQ EAV+AVA+A+R
Sbjct 480 HYDLQVTGEDIAQVVAEWGTVPLTQLQKSESERLVNLEKILHERVVGQPEAVSARAIR 539

Query 535 RARSGLKDPNRPISGFIFLPGPTGVGKTELAKDLAEEMFGSEDDVIRVDMSEYMEKYSTSR 594
RARSGLKDP+RPIGSF+FLGPTGVGKTELAK LA MFGSED++IR+DMSEYME+YSTSR
Sbjct 540 RARSGLKDPNRPISGFIFLPGPTGVGKTELAKALAAAMFGSEDMNIRIDMSEYMERYSTSR 599

Query 595 LVGSAPGVYGYEGGQLTEKVRKHPYSVLLDEVEKAHPDVFNLLQLVDDGFLTDSKGR 654
L+GSAPGVYGY+EGGQLTEKVR+ PYSVLL DEVEKAHPDVFN+LLQLVDDG+LTDKSKGR
Sbjct 600 LVGSAPGVYGYDEGGQLTEKVRQKPYVSVLFDVEVEKAHPDVFNLLQLVDDGYLTDKSKGR 659

Query 655 KVDFKNTIIIMTSNLGATALREQKTVPFDANRSENNDAEVKKRVIQEKMKQFFRPEFLNRV 714
KVDF+NTI+IMTSNLGAT LR++K+VGF A N+ V I+ +KQ FRPEFLNR+
Sbjct 660 KVDFRNTIILIMTSNLGATTLRDEKSVGFGATDKANDYNAVAATIRATLKQTFRPEFLNRI 719

Query 715 DETVIFHSLTESELHRIVKLMTKRLVDRVEKQGYILKITPAAIDAVAKKGYNPEYGARPL 774
DET++FHS L + ELH IVKLM++ +VDRV +QG +KITPAAID VAK G++PEYGARP+
Sbjct 720 DETIVFHSLNKELHEIVKLMSEIIVDRVGGQGIKIKITPAAIDVVAKAGFDEPYGARPI 779

```

Abbildung 4.18 Blastp-Analyse der ClpC Aminosäuresequenz. Der Vergleich der vorliegenden Aminosäuresequenz von ClpC aus *L. sanfranciscensis* zeigt die hohe Übereinstimmung von bis zu 81% zu ClpC-ATPasen aus Gram positiven Bakterien. Einige für ClpC besonders charakteristische Sequenzmotive sind im Text beschrieben.

Mit zwei Nukleotid-Binde-Domänen (311 – 318 und 555 – 562) zählt ClpC zur Klasse I der Clp-ATPasen (Schirmer *et al.* 1996). Ein „VGF“-Motiv (680 – 682) zeigt, dass ClpC auch bei *L. sanfranciscensis* zusammen mit ClpP eine spezifische ClpCP-Protease bilden kann und somit neben der Funktion als Chaperon noch die Aufgabe als spezifische ClpCP-Protease besitzt (Charpentier *et al.* 2000, Kim *et al.* 2001, Turgay *et al.* 2001). Dafür spricht auch der eine zentrale Pore bildende und bereits für ClpX beschriebene „GYVG“-Loop (601 – 604). Eine Überexpression von *clpC*, bzw. ClpC unter subletalem Hochdruck konnte bei *L. sanfranciscensis* bisher weder auf Gen-, noch auf Proteom-Ebene nachgewiesen werden. Die meist an *B. subtilis* durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass ClpC nicht nur an der Qualitätskontrolle bei neu synthetisierten Proteinen beteiligt ist (Krüger *et al.* 2000, Schlothauer *et al.* 2003), sondern darüber hinaus auch zahlreiche andere Schlüsselfunktionen in der Zelle besitzt (Kirstein *et al.* 2006). Neben der Stressantwort bei Hitze-, Ethanol- und Salzstress (Krüger *et al.* 1994 und 2001, Kirstein *et al.* 2005) ist ClpC auch an der Sporulation (Pan *et al.* 2001, Pan und Losick 2003), sowie an der Ausbildung der genetischen Kompetenz zur Aufnahme von extrazellulärer DNA (Turgay *et al.* 1998) beteiligt. Letzteres geschieht durch den regulierten Abbau des Transkriptionsfaktors ComK (Turgay *et al.* 1998). Und schließlich ist ClpC über die Degradation von CtsR wie bereits erwähnt maßgebend an der Transkriptionsregulation von *ctsR*, seines eigenen Gens *clpC*, sowie aller weiteren durch CtsR regulierten Gene beteiligt (Siehe Abbildung 4.17).

Im Gegensatz zu anderen AAA⁺-Proteinen benötigt ClpC für alle beschriebenen Funktionen ein Adaptorprotein. Während bekannte Adaptorproteine wie ClpS oder SspB nur Modulatoren darstellen, die einen Prozess beschleunigen, für die grundlegende Funktionen aber nicht essentiell sind, ist funktionelles ClpC zumindest bei *B. subtilis* auf entsprechende Adaptorproteine angewiesen (Kirstein *et al.* 2006). Neben McsB (Markierung von CtsR) spielt hier vor allem das für ClpC spezifische Adaptorprotein MecA eine zentrale Rolle sowohl für das ClpC-Chaperon, als für die spezifische ClpCP-Protease. Besonders ausführlich ist der Abbau von ComK durch ClpCP nach Markierung des Transkriptionsfaktors durch MecA beschrieben (Turgay *et al.* 1998 und 2001). Kirstein *et al.* (2006) zeigten alle bisher bekannten essentiellen Funktionen von MecA auf, die für die Aktivitäten von ClpC notwendig sind. Darüber hinaus konnten Pan und Losick (2003) ein für ClpCP typisches „LCN“-Degradationssignal identifizieren, welches zum Abbau von an der Sporulation beteiligten Proteinen benötigt wird.

4.6 Analyse von Promotoraktivitäten unter Hochdruckstress

Lengeler *et al.* (1999b) geben eine ausführliche Übersicht über die Möglichkeiten wie Prokaryoten durch Modifikationen des Proteoms zum Beispiel auf Umweltveränderungen mit einer Stressantwort reagieren können. Neben posttranslationalen Möglichkeiten wie Proteolyse und Proteinmodifikation spielt bei Bakterien vor allem die Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Hier unterscheidet man die Ebene der Transkription, der RNA Stabilität und der Translation. Der Wirkmechanismus vieler Antibiotika beruht auf einer Inhibierung der Transkription und Translation. Die Zelle selbst nutzt eine gezielte Regulation der Translation hauptsächlich für eine Feintuning der Proteinmengen. Vor allem durch Antisense RNA oder spezifische ribosomale Proteine kann die Translation gezielt reguliert werden. Auch das so genannte „codon usage“ besitzt Auswirkungen auf die Translation und somit regulatorische Eigenschaften eines Gens. Darüber hinaus spielen die Stabilitäten vor allem der mRNAs, aber auch der tRNAs und der rRNAs eine entscheidende Rolle für die Effektivität der Translation und somit für die letztendlich gebildete Menge an Protein. Den wohl weitaus größten und wichtigsten Einfluss besitzt aber die Regulation auf Ebene der Transkription. Neben der Initiation kann auch die Elongation und die Termination der Transkription reguliert werden. Ein essentieller Schlüsselprozess vor der Synthese der mRNA ist in jedem Fall die Bindung der RNA Polymerase an den so genannten Promotor (Initiation). Promotoren setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen und können mehrere Elemente einer positiven und negativen Transkriptionskontrolle beinhalten, die für eine steuerbare Regulation der Genexpression notwendig sind.

Die Art der jeweiligen Promotor-Sequenz bildet somit den wohl grundlegendsten Baustein für die Regulation der Genexpression bei Bakterien. Ein wichtiger Teil dieser Arbeit bestand daher in der Charakterisierung ausgewählter Promotoren von Genen und Operons, bei denen unter subletalem Hochdruck die Menge der entsprechenden Proteine signifikant beeinflusst wird. Dabei sollte untersucht werden, ob spezielle Sequenzabschnitte in Promotoren vorhanden sind, die eine hochdrucksensitive Regulation der Genexpression bewirken.

Die Charakterisierung Hochdruck induzierbarer Promotoren könnte von großem Interesse für biotechnologische Anwendungen sein. Gerade bei den für die industrielle Fermentation wichtigen und als ungefährlich geltenden Milchsäurebakterien mit GRAS-Status (*generally regarded as safe*) besteht starkes Interesse an der Etablierung neuer genetischer Werkzeuge (Rud *et al.* 2006). So würde eine gezielte Induktion der Expression heterologer Gene durch eine moderate HHD-Behandlung unter Umständen deutliche Vorteile im Vergleich zur chemischen Induktion durch Zusatz von z.B. Nisin besitzen. Neben finanziellen Aspekten ist

für die Lebensmittelindustrie dabei besonders wichtig den Zusatz chemischer Verbindungen zur Induktion zu vermeiden. Aus diesem Grund beschäftigen sich viele Arbeiten mit der Analyse synthetischer Promotor-Bibliotheken (Kuipers *et al.* 1997, Jensen und Hammer 1998a und 1998b, Cases und Lorenzo 1998, Hammer *et al.* 2006, Rud *et al.* 2006) und der Aktivität spezieller Promotoren in unterschiedlichen Milchsäurebakterien (McCracken und Timms 1999, McCracken *et al.* 2000, Chen und Steele 2005). Neben dem Verständnis der Genregulation unter Hochdruck könnte die Charakterisierung spezieller Promotoren von *L. sanfranciscensis* somit eventuell auch eine interessante, anwendungsorientierte Bedeutung besitzen.

4.6.1 Konstruktion und Etablierung eines Reportergensystems

Reportergensysteme stellen eine der geeignetsten Methoden zur Bestimmung von Promotoraktivitäten bei Bakterien dar. Für *L. sanfranciscensis* ist bisher noch kein solches System beschrieben. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit zunächst ein Reportergensystem für *L. sanfranciscensis* entwickelt werden, das auch zur Messung von Promotoraktivitäten unter Hochdruckstress geeignet ist.

Da eine funktionelle Expression von *lacZ* (β -Galaktosidase) aus *E. coli* in *L. sanfranciscensis* nicht möglich ist, wird alternativ das eine α -Galaktosidase kodierende *mela* aus *L. plantarum* als Reporter gen verwendet. Dieses System bietet dabei Vorteile im Vergleich zu anderen Systemen. So konnte z. B. *gfp* (green fluorescent protein) in *L. casei* zwar unter optimierten Bedingungen mit starker O_2 -Zufuhr funktionell exprimiert werden (Perez-Arellano und Perez-Martinez 2003), für Promotoranalysen unter Standardbedingungen mit normaler Belüftung ist dieses System aber nicht geeignet. Mittels Western-Blot konnte zwar auch in *L. sanfranciscensis* die Synthese von GFP nachgewiesen werden, allerdings ist das Protein, das für die korrekte Faltung Sauerstoff benötigt, unter Normalbedingungen nicht oder nur schwach aktiv. Eine quantitative Bestimmung der Proteinmengen durch Messung der Fluoreszenz ist somit nicht möglich (persönliche Mitteilung M. Ehrmann).

Ein anderes, von Stentz *et al.* (2000) beschriebenes und weit verbreitetes Reportersystem für Milchsäurebakterien basiert auf *gusA* (β -Glucuronidase). Allerdings wird dieses Gen in einigen Milchsäurebakterien nicht exprimiert (Platteuw 1994) und funktioniert auch bei *L. sanfranciscensis* nur unzureichend (persönliche Mitteilung M. Ehrmann).

Das von Silvestroni *et al.* (2002) beschriebene und für eine α -Galaktosidase kodierende *mela* Gen aus *L. plantarum* bietet alle Vorteile, die auch von *lacZ* bekannt sind und kommt auch bei anderen Mikroorganismen wie *Saccharopolyspora erythraea* als Reporter gen zum Einsatz (Post und Luebke 2005). Analog zum Nachweis von β -Galaktosidase sind auch Chemikalien

zur quantitativen (α -PNPG) und qualitativen (Blau-Weiss-Screening mit α -X-Gal) Analyse der α -Galaktosidase Aktivität käuflich erhältlich. Die durch ein erstes Screening bestätigte Tatsache, dass zahlreiche Milchsäurebakterien zwar β -Galaktosidase Aktivität, aber keine α -Galaktosidase Aktivität besitzen, ist eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von *mela* als Reporter gen in diesen Bakterien. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *L. sanfranciscensis* und *L. plantarum* sind im Gegensatz zu Genen aus dem phylogenetisch weniger verwandten *E. coli* keine Probleme mit dem „codon usage“ zu erwarten. In Kombination mit dem für *E. coli* und verschiedene Milchsäurebakterien geeigneten Shuttlevektor pLP3537 (Posno *et al.* 1991) und dessen hohe Transformationseffizienz, ist der Einsatz des entwickelten Systems für verschiedene Bakterien möglich.

Durch den Einbau des Transkriptionsterminators aus dem Maltose-Operon von *L. sanfranciscensis* vor das *mela* Reporter gen wird eine Transkription von *mela* durch andere Promotoren auf dem Plasmid pSH85350 verhindert. Das *mela* Gen aus *L. plantarum* wurde dabei inklusive dem an seinem Ende natürlich vorhandenen rho-unabhängigen Terminator amplifiziert, um so ein „Durchlesen“ von dahinter liegenden Genen zu vermeiden. Ein Einfluss auf Transkription oder Translation von *mela* und somit auf die letztlich gemessene Mela-Aktivität wird so minimiert. Eine Besonderheit dieses Systems besteht bei der Integration der zu testenden Promotorsequenzen. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass die Insertion nach dem ATG-Startkodon erfolgt und die jeweilige Promotorsequenz so zu 100% erhalten bleibt. Bei den meisten Reportersystemen werden die für die Insertion benötigten Schnittstellen oft an die Sequenz vor dem Startkodon angehängt und somit diese potentiell sensible Sequenz verändert. Durch Eingriffe in die Promotorsequenz (z.B. veränderter Abstand oder veränderte Sequenz zwischen Ribosomenbindestelle und Startkodon) können Auswirkungen auf die Expression des Reporter gens nicht ausgeschlossen werden. Die Insertion nach dem Startkodon des Reporter gens hatte zur Folge, dass die beiden ersten Triplets von *mela* verändert wurden („ATGGCAGTA“ zu „ATGGCCGGC“). Dies führte aber lediglich zum Austausch der dritten Aminosäure („Met-Ala-Val“ zu „Met-Ala-Gly“). Ein negativer Einfluss auf die Enzymaktivität von Mela war dadurch nicht zu erwarten und konnte auch nicht beobachtet werden. Auf diese Weise ist die Untersuchung der realen, absolut unveränderten Promotorsequenzen ohne Bildung von Artefakten unter den verschiedenen Stressbedingungen möglich.

Vor dem Einsatz des Reportersystems musste es mit Hilfe eines gut charakterisierten Promotors validiert werden. Eine detaillierte Analyse des *dnaK*-Promotors erfolgt in Kapitel 4.6.3.6. Es ist bekannt, dass die Transkription des *dnaK*-Operons bei zahlreichen Bakterien nicht nur durch Hitze-, sondern auch durch Salzstress induziert wird (Kilstrup 1997, Laport

2004, Ventura 2005). Der Aufbau des *dnaK*-Operons aus *L. sanfranciscensis* (*hrcA-grpE-dnaK-dnaJ*) ist sehr ähnlich zu dem von anderen Milchsäurebakterien und auch zu dem von Gram negativen Bakterien (Segal und Ron 1996, Laport *et al.* 2004, Schmidt *et al.* 1999, Ventura *et al.* 2005, Weng *et al.* 2001). Auch die Transkription von vier vergleichbar großen mRNAs konnte bereits in anderen Milchsäurebakterien mit einer für *dnaK* spezifischen Sonde im Northern Blot beobachtet werden (Laport *et al.* 2004). Das mit ca. 4900 nt längste Transkript entspricht dabei dem gesamten Operon. Das 3600 nt große Transkript umfasst die Gene *hrcA* bis *dnaK*, während das nächst kleinere Transkript mit ca. 2500 nt aus den beiden Genen *grpE* und *dnaK* besteht. Das *dnaK* Gen alleine entspricht schließlich dem mit 1900 nt kleinstem Transkript.

Durch die gerichtete und korrekte Insertion des *dnaK*-Promotors in den Vektor pSH85350 und der Transformation des resultierenden Vektors pSH85351 ist eine erste funktionelle Synthese von MelA in *E. coli* und in *L. sanfranciscensis* möglich. Nach Herstellung eines Zellextraktes aus dem transformierten *L. sanfranciscensis* Stamm konnten die optimalen Bedingungen für den Enzymtest erarbeitet werden. Die Untersuchungen zeigten, dass bei einem leicht sauren pH-Wert von 5,3 und bei einer Temperatur von 32°C das Enzym MelA seine Optima besitzt. Dies entspricht den Erwartungen und liegt im Bereich der Wachstumsoptima sowohl von *L. plantarum*, als auch von *L. sanfranciscensis*. Allerdings scheint das Enzym gegenüber hohen Temperaturen sehr empfindlich zu sein. Selbst eine kurzzeitige Inkubation bei 40°C schädigt MelA irreversibel. Dabei spielt es keine Rolle, ob die lebenden Zellen oder der Zellextrakt diesen Temperaturen ausgesetzt wird. Aus diesem Grund müssen bei der Herstellung des Rohextraktes Hitzeentwicklungen durch Ultraschall vermieden und die Arbeiten daher immer auf Eis durchgeführt werden. Experimente mit Hitzestress sind mit diesem Reportersystem daher nicht möglich.

Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse aus den molekularbiologischen Analysen mit den Resultaten aus den proteinchemischen Versuchen verglichen werden. Mit zunehmenden Salzkonzentrationen von 0,25 M bis 1,5 M NaCl im Medium war eine abnehmende Wachstumsgeschwindigkeit von *L. sanfranciscensis* zu beobachten, die auf eine steigende Stresssituation für diesen Organismus hindeutet. Zeitgleich stieg die relative MelA-Aktivität, was einer zunehmenden MelA-Konzentration in den Zellen gleichkommt. Derselbe Effekt war mittels Northern Blot zu beobachten. Mit steigenden Salzkonzentrationen im Medium stieg im Vergleich zur konstitutiv exprimierten 16S rRNA sowohl die Expression des *dnaK*-Operons im Wildtyp, als auch die *mela* Expression im transformierten Stamm. Der Anstieg war in beiden Fällen identisch und verlief parallel zu dem der MelA Enzymaktivität. Die Aktivitätsänderung

des *dnaK*-Promotors kann in Abhängigkeit der Stressintensität also entweder auf RNA / DNA-Ebene mittels Northern Blot, oder auf Protein / Enzym-Ebene mittels MelA-Enzymtest gemessen werden. Das Reportersystem ist somit geeignet, die relative Veränderung der Promotoraktivität bei verschiedenen Salzkonzentrationen zuverlässig zu verfolgen.

Obwohl *dnaK* und das *mela* Reporter gen den identischen *dnaK*-Promotor besitzen, ist die Expression der *mela* mRNA deutlich höher. Dieser Effekt ist auf die Kopienzahl der Gene zurückzuführen. Während das *dnaK*-Operon in der Regel nur einmal auf dem Chromosom lokalisiert ist, befindet sich das *mela* Gen auf einem Vektor mit einer berechneten Kopienzahl von ca. 110. Die Kopienzahl ändert sich auch nach Inkubation für mehrere Stunden unter verschiedenen Stressbedingungen (Salz, Hitze, Kälte, Hochdruck) nicht signifikant.

Da die absoluten Werte der MelA Aktivitäten stark von der Zelldichte der exponentiellen Kultur abhängig sind und bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 zwischen 450 und 1000 Miller-Units schwanken, ist eine quantitative Analyse der Promotoraktivität mit dem Reportersystem allerdings nicht möglich. Daher sollten für die relativen Messungen immer nur eine Ausgangskultur verwendet werden. Nach Aufteilung in einzelne Subkulturen können diese dann unter den verschiedenen Stressbedingungen inkubiert werden. Im anschließenden Vergleich der MelA-Aktivitäten mit einer Kontrolle konnten die Veränderungen der Promotoraktivität bzw. die Induktions- und Repressionsfaktoren einzelner Promotoren in Abhängigkeit der Umweltbedingungen bestimmt werden.

Auf diese Weise wurde im Rahmen der Entwicklung und Etablierung des neuen Reportersystems für *L. sanfranciscensis* gleichzeitig auch die Sequenz des *dnaK*-Operons vervollständigt, sowie dessen Expressionsprofil und dessen Regulation unter NaCl-Stress aufgeklärt. Die Verwendung des Reportersystems zur Charakterisierung weiterer Promotoren und die Einsatzmöglichkeiten des Systems für andere Stressarten werden in den weiteren Kapiteln gezeigt.

4.6.2 Etablierung der RealTime PCR für *L. sanfranciscensis*

In den letzten Jahren entwickelten sich die Methoden und der Einsatzbereich der PCR immer weiter. Reverse Transkription, gefolgt von der quantitativen RealTime PCR (RT-PCR) stellt dabei eine äußerst sensitive Methode mit einem gleichzeitig sehr hohen dynamischen Bereich zur Quantifizierung von RNA dar. So ist die LightCycler[®] Technologie für die Analyse der Transkription aller Arten von Zellen anwendbar und ersetzt in vielen Fällen bereits weniger sensitive und aufwendigere Methoden wie Northern Blot Analysen, RNase Protection Assays oder die quantitative, „competitive PCR“. Bei der RT-PCR ist sowohl eine absolute, als auch

eine relative Quantifizierung der Transkription unter Verwendung von internen oder externen Standards möglich (Vandecasteele *et al.* 2001 und 2002, Ball *et al.* 2003).

Um die Promotoraktivität eines bestimmten Gens in einem speziellen Organismus und somit die Transkription dieses Gens in Abhängigkeit verschiedener Umweltbedingungen zu untersuchen, wird die relative Quantifizierung im Vergleich zu einem konstant exprimierten Referenzgen empfohlen (Roche Molecular Biochemicals, Technial note no. LC 10/2000, Mannheim). Für das als „Housekeeping-Gen“ bezeichnete Referenzgen muss gezeigt werden, dass es unter den untersuchten Umweltbedingungen konstitutiv exprimiert wird. Wird dies für eine bestimmte Inkubationsbedingung nachgewiesen und sind geeignete Primer zur spezifischen Detektion dieses Gens vorhanden, kann es als Referenzgen für die Quantifizierung der Transkriptionsrate jeden anderen Gens bei diesen Bedingungen und in diesem Organismus eingesetzt werden. Die Etablierung solcher Referenzgene ist aufwendig und eine konstitutive Expression nicht immer leicht nachweisbar.

Während bei Eukaryoten einige Gene wie z. B. das Gen für β -Aktin, β -2-Mikroglobulin, Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase oder für die 18S und 28S rRNA in vielen Fällen für eine Anwendung als „Housekeeping-Gen“ etabliert sind (Thellin *et al.* 1999, Schmittgen und Zakrajsek 2000, Dheda *et al.* 2004), existiert für Bakterien bisher noch kein universell einsetzbares „Housekeeping-Gen“. Vandecasteele *et al.* Haben (2001) den Metabolismus möglicher „Housekeeping-Gene“ bei *S. epidermidis* als stark dynamischen Prozess beschrieben, der geeignet ist sehr schnell auf verschiedenste Umweltbedingungen zu reagieren. Aufgrund dieser Tatsache ist es fraglich, ob auch für Bakterien ähnlich breit anwendbare Referenzgene etabliert werden können. Untersuchungen der Gene *gyr* (Gyrase), *gmk* (Guanylat-Kinase), *tpi* (Triosephosphat-Isomerase) oder *hsp60* (Hitzeschockprotein 60) aus verschiedenen Bakterien (Vandecasteele *et al.* 2001, Goerke *et al.* 2001, Eleaume und Jabbouri 2004) zeigten, dass sie als Referenzgene nur für limitierte Anwendungen brauchbar sind. Savli *et al.* (2003) führten ähnliche Untersuchungen für *P. aeruginosa* durch. In einigen Studien wurde die ribosomale RNA (16S oder 23S rRNA) als Referenz für die RT-PCR eingesetzt (Tonon 2001, Spano *et al.* 2004 und 2005). Bei Zellen von *S. epidermidis*, *S. aureus* oder *E. coli*, die von der exponentiellen in die stationäre Phase übergehen, setzt die Abnahme der 16S rRNA im Vergleich zu anderen möglichen „Housekeeping-Genen“ deutlich früher ein (Nomura *et al.* 1984, Vandecasteele *et al.* 2001, Eleaume und Jabbouri 2004). Die nicht konstitutive Expression unter suboptimalen Wachstumsbedingungen macht eine Verwendung der 16S rRNA daher höchstens für Zellen in der stationären Phase empfehlenswert, in der kein Wechsel von der exponentiellen in die stationäre Phase stattfindet

(Eleaume und Jabbouri 2004). Ein weiterer Nachteil von ribosomaler RNA ist die hohe Kopienzahl in exponentiell wachsenden Zellen (Nomura 1984, Vandecasteele *et al.* 2001). Eine hohe Differenz zwischen der Kopienzahl des Referenzgens und der des zu untersuchenden Gens ist problematisch und kann zur Messung von Artefakten führen.

Aus diesem Grund muss für Versuche mit *L. sanfranciscensis* für jedes RT-PCR Experiment unter verschiedenen Stressbedingungen ein geeignetes Referenzgen etabliert werden, das unter den jeweiligen Stressbedingungen konstitutiv exprimiert wird.

Nach Auswertung der Microarray-Analyse (Pavlovic 2006) konnte ein Gen für eine Phosphoketolase *xpk* aus *L. sanfranciscensis* identifiziert werden, dessen Expression unter Hochdruck nicht verändert ist. Phosphoketolase ist ein zentrales Enzym im Phosphoketolase-Stoffwechselweg heterofermentativer und fakultativ homofermentativer Milchsäurebakterien, das bereits gut charakterisiert ist und auch in einigen anderen Bakterien vorkommt (Goldberg *et al.* 1966, Meile *et al.* 2001, Posthuma *et al.* 2002).

Aufgrund dieser Analyse wurde *xpk* zur Eignung als Referenzgen ausgewählt und getestet. Zunächst wurde mittels Southern-Blot Analyse gezeigt, dass nur eine Kopie des *xpk* Gens im Genom von *L. sanfranciscensis* vorhanden ist und auch keine Pseudogene nachweisbar sind. Die Northern-Blot Analyse ergab, dass im Gegensatz zu *dnaK* die Expression des *xpk*-Gens bei Hitze-, Kälte-, Salz- oder Hochdruckstress konstitutiv ist und die mRNA Menge von *xpk* keine Veränderungen zeigt. Im Vergleich zur ebenfalls gleich bleibenden Menge der 16S rRNA wurde deutlich, dass die Kopienzahl der *xpk* mRNA um ein Vielfaches niedriger ist und eher im Größenbereich der Kopienzahl von *dnaK* liegt.

So wurde gezeigt, dass *xpk* alle Anforderungen an ein Referenzgen für die RT-PCR erfüllt: Im Genom von *L. sanfranciscensis* ist nur eine Kopie des *xpk* Gens vorhanden ist. Pseudogene sind nicht nachweisbar. Die Transkription von *xpk* wird unter Hitze-, Kälte-, Hochdruck- und Salzstress nachweislich nicht beeinflusst und die mRNA Konzentration von *xpk* ist deutlich niedriger als die der 16S rRNA. Diese Eigenschaften machen für *L. sanfranciscensis* das Gen *xpk* zum idealen Referenzgen für die relative Quantifizierung der Transkription mittels RT-PCR. So kann für jedes beliebige Gen aus diesem Organismus die Veränderung der Transkription bzw. die Analyse der Promotoraktivität unter den genannten Stressbedingungen untersucht werden.

4.6.3 Charakterisierung ausgewählter Promotorsequenzen

Nach Etablierung der beiden Methoden zur Analyse von Promotoraktivitäten mittels Reportergenassay und RT-PCR konnten anschließend ausgewählte Promotorsequenzen untersucht und charakterisiert werden. Wie einleitend bereits erwähnt, besitzt die

Bakterienzelle zur Regulation der Genexpression verschiedenste Mechanismen. Die Regulation läuft dabei auf mehreren Ebenen während der Transkription und Translation ab, so dass eine Feintuning der Genexpression in Abhängigkeit des Lebenszyklus und der jeweiligen Umweltbedingungen möglich ist. Der wichtigste Schritt der Genregulation bei Bakterien basiert dabei auf dem komplexen und regulierten Vorgang der Transkriptionsinitiation bei der die DNA abhängige RNA-Polymerase (RNAP) das Schlüsselenzym darstellt (Browning und Busby 2004). Das RNAP „Core-Enzym“ setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen und bildet die katalytische Maschinerie zur Synthese von mRNA. Das „Core Enzym“ ist alleine allerdings nicht in der Lage an einen Promotor zu binden. Daher wird in allen Fällen ein spezifischer Sigma-Faktor (σ -Faktor) benötigt, der zusammen mit RNAP das sogenannte „RNAP-Holo-Enzym“ bildet. Die verschiedenen σ -Faktoren bilden zusammen eine Familie relativ kleiner Proteine, die zur Erkennung der jeweiligen Promotorsequenzen durch die RNAP benötigt werden. Neben den so genannten „housekeeping“ σ -Faktoren zur konstitutiven Expression (σ^{70} bei Gram negativen, bzw. σ^A bei Gram positiven Bakterien) besitzen alle Bakterien unterschiedliche Anzahlen alternativer σ -Faktoren, die zur Expression von Genen mit alternativen Promotorsequenzen benötigt werden. So besitzt z.B. *B. subtilis* die alternativen σ -Faktoren σ^B zur generellen Stressantwort, σ^H , σ^E , σ^F , σ^G und σ^K zur Expression von Genen, die essentiell für die verschiedenen Phasen der Sporulation sind, σ^S für die Expression von Genen in der stationären Phase, σ^D zur Expression für Gene zur Chemotaxis und Synthese von Flagellen und eine Reihe weiterer σ -Faktoren (weitere Einzelheiten siehe Reviews von Haldenwang 1995, Wösten 1998, Guedon *et al.* 2001, Gruber und Gross 2003). Dabei ist jeder σ -Faktor für die Bindung der RNAP an eine spezifische Promotorsequenz zuständig und kontrolliert so spezielle Regulons, die bei bestimmten Umweltbedingungen aktiviert werden. Je höher dabei die Übereinstimmung der jeweiligen Promotorsequenz mit der für den jeweiligen σ -Faktor spezifischen Konsensus-Sequenz ist, desto „stärker“ ist der Promotor und desto höher ist die Genexpression. So besteht bei *E. coli* der σ^{70} -Faktor bzw. bei Gram positiven Bakterien der σ^A -Faktor aus vier verschiedenen Bereichen und mehreren Unterbereichen, die zur Bindung spezieller Regionen auf den Promotorsequenzen benötigt werden. Neben einer -35-Region mit der Konsensus-Sequenz „TTGACA“ erkennt dieser σ -Faktor auch eine -10-Region mit der Konsensus-Sequenz „TATAAT“. Die Benennung der Regionen richtet sich nach dem Abstand des stromaufwärts liegenden Transkriptionsstartpunkts (+1). Bei Milchsäurebakterien und anderen Gram positiven Bakterien ist darüber hinaus in vielen Fällen ein „TGN“-Motiv unmittelbar vor der -10-Region als so genannte erweiterte -10-Region konserviert „TGNTATAAT“ (N = A, C, G

oder T) (Jensen und Hammer 1998, Guedon *et al.* 2001). Die anderen σ -Faktoren erkennen die für sie spezifischen Promotorsequenzen, so dass in Abhängigkeit der in der Zelle vorhandenen Konzentrationen an σ -Faktoren eine spezifische und auf die Umwelt angepasste Genexpression bestimmter Regulons stattfinden kann.

Die Genexpression wird aber nicht nur durch die verschiedenen σ -Faktoren, sondern auch durch unterschiedlichste Transkriptionsaktivatoren und –repressoren reguliert, die wiederum spezifische Promotorsequenzen erkennen und an diese binden. Während Aktivatoren in der Regel an DNA Bereiche zwischen den Positionen -30 und -80 binden, besitzen Repressoren ihre Bindestellen eher in den Bereichen, die mit den Bindestellen der RNA-Polymerase überlappen (-40 bis +5) (Perez-Martin *et al.* 1994, Wösten 1998). Transkriptionsregulatoren müssen aber nicht immer direkt an einen Promotor binden. Sie können auch als einfache Moleküle wie zyclisches AMP (cAMP), PRPP (5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat) oder ppGpp (Guanosin-3',5'-bisphosphat) indirekt durch z.B. Interaktion mit der RNAP die Genexpression verschiedener Regulons positiv und negativ beeinflussen (Details siehe Reviews von Wösten 1998, Guedon *et al.* 2001, Gruber und Gross 2003, Browning und Busby 2004).

Schließlich kann die Stärke eines Promotors auch durch DNA-Motive im Promotor beeinflusst werden, die nicht mit dem σ -Faktor, sondern direkt mit der RNA-Polymerase interagieren. So kann z.B. ein so genanntes UP-Element direkt an die α -Untereinheit der RNAP binden und so die „Stärke“ des Promotors direkt erhöhen. UP-Elemente sind Komponenten bakterieller Promotoren, die stromaufwärts der -35-Sequenz, meist zwischen -40 und -60 lokalisiert sind und aus einer an Adenin und Thymin reichen Sequenz bestehen (Ross *et al.* 1993, Perez-Martin 1994, Estrem *et al.* 1998, Krüger und Hecker 1998). Die Konsensussequenz besteht aus „AAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTNNAAAA“, die in ähnlicher Zusammensetzung auch bei *Lactobacillus* und *Lactococcus* identifiziert werden konnte (McCracken *et al.* 2000). Die Übereinstimmung mit der Konsensussequenz ist dabei in den meisten Fällen nicht immer absolut identisch. Auch das Vorhandensein von Guanin und Cytosin im UP-Element ist möglich (McCracken *et al.* 2000). So ist für *E. coli* z.B. auch ein UP-Element mit der Sequenz „AATGTTTTA“ beschrieben (Lacour *et al.* 2003).

Bei den verschiedenen Sequenzmotiven, die die Genexpression beeinflussen, spielen aber nicht nur die spezifischen Sequenzen der DNA-Motive eine entscheidende Rolle, sondern auch der exakte Abstand zwischen den einzelnen Motiven ist von großer Bedeutung. Bei zu großem oder zu kleinem Abstand der Motive ist eine Bindung des entsprechenden σ -Faktors nicht optimal und die Promotorstärke kann dadurch verändert werden. Auf diese Weise

beeinflussen diese „Spacer-Regionen“ direkt die Stärke eines Promotors und ermöglichen der Zelle somit ein „Feintuning“ der Genexpression (Jensen und Hammer 1998).

Schließlich ist auch die so genannte Shine-Dalgarno (SD) Sequenz fester Bestandteil eines Promotors. Die auch als Ribosomenbindestelle (RBS) bezeichnete Sequenz hat zwar keinen direkten Einfluss auf die Transkription, ist aber für die Bindung der Ribosomen an die mRNA und somit für eine effiziente Translation verantwortlich und so maßgebend an der Genexpression beteiligt (Kuriki 1990). Für die Bindung des Ribosoms an die RBS ist ein an Adenin und Guanin reicher Sequenzabschnitt auf dem Promotor im Abstand von 3 bp bis 8 bp vor dem ATG-Startkodon optimal. Eine mögliche Konsensussequenz „GAGGAA(N₃₋₆)ATG“ ist von Kuriki (1990) beschrieben.

Weitere, für bakterielle Promotoren spezifische Sequenzen werden in den nachfolgenden Kapiteln im Rahmen der Charakterisierung der einzelnen Promotoren beschrieben.

4.6.3.1 *rbsK* / *rpi* Promotor

In der Proteomanalyse dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unter subletalem Hochdruck die Konzentration des Proteins RbsK / Rpi bei *L. sanfranciscensis* am stärksten zunimmt. Die Transkriptionsanalyse (Pavlovic 2006) und die Northern-Blot Analyse zeigten, dass auch das entsprechende Gen eines der unter Hochdruck am stärksten induzierten Gene ist und einen vergleichbaren Induktionsfaktor wie das Protein besitzt. Aber nicht nur unter Hochdruck, sondern auch unter anderen Stressbedingungen (Salz-, Kälte-, Säure- und Hungerstress) waren die Menge sowohl des Proteins, als auch des Gens signifikant erhöht, was eine Regulation auf Ebene der Transkription wahrscheinlich macht. Trotz des für ein klassisches Stressprotein typischen Expressionsprofils, sind in der Promotorsequenz keine eindeutigen Merkmale für Promotoren von Stressgenen vorhanden.

So zählt das Gen nicht zur Klasse I der Stressgene, die durch den HrcA-Repressor kontrolliert werden und dazu eine spezifische Bindestelle mit der Sequenz „TTAGCACTC-N₉-GAGTGCTAA“ im Promotor besitzen (Hecker *et al.* 1996, Guedon *et al.* 2001). Das Gen besitzt auch keinen auf den ersten Blick erkennbaren σ^B -abhängigen Promotor mit der Konsensussequenz „G(A/T)TT(A/G)A-N₁₂₋₁₄-GGGTAT“, so dass das *rbsK* / *rpi*-Gen auch nicht zur Klasse II der Stressgene gezählt werden kann (Hecker *et al.* 1996). Klasse III Stressgene zeichnen sich dadurch aus, dass sie von einem CtsR-Repressor (Class three stress gene Repressor) reguliert werden. Allerdings ist in der *rbsK* / *rpi* Promotorsequenz auch keine typische CtsR-Bindestelle mit der konservierten Sequenz „RGTCARANWNRGTCAAA“ vorhanden (Derre *et al.* 2000, Guedon *et al.* 2001). Aus diesem Grund muss das Gen

wahrscheinlich zur Klasse IV der Stressgene zugerechnet werden, die sich durch eine bisher unbekannte, alternative Regulation der Genexpression auszeichnen (Chastanet *et al.* 2001).

Analysiert man die Promotorsequenz genauer, so sind im Vergleich zu anderen Promotoren einige Besonderheiten zu entdecken. Neben einer typischen RBS mit der Sequenz „GAGGAGG“ 8 bp vor dem ATG-Startkodon kann auch eine für σ^A -abhängige Promotoren typische -10-Region mit der konservierten Sequenz „TATAAT“ gefunden werden. Die zugehörige -35-Region im Abstand von 16 bp besitzt demzufolge die Sequenz „CTTACA“. Die Abweichungen von der „TTGACA“ Konsensussequenz ist für Milchsäurebakterien nicht ungewöhnlich. Auffällig sind die AT-reichen Regionen oberhalb der möglichen Promotorsequenz, die selbst für Gram positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt untypisch sind. Es ist denkbar, dass diese Abschnitte als UP-Elemente wirken. Das Vorkommen von mehr als einem möglichen UP-Element kann eventuell darauf zurückzuführen sein, dass das Gen unter der Kontrolle von mehr als nur einem Promotor steht. Dies ist keineswegs ungewöhnlich und wurde bei *B. subtilis* schon für eine Reihe von Genen beschrieben, die sowohl von σ^A , als auch von σ^B abhängigen Promotoren reguliert werden (Bernhardt *et al.* 1997, Gerth *et al.* 1998 und 2004, Price *et al.* 2001, Rollenhagen *et al.* 2003). Bei genauer Analyse lassen sich auch innerhalb der *rbsK* / *rpi* Promotorsequenz neben dem σ^A abhängigen Promotor noch mögliche σ^B abhängige Promotoren mit teilweiser Abweichung von der Konsensussequenz „G(A/T)TT(A/G)A-N₁₂₋₁₄-G(T/G)GTAT“ identifizieren. So überlappt die erste mögliche Sequenz „GCTTAC-N₁₃-CGTTAT“ mit dem σ^A abhängigen Promotor. Eine zweite mögliche Sequenz „CTTTAA-N₁₄-GGGCCA“ kann 6 bp unterhalb eines möglichen UP-Elements identifiziert werden. Deutlich oberhalb der ersten beiden Sequenzen befindet sich eine dritte mögliche Sequenz „GCCTAA-N₁₅-GTGTAT“. Auch wenn die Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz aus *B. subtilis* nicht optimal sind, können signifikante Ähnlichkeiten gefunden werden. Auch für *L. monocytogenes*, *B. cereus* und *S. aureus* sind ähnliche Abweichungen für verschiedene σ^B abhängige Promotoren beschrieben (Cetin *et al.* 2004, van Schaik *et al.* 2004, Gertz *et al.* 2000).

Die starke Induktion des Gens bei Kältestress kann unter Umständen auf das Vorhandensein so genannter „Y-Box“ Motive zurückzuführen sein. Dieses Motiv ist sowohl bei Bakterien, als auch bei Eukaryoten sehr stark konserviert und besitzt die Konsensussequenz „ATTGG“ (Kohno *et al.* 2003). Die Orientierung spielt dabei keine Rolle. Bei Milchsäurebakterien befindet sich diese Sequenz in den Promotorregionen verschiedener Kälteschockproteine vor allem zwischen der -35-Region und der -10-Region (Mayo *et al.* 1997, Skinner und Trempy 2001). Bei *L. lactis* sind zwei „Y-Boxen“ für den *clpX* Promotor beschrieben, von denen eine

mit der Sequenz „TTTGG“ in einem Nukleotid von der Konsensussequenz abweicht (Skinner und Trempey 2001). In der *rbsK/rpi* Promotorsequenz von *L. sanfranciscensis* sind vor allem im Bereich der postulierten σ^B abhängigen Promotorsequenzen mehrere mögliche „Y-Box“ Motive vorhanden. „ATTGC“ und „ATTGA“ im Bereich der ersten und „GGTTA“, „CCAAA“ und „CCAAA“ im Bereich des zweiten möglichen σ^B abhängigen Promotors. In diesem Zusammenhang sollten auch die auffallend vielen „CAAA“ und „GTTTT“ Motive erwähnt werden, die innerhalb der analysierten Promotorsequenz achtmal, bzw. viermal vorhanden sind und für die eine mögliche Funktion nicht ausgeschlossen werden kann.

Insgesamt sind in der Promotorregion von *rbsK/rpi* aber nur wenige bisher bekannte und charakterisierte Sequenzmotive zu finden. Dafür sind überdurchschnittlich viele mögliche Sequenzen und Motive vorhanden, die Bindestellen für Transkriptionsregulatoren darstellen könnten. Auch die vielen „AT“-reichen Abschnitte sind für diese Promotorsequenz auffällig. Aufgrund der Anzahl möglicher Promotorsequenzen können keine exakten Aussagen zur Regulation dieses Gens getroffen werden. Die Expression unter den verschiedenen Stressbedingungen ist aber unter Umständen auf mögliche σ^B abhängige Promotorsequenzen im Zusammenspiel mit spezifischen Transkriptionsregulatoren zurückzuführen.

4.6.3.2 *mdh* Promotor

Auch für diese Promotorregion konnte eine klassische RBS mit der Sequenz „GAGGAGA“ 6 bp vor dem ATG-Startkodon identifiziert werden. 12 bp oberhalb befindet sich ein mögliches σ^A abhängiges Promotormotiv (-35-Region und -10-Region) „TTGTTA-N₁₉-TATATA“. Weiter stromaufwärts zu dieser Sequenz finden sich trotz komplementärer Orientierung auch wieder mehrere „CAAA“ Motive, die auch schon in der *rbsK/rpi* Promotorregion auffällig oft vorhanden waren. Oberhalb davon ist ein zweiter potentieller σ^A abhängiger Promotor mit der Sequenz „TTGTCA-N₁₆-TATAAC“ vorhanden.

Da es sich bei dieser Sequenz um die komplementäre Sequenz der *rbsK/rpi* Promotorregion handelt, sind natürlich auch hier die AT-reichen Regionen, die als UP-Elemente dienen könnten vorhanden. Aufgrund der Tatsache, dass neben der Sequenz auch immer der Abstand der einzelnen Motive zueinander eine wichtige Rolle spielt, kann die Bedeutung dieser Sequenzen in den beiden Promotoren aber komplett verschieden sein. Gleiches gilt für die zahlreichen „Y-Box“-Motive, die unabhängig von ihrer Orientierung als DNA-Bindestelle dienen könnten und wie die anderen für den *rbsK/rpi* Promotor beschriebenen Sequenzmotive in komplementärer Form vorliegen. Allerdings sind die Motive, die beim *rbsK/rpi* Promotor relativ nah am Transkriptionsstartpunkt sind, nun entsprechend weit vom

Transkriptionsstartpunkt des *mdh* Gens entfernt und umgekehrt. Ein Einfluss der „Y-Box“ Motive an der Regulation dieses Gens ist daher weniger wahrscheinlich. Die komplementäre Anordnung einer Promotorregion kann wie bereits erwähnt signifikante Unterschiede bezüglich deren Aktivität zur Folge haben. Nur so ist auch zu erklären, dass der *mdh*-Promotor unter den getesteten Stressbedingungen (Hochdruck, Kälte, Salz) im Gegensatz zum *rbsK/rpi* Promotor nicht induziert wird und auch die allgemeine Promotoraktivität deutlich niedriger als die Aktivität der komplementären Promotorsequenz ist.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Orientierung des Promotors für dessen Aktivität absolut essentiell ist. Die Insertion einer Promotorsequenz alleine hat somit noch keine Auswirkung auf die Regulation des nachfolgenden Gens. Außerdem wurde deutlich, dass ein und derselbe Sequenzabschnitt für zwei entgegengesetzt orientierte Promotoren kodieren kann, deren Aktivitäten komplett unterschiedlich reguliert werden. Auch die Stärke des Promotors ist von der Orientierung der Sequenz abhängig. So ist die Promotorstärke des *mdh*-Promotors deutlich schwächer als die des *rbsK/rpi* Promotors.

4.6.3.3 *clpL* Promotor

Die Expression des *clpL* Gens ist wie die des *rbsK/rpi* Gens unter Hochdruck-, Salz-, Kälte- und Hungerstress induziert. Auch die Promotorregion dieses Gens besitzt 8 bp vor dem ATG-Startkodon eine mögliche RBS mit der Sequenz „GGAAGAAGGA“. Wie für Clp-ATPasen üblich, zählt auch ClpL aus *L. sanfranciscensis* zur Klasse III der Stressgene und besitzt eine für den CtsR-Repressor typische Bindestelle mit der Sequenz „TTTGACC-ATT-TTGACT“ (Derre *et al.* 1999). Die Orientierung des wiederholten Heptanukleotids spielt dabei anscheinend keine Rolle, da die Bindestelle in allen möglichen Varianten vor verschiedenen Clp-ATPasen aus unterschiedlichen Bakterien identifiziert werden konnte. In der Regel liegt die Bindestelle zwischen der -35-Region und der -10-Region oder aber stromabwärts davon (Derre *et al.* 1999a, Chastanet *et al.* 2001, Chastanet und Msadek 2003). Im vorliegenden Fall konnte eine konservierte -10-Region „TATAAT“ nur unterhalb der CtsR-Bindestelle gefunden werden. Darüber hinaus existierte im passenden Abstand dazu keine konservierte -35-Region. In vielen Fällen bildet eines der Heptanukleotide der CtsR-Bindestelle die -35-Region („TTGACC“ oder „TTGACT“). Unter Umständen kommt hierfür das erste Heptanukleotid der CtsR-Bindestelle in Frage. Im Abstand von 15 bp befindet sich ein „TG-Motiv“, das einer erweiterten, für Milchsäurebakterien typischen -10-Region entspricht. Die anschließende Sequenz „GCAAAT“ hat aber nur die letzten drei Basen mit der Sequenz „TATAAT“ gemeinsam. Eine weitere oder alternative Promotorregion könnte auch die oberhalb der CtsR-

Bindestelle befindliche Sequenz „TTGTAT-N11-TAAATT“ darstellen. Dafür spricht auch die am 5'-Ende vorhandene „AT“-reiche Sequenz „TTTAAATATTTTTT“, die ein UP-Element darstellen könnte.

Erst kürzlich wurde die Promotorregion des *clpL*-Gens aus *O. oeni* analysiert (Varcamonti *et al.* 2006). Hier ist die Anordnung ähnlich zu der von *L. sanfranciscensis*. 7 bp vor dem ATG-Startkodon liegt eine Ribosomenbindestelle. Eine mögliche -35-Region und -10-Region weichen zum einen stark von der Konsensussequenz ab und liegen zum anderen ebenfalls hinter der CtsR-Bindestelle. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht auch in der Induktion des Promotors durch Kältestress, was für Clp-ATPasen eher ungewöhnlich ist. Allerdings unterscheiden sich die Gene der beiden Organismen hinsichtlich der Expression unter Hitzestress. Während die Expression von *clpL* aus *O. oeni* auch unter Hitze induziert ist, konnte dies für *L. sanfranciscensis* nicht beobachtet werden.

Schließlich sind in der Promotorregion noch mögliche „Y-Boxen“ vorhanden. Ein der Konsensussequenz entsprechendes „TAACC“-Motiv ist unterhalb der CtsR-Bindestelle lokalisiert. Am 5'-Ende überlappt dieses Motiv unter Umständen mit einer weiteren „Y-Box“ in gleicher Orientierung („TAACTAACC“). Eine weitere Sequenz, die eventuell zwei entgegengesetzt orientierte und ineinander verschachtelte „Y-Boxen“ „CTAATC“ enthält, liegt unterhalb der konservierten -10-Region.

Letztendlich konnte aber für diese Promotorregion keine typische Promotorsequenz gefunden werden. Mit Ausnahme der für Clp-ATPasen typischen CtsR-Bindestelle, die das *clpL* Gen als Klasse III Stressgen klassifiziert, sind weitere Aussagen zu möglichen Promotormotiven nur spekulativ. Es zeigte sich, dass die Induktionsfaktoren bei Hochdruck-, Kälte- und Salzstress zwischen Gen- und Proteomebene vergleichbar sind. Dies lässt eine Regulation auf Ebene der Transkription über spezifische Promotorsequenzen vermuten. Insgesamt besitzt das *clpL* Gen den stärksten in dieser Arbeit getesteten Promotor. Die MelA-Aktivitäten liegen bei Reporter-gen-Konstrukten mit diesem Promotor um das zwei- bis dreifache über Stämmen mit einem *rbsK* / *rpi* Promotor.

4.6.3.4 *clpX* Promotor

Von der Promotorregion des *clpX* Gens ist bisher nur ein kleiner Abschnitt bekannt. Auch wenn hier die Ribosomenbindestelle nicht so ausgeprägt vorliegt, ist davon auszugehen, dass die „AGA“ Sequenz 5 bp vor dem ATG-Startkodon als Bindestelle für Ribosomen dient. Eine -35-Region und erweiterte -10-Region wird wahrscheinlich durch die Sequenz „TTGCAA-N₁₂-TG-N-TATAGT“ dargestellt. Leichte Abweichungen von der Konsensussequenz sind für

Milchsäurebakterien durchaus üblich. So ist zum Beispiel die zu „TATAGT“ abgeänderte „TATAAT“-Box mit der -10-Region des durch Stress induzierbaren *htrA*-Gens aus *Lactobacillus helveticus* identisch (Smeds *et al.* 1998). Auch bei *O. oeni* ist die entsprechende Region des *clpX* Promotors zum Teil stark abweichend von der jeweiligen Konsensussequenz (Guzzo *et al.* 2000).

Innerhalb der *clpX* Promotorregion wurde wie für Clp-ATPasen üblich eine CtsR-Bindestelle vermutet. Mit der Sequenz „TGTGGTA-N₃-TTTGAGA“ konnte zumindest eine ähnliche Region gefunden werden. Diese Sequenz liegt dabei direkt auf der vermuteten -10-Region und entspricht somit auch den Erwartungen für die Position dieser Bindestelle.

Weitere Aussagen zur Regulation und Promotorstärke konnten aufgrund der nur kurzen bekannten Sequenz und fehlender weiterer Versuchsdaten noch nicht getroffen werden. Die erwartete Zugehörigkeit zur Klasse III der Stressgene konnte aufgrund der wahrscheinlichen CtsR-Bindestelle aber bestätigt werden.

4.6.3.5 *ctsR-clpC* Promotor

Das *ctsR-clpC* Operon wurde sequenziert und charakterisiert, obwohl weder CtsR, noch ClpC in der Proteomanalyse als durch Hochdruck beeinflusste Proteine gefunden wurden. Auch in der Transkriptionsanalyse (Pavlovic 2006) wurde keines der beiden Gene als ein durch HHD induziertes Gen identifiziert. Da Stressgene der Klasse III wie zum Beispiel *clpL* und *clpX* im Zusammenhang mit subletaler Hochdruckbehandlung aber sehr wohl eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, lag es nahe, auch die Regulation des Gens zu analysieren, das den für Klasse III Stressgene typischen Repressor kodiert. Auch die bei *L. monocytogenes* durch eine Mutation im *ctsR* Gen zurückzuführende Hochdruckresistenz (Karatzas *et al.* 2003) lies eine nähere Charakterisierung dieses Operons für *L. sanfranciscensis* lohnenswert erscheinen.

7 bp vor dem ATG-Startkodon befindet sich mit der Sequenz „GAGA“ eine mögliche Ribosomenbindestelle des Operons. Zwischen den beiden Genen sind mit Ausnahme einer zweiten Ribosomenbindestelle („GAAAGAAGG“) vor dem *clpC* Gen keine weiteren Promotorsequenzen. In der Promotorregion des Operons ist eine klassische σ^A abhängige Promotorsequenz „TTGTCA-N₁₇-TATAAT“ mit einem möglichen AT-reichen UP-Element stromaufwärts lokalisiert. Aufgrund der zwischen -10-Region und RBS liegenden CtsR-Bindestelle mit der stark konservierten Sequenz „AGTCAAC-ATT-AGTCAGA“ ähnelt die gesamte Region stark der Promotorsequenz des *ctsR-clpC*-Operons aus *L. lactis* (Varmanan *et al.* 2000). Damit wurde gezeigt, dass das Operon wie bei zahlreichen anderen Gram positiven Bakterien auch durch das eigene Genprodukt reguliert wird (Chastanet *et al.* 2003).

Die zwei oberhalb der -35-Region auffälligen AT-reichen Sequenzen mit inversen Wiederholungen von 7 bp und 19 bp getrennt durch die symmetrische Basenfolge „TTAATT“ sind zur Ausbildung räumlicher Strukturen eines „stems“ bzw. „stem-loops“ geeignet. Unter Umständen dienen diese Sequenzen als Transkriptionsterminatoren stromaufwärts liegender Gene. Dafür spricht auch die auffallend GC-reiche Region oberhalb dieser Motive, die für kodierende Abschnitte bei *L. sanfranciscensis* eher untypisch ist. Eine mögliche Rolle dieser Region für die Expressionsregulation dieses Operons kann nicht ausgeschlossen werden.

Trotz offensichtlicher Gemeinsamkeiten bei der Genregulation über den CtsR-Repressor und der daraus folgenden Zugehörigkeit zu den Stressgenen der Klasse III, muss die Expression der Gene *clpL*, *clpX* und des *ctsR-clpC*-Operons noch auf eine andere Art reguliert werden. Während von den untersuchten Stressbedingungen nur Hitzestress die Expression des *ctsR-clpC*-Operons induziert, ist es bei *clpX* nur subletaler Hochdruck und bei *clpL* neben Hochdruck auch noch Kälte-, Salz- und Hungerstress. Die Stärke des *ctsR* Promotors ist verglichen mit dem *clpL* Promotor unter Standardbedingungen eher gering und mit der Aktivität des *mdh* Promotors vergleichbar.

4.6.3.6 *dnaK* Promotor

Das *dnaK*-Operon ist ein in vielen verschiedenen Organismen stark konserviertes Operon, das konstitutiv, aber auch unter unterschiedlichen Stressbedingungen verstärkt exprimiert wird. Die Sequenz des Operons aus *L. sanfranciscensis* wurde in dieser Arbeit vervollständigt und die Expression im Rahmen der Etablierung des MelA-Reporter-gen-Systems, sowie während der Etablierung von *xpk* als Referenzgen für die RT-PCR ausführlich charakterisiert. Die Expression ist nicht nur unter Hitzestress, sondern auch durch Hochdruck-, Salz- und Säurestress induziert.

Das *dnaK* Gen ist als generelles Stressgen bekannt und zählt bei Gram positiven Bakterien zur Klasse I der Stressgene, die sich durch eine typische CIRCE-Bindestelle (controlling inverted repeat of chaperone expression) für den HrcA-Repressor auszeichnen. Damit reguliert sich das Operon durch sein eigenes HrcA Genprodukt (Zuber und Schumann 1994, Segal und Ron 1996). Die Konsensussequenz für diese Bindestelle „TTAGCACT(T/C)-N₉-GAGTGCTAA“ ist stark konserviert und auch in der *dnaK* Promotorregion von *L. sanfranciscensis* zwischen einer möglichen -10-Region und der RBS zu finden. Die potentielle RBS „AGGAAG“ befindet sich dabei 8 bp vor dem ATG-Startkodon. Eine typische -35-Region und eine -10-Region können durch die Sequenz „TTGACC-N₂₂-TATAAA“ dargestellt werden. In diesem Fall stimmen die 4 Basenpaare „ATTC“ direkt oberhalb der -35-Region mit einer typischen,

bei *L. lactis* häufig gefundenen Sequenz überein (Jensen und Hammer 1998). Noch weiter stromaufwärts von der -35-Region liegen weitere auffällige Sequenzabschnitte. Neben der invertierten Sequenzwiederholung „TTAAGCTTA“, die eine Stammstruktur bilden kann, wurden auch in dieser Promotorregion wieder mehrere „AT“-reiche Sequenzabschnitte (z.B. „AAAATATTTAT“ oder „TATTTTAAAAATAAT“) gefunden, die als UP-Elemente dienen könnten. Darüber hinaus sind auch zwei mögliche σ^B abhängige Promotorsequenzen in dieser Region vorhanden. Trotz einiger Abweichungen von der Konsensussequenz „AGGTTTAA-N₁₄-GGTAAT“ und GGGATGAA-N₁₂-ACGTAT“ könnten diese Sequenzen alternative Promotorregionen darstellen. Die Koexistenz von σ^A und σ^B abhängigen Promotorsequenzen bei Stressgenen ist wie bereits erwähnt nicht ungewöhnlich.

Auffallend innerhalb der Promotorregion von *dnaK* sind auch hier wieder zahlreiche mögliche und zum Teil ineinander verschachtelte mögliche „Y-Box“-Motive („GGTTA-N₂₀-GGTTT-TAACCAAA-N₈-GGTAA-N₁₄-AGTGGCTA-N₂₇-ACTGGTAA-N₁₀-ATTGA-N₆-TAAAC-N₃₅-AATGGTT A-A-GCTTA- -35-Region“). Die Konsensussequenz für „Y-Box“-Motive ist „ATTGG“ in allen möglichen Orientierungen („CCAAT“, „GGTTA“, „TAACC“). Trotz kleinerer Abweichungen wie „GGTTT“, bzw. „CCAAA“ und andere Austausche einzelner Basenpaare könnten die Sequenzmotive potentielle „Y-Boxen“ darstellen.

Die Versuche mit dem Reportersystem zeigten, dass der *dnaK* Promotor relativ stark ist. In exponentiell wachsenden Zellen führte der Promotor zu einer MelA Aktivität, die nur knapp unter der Aktivität des *clpL* Promotors liegt, der in dieser Arbeit den bisher stärksten untersuchten Promotor darstellt. Eine denkbare Möglichkeit dafür könnte die Beteiligung des Expressionsaktivators CcpA sein. Erst seit kurzem ist bekannt, dass das ursprünglich als Regulatorprotein für die Kohlenstoff Katabolit Repression in Gram positiven Bakterien beschriebene CcpA als Transkriptionsaktivator für *dnaK* und *groESL* im nah verwandten Mikroorganismus *L. plantarum* wirkt (Castaldo *et al.* 2006). Die Bindestelle für CcpA ist eine so genannte „cre“-Sequenz (catabolite responsive element) mit der Konsensussequenz „WWTGNAARCGNWWNCAWW“ (W = A/T, R = A/G, N = A/G/C/T). Eine mögliche „cre“-Sequenz von *dnaK* in *L. plantarum* liegt 74 bp vor der -35-Region und weicht teilweise erheblich von der Konsensussequenz ab („ATTGGGGGCGACGGTCAAT“). Für *groESL* liegt die „cre“-Sequenz 103 bp oberhalb der -35-Region. Auch diese Sequenz weicht von der Konsensussequenz ab („ATTGGCGGCGATTAACCAT“). In der *dnaK* Promotorregion von *L. sanfranciscensis* befindet sich eine mögliche „cre“-Sequenzen 101 bp vor der -35-Region („AATGCGTGATGAAGTCAA“). Eine Bindung dieses möglichen Transkriptionsaktivators

könnte zumindest teilweise für die insgesamt relativ hohe Promotorstärke von *dnaK* verantwortlich sein.

4.6.3.7 *groESL* Promotor

Wie die Gene des *dnaK* Operons zählen bei den meisten Gram positiven Bakterien auch *groEL* und *groES* zur Klasse I der Stressgene. Das bedeutet, dass innerhalb ihres Promotors ein typisches CIRCE Element vorhanden ist und ihre Expression so unter anderem auch durch den HrcA-Repressor reguliert wird. Neuere Studien zeigen, dass bei einigen Vertretern der Gram positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wie *L. lactis* und verschiedenen Staphylokokken das *groESL* Operon nicht nur durch den HrcA-Repressor, sondern zusätzlich auch durch den CtsR-Repressor, der typisch für Stressgene der Klasse III ist, reguliert wird (Chastanet *et al.* 2003). Frees *et al.* (2007) führten die verschiedenen Ausnahmen bei der Regulation der klassischen Stressgene auf und stellten somit die bisherige Aufteilung der Stressgene in vier Klassen zum Teil in Frage. So steht das *groESL*-Operon bei *Lactococcus*, sowie bei einigen Streptokokken und Staphylokokken nicht nur unter der Kontrolle von HrcA, sondern auch unter der von CtsR. Bei *O. oeni* existiert für das *groESL*-Operon hingegen nur eine CtsR-Bindestelle, während bei *Bacillus*, *Listeria*, einigen Streptokokken und *Lactobacillus gasseri* nur eine typisch erwartete HrcA-Bindestelle vorhanden ist. Auch für das *dnaK*-Operon und verschiedene *clp* Gene existieren diese Ausnahmen. Teilweise stehen diese Gene zusätzlich auch noch unter der Kontrolle der für Stressgene der Klasse II typischen σ^B abhängigen Promotoren (Frees *et al.* 2007). Bei *L. sanfranciscensis* kann vermutet werden, dass analog zum nächstverwandten Organismus dieser Studie, *L. gasseri*, das *groESL* Operon nur unter der Kontrolle des HrcA-Repressors steht. Allerdings sollte dann gemäß dieser Studie in *L. sanfranciscensis* auch *clpL* ebenso wie *groESL* und *dnaK* nur eine Bindestelle für HrcA, nicht aber für CtsR besitzen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist bei *L. sanfranciscensis* aber genau das Gegenteil der Fall. In der Promotorregion von ClpL ist wie ursprünglich erwartet nur eine CtsR-Bindestelle, aber keine HrcA-Bindestelle vorhanden.

In der vorliegenden Promotorregion des *groESL* Operons konnte wie im *dnaK* Operon zwischen der -10-Region und der RBS ein gut konserviertes CIRCE-Element mit der Sequenz „TTAGCACTC-N₉-GAGTGCTAA“ identifiziert werden. Die mögliche RBS mit der Sequenz „GGAGG“ befindet sich 8 bp vor dem ATG-Startkodon. Die mögliche -10-Region besitzt die Sequenz „TATTAT“. Ein für eine erweiterte -10-Region typisches „TG-Motiv“ ist ebenfalls vorhanden. Allerdings ist dieses Motiv nicht wie sonst üblich durch ein beliebiges Basenpaar

von der -10-Region getrennt. Aufgrund der nur teilweise bekannten Promotorsequenz war eine weitere Charakterisierung des Promotors an dieser Stelle nicht möglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptionsanalyse zeigte, dass wie bei *dnaK* eine Induktion der Expression unter Hitze-, Salz- und Hochdruckstress erfolgt. Diese Ergebnisse decken sich sowohl für *dnaK*, als auch für *groESL* mit den Beobachtungen aus der Proteomanalyse. Auch unter Kältestress ist die Genexpression der beiden Operons identisch. Weder bei *dnaK*, noch bei *groESL* ist die Expression induziert. Auf Proteinebene hingegen konnte eine Zunahme der Menge an GroEL, nicht aber an DnaK beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis auf weitere Regulationsmechanismen unter deren Kontrolle diese beiden Proteine eventuell stehen. Neben einer Regulation auf Ebene der Translation ist auch eine posttranslationale Kontrolle vor allem über die Proteinstabilität bzw. über eine gezielte und von der Stressart abhängigen Proteolyse der einzelnen Proteine wahrscheinlich. Auch für die nicht identische Regulation von GroEL und DnaK bei der Proteomanalyse unter Säure- und Hungerstress (hierzu liegen keine Transkriptionsanalysen vor) könnten solche alternativen Regulationsmechanismen mit eine Rolle spielen.

Über die relative Stärke des *groESL*-Promotors unter Standardbedingungen konnte an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, da die bekannte Promotorsequenz für eine Klonierung vor das *melA* Reporter gen zu kurz ist.

4.6.3.8 *cpsID* Promotor

Das für eine Glykosyltransferase kodierende Gen *cpsID* erwies sich in der Transkriptionsanalyse von Pavlovic (2006) als eines der unter HHD am stärksten induzierten Gene. Die Druckhöhe bei der die Zellen inkubiert wurden, betrug sowohl für die Versuche mit Microarray, als auch für die Experimente mit RT-PCR 45 MPa. In dieser Arbeit konnte bei Versuchen mit Druckhöhen von 80 MPa in der Analyse mittels MelA Reportersystem hingegen keine Induktion der Genexpression gemessen werden. Eine solch unterschiedliche Regulation der Promotoraktivität bei den beiden unterschiedlichen Drücken kann normal sein. So konnte Pavlovic (2006) verschiedenste Gene identifizieren, die bei 45 MPa und 80 MPa unterschiedlich induziert werden. Neben Genen, die bei 45 MPa stärker induziert waren, gab es auch Gene, die bei 80 MPa deutlich stärker exprimiert wurden. Im umgekehrten Fall wurden Gene wie *fusA* identifiziert (siehe Kapitel 4.6.3.10), deren Expression bei 45 MPa reprimiert wurden, während bei 80 MPa keine Veränderung messbar war. Der Reporter gen-Assay zeigte auch, dass ebenso wie für die Hochdruckbehandlung bei 80 MPa auch für Salz-

und Kältestress im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der Promotoraktivität von *cpsID* festgestellt werden konnte.

Ein weiterer Unterschied zu den bisher in dieser Arbeit analysierten Promotoren lag neben der Nicht-Induzierbarkeit bei 80 MPa in der insgesamt sehr niedrigen Aktivität des *cpsID* Promotors. Die basale Aktivität betrug dabei nur ca. 10% der Aktivität des *rbsK/rpi* Promotors. Die geringe Promotoraktivität erlaubt den Rückschluss, dass unter den untersuchten Bedingungen das Genprodukt von *cpsID* in der Zelle nur in sehr geringen Konzentrationen benötigt wird. Es könnte aber auch sein, dass die Regulation der Glykosyltransferase nicht auf Ebene der Transkription, sondern auf einer anderen Ebene stattfindet. So könnte aufgrund translationaler oder posttranslationaler Regulationsmechanismen die Konzentration des Enzyms in der Zelle trotz geringer Transkriptionsrate beachtlich ansteigen. Als Beispiele seien hier nur eine hohe Stabilität der mRNA oder eine hohe Halbwertszeit des Enzyms selbst, sowie hohe Translationsraten genannt. Unter Umständen wird die Expression aber auch erst durch Bedingungen induziert, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Viel wahrscheinlicher als eine der analysierten Stresssituation erscheinen andere intrazelluläre und metabolische Parameter für eine Induktion des Gens.

Betrachtet man die Promotorregion von *cpsID* so waren im Vergleich zu den anderen bisher charakterisierten Regionen einige Besonderheiten auffällig. Besonders der ungewöhnlich grosse Abstand zwischen der möglichen RBS „AAGGACGA“ 7 bp vor dem ATG-Startkodon und der wahrscheinlichen -10-Region und -35-Region „TTGAGT-N₁₈-TATTAT“ des σ^A abhängigen Promotors. Dass die beiden Regionen nicht komplett der Konsensussequenz entsprechen ist nicht ungewöhnlich. Ein so großer Abstand zwischen RBS und -10-Region bietet Platz für verschiedene regulatorische Sequenzmotive. So sind neben den ungewöhnlich Thymidin reichen Abschnitten vor, zwischen und hinter der σ^A abhängigen Promotorsequenz „TTTTTCTTAAAATT-N₄₇-TTTTATATACATTT-N₉-TTTT-GAG-TTTATTTTTTATT-N₁₃-TTAATTTTTTTTATT“ auch noch andere ungewöhnliche Sequenzmotive wie die Wiederholung eines ungewöhnlichen Pentamers „TCCCA-N₅-TCCCA“ vorhanden. Kurz darauf folgen noch weitere inverse Sequenzwiederholungen wie „AAGCC-N₃-GGCTT“ und „AGTT-N₂-AACT“, sowie eine direkte Wiederholung der Sequenz „TTTG-N₂-TTTG“.

Diese Sequenzmotive können theoretisch Bindestellen für unterschiedliche Repressoren oder Aktivatoren darstellen und darüber hinaus auch verschiedene räumliche Strukturen ausbilden, die regulatorische Auswirkungen haben könnten. Dadurch lässt sich eventuell die äußerst geringe basale Aktivität des Promotors erklären. Auch eine bisher noch nicht bekannte,

komplexe Regulation erscheint aufgrund der möglicherweise regulatorisch aktiven Sequenzen plausibel. Eine Induktion bei 45 MPa, nicht aber bei 80 MPa ist aufgrund spezieller thermodynamischer Gegebenheiten so denkbar.

4.6.3.9 *xpk* Promotor

Die Expression des für eine Phosphoketolase kodierenden *xpk* Gens wurde in dieser Arbeit und in der Arbeit von Pavlovic (2006) wohl mit am ausführlichsten untersucht. Die Genexpression von *xpk* wird durch Hochdruckstress (45 MPa und 80 MPa) nicht verändert. Wie die Versuche mittels Northern-Blot, RNA Dot-Blot, Microarray (Pavlovic 2006) und RT-PCR zeigten, wird *xpk* auch unter Hitze-, Kälte- oder Salzstress konstitutiv exprimiert. Auch die Versuche mit dem Reportersystem bestätigten diese Ergebnisse. Mit dem Reportersystem wurde auch festgestellt, dass die Expression von *xpk* relativ hoch und ungefähr mit der von *rbsK/rpi* vergleichbar ist. Bei der Charakterisierung der Promotorregion konnten wie erwartet keine, für Stressgene typischen Sequenzmotive wie ein CIRCE Element oder eine CtsR Bindestelle gefunden werden. Die potentielle Ribosomenbindestelle „AAGGAG“ liegt 9 bp vor dem ATG-Startkodon. Auch eine mögliche σ^A abhängige Promotorsequenz „TTGACT-N13-TG-T-TAATAT“ mit -35-Region und erweiterter -10-Region im passenden Abstand zueinander ist vorhanden. Diese typische Promotorsequenz trägt sicherlich dazu bei, dass die basale Promotoraktivität von *xpk* im Vergleich zum z. B. *cpsID* Gen relativ hoch ist. Auch bei diesem Gen stellt sich aber wieder die Frage der Regulation. Ähnlich wie bei *cpsID* ist davon auszugehen, dass die Expression von *xpk* nicht durch die untersuchten Stressbedingungen, sondern eher durch bestimmte Bedingungen im Stoffwechsel reguliert wird. Besonderheiten innerhalb der *xpk* Promotorregion, die regulatorische Aufgaben übernehmen könnten sind zahlreich vorhanden. So befinden sich oberhalb der -35-Region zwei inverse Sequenzwiederholungen und ein typisches „Y-Box“ Motiv „GCTTTC-N₃-GAAAGC-N₂₃-ATTT-N-AAAT-N₉-CCAAT“. Die mögliche -35-Region ist aber auch direkt Bestandteil eines weiteren inversen Sequenzmotivs „CAAAAAGT-TTG-ACTTTTTG (die -35-Region ist unterstrichen). Unter Umständen ist aufgrund dieses regulatorischen Sequenzmotivs auch die Abweichung der -35-Region von der Konsensussequenz „TTGACA“ zu erklären. Und schließlich konnte auch zwischen der potentiellen -10-Region und der RBS eine weitere inverse Sequenzwiederholung „GATTTTAACTTA-N₄-TATTTTAAAATC“ gefunden werden. Die verschiedenen Sequenzmotive könnten durchaus eine spezifische Regulation von *xpk* in Abhängigkeit verschiedener Umwelteinflüsse bewirken. Unter den analysierten Stressbedingungen wird der

Promotor aber anscheinend nicht beeinflusst. Die konstitutive Expression von *xpk* unter Hochdruck-, Kälte-, Hitze- und NaCl-Stress ermöglicht daher die Verwendung dieses Gens als Referenz- und „Housekeeping“-Gen für die Untersuchung der allgemeinen Genexpression unter diesen Stressbedingungen mittels RT-PCR und Northern-Blot Analyse.

4.6.3.10 *fusA* Promotor

Schließlich wurde auch noch der Promotor eines Gens analysiert, dessen Expression unter Hochdruck verringert ist. Dazu wurde das für den Elongationsfaktor G kodierende *fusA* Gen gewählt. Dieses Gen wurde in der Transkriptionsanalyse von Pavlovic (2006) als das bei *L. sanfranciscensis* während einer Hochdruckbehandlung bei 45 MPa am stärksten reprimierte Gen identifiziert. In derselben Arbeit wurde aber wie bereits erwähnt auch festgestellt, dass bei 80 MPa keine Repression der Genexpression zu beobachten ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist identisch mit der für den Promotor des *cps1D* Gens (4.6.3.8).

Auch dieser Promotor besitzt einige Besonderheiten, die in den Sequenzen der bisher untersuchten Promotoren noch nicht beobachtet wurden. Daher erscheint eine von den bisher beschriebenen Promotoren abweichende Regulation plausibel. Neben einer relativ eindeutigen RBS „AAGGAG“ 6 bp vor dem ATG-Startkodon ist auch eine gut konservierte σ^A abhängige Promotorsequenz „TTGGTA-N₁₀-TG-C-TTAATT“ im erwarteten Abstand stromaufwärts vorhanden. Darüber hinaus konnte eine für viele Promotoren von Milchsäurebakterien typische, erweiterte -10-Region identifiziert werden. Ein regulatorisches Element stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit die zwischen der RBS und der -10-Region liegende inverse Wiederholung von 12 Basenpaaren „CTAAGAAATTGG-CCACTTTTTTAG“ dar. Aufgrund der Lage könnte angenommen werden, dass diese Sequenz als Bindestelle für bisher noch nicht bekannte Aktivatoren oder Repressoren dient. Ungewöhnlich ist auch eine direkt auf der -35-Region befindliche inverse Sequenzwiederholung „ATTACC-GTT-GGTAAT“ (die -35-Region ist unterstrichen). Auch hier könnten Transkriptionsmodulatoren binden und wirkungsvoll in die Regulation der Genexpression eingreifen. Es ist denkbar, dass sich die Affinität möglicher Bindestellen zu Bindungspartnern in Abhängigkeit unterschiedlicher Druckverhältnisse aufgrund thermodynamischer Eigenschaften signifikant verändert. So wäre es denkbar, dass bei 45 MPa eine Repression zu beobachten ist, bei 0,1 MPa und 80 MPa hingegen nicht.

Trotz einer relativ konservierten Promotorsequenz war die mit dem Reportersystem untersuchte basale Promotoraktivität bei optimalen Wachstumsbedingungen unerwartet niedrig und lag in der Größenordnung des *mdh* Promotors. Dies könnte unter Umständen

darauf zurückzuführen sein, dass bereits bei Standardbedingungen die Expression des Gens durch die Bindung möglicher Repressoren blockiert wird. Auch Salz- und Kältestress bewirkten ähnlich wie Hochdruckstress bei 80 MPa keine signifikante Veränderung der Genexpression. Wie auch für die anderen Gene mit geringer basaler Transkription, könnte es gut möglich sein, dass die Regulation von *fusA* über alternative Mechanismen auf Ebene der Translation und Posttranslation organisiert ist.

5 Zusammenfassung

Im Hinblick auf eine sichere Hochdruckpasteurisierung von Lebensmitteln zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einmal mehr, dass bei Bakterien eine signifikante Induktion von Adaptation und Kreuzresistenz gegenüber einer Hochdruckbehandlung möglich ist. Vor allem die Art und Lagerung der Lebensmittel spielen eine wichtige Rolle, da subletale Stressbedingungen wie Kühlung, saure pH-Werte oder hohe NaCl-Konzentrationen eine bis zu 5-fach höhere Resistenz gegenüber letalen HHD-Behandlungen induzieren können. Eine moderate Erwärmung vor oder während der Hochdruckpasteurisierung erhöht hingegen die Sensitivität bei *L. sanfranciscensis* und könnte so im Sinne eines Hürdenkonzepts als sinnvolle Kombination schonender Inaktivierungsmethoden interessant sein. Im umgekehrten Fall könnte die erhöhte Hitzeresistenz nach einer HHD-Behandlung den Herstellprozess von Starterkulturen mittels Sprühtrocknung optimieren. Die Bildung einer Stressantwort konnte aufgrund der physiologischen Versuche postuliert werden, da die Versuche mit Chloramphenicol zeigten, dass zur Bildung von Resistenzen eine intakte Proteinbiosynthese essentiell ist.

Zur Charakterisierung dieser Stressantwort wurde eine ausführliche Proteomanalyse durchgeführt. Nach Auswertung der Versuche mittels 2D-PAGE konnten insgesamt 16 Proteine identifiziert werden, die in *L. sanfranciscensis* durch subletalen Hochdruckstress beeinflusst werden. Wie erwartet besitzt *L. sanfranciscensis* keine spezielle, aus Hochdruck spezifischen Proteinen zusammengesetzte Stressantwort. Mit Ausnahme eines Proteins werden alle HHD sensitiven Proteine auch unter den anderen untersuchten Stressbedingungen ähnlich reguliert. Dies deutet darauf hin, dass für jede Stressart aus einem Pool an Stressproteinen immer die in der jeweiligen Situation nützlichsten Proteine kombiniert werden. Je nach Wirkmechanismus und Angriffsort der einzelnen Stressart ergeben sich als spezifische Stressantwort somit ähnliche, aber nicht identische Kombinationen bestimmter Proteine.

Unter den HHD induzierten Proteinen befinden sich allgemeine Stressproteine wie DnaK, GroEL oder ClpL, die alle Chaperon-Aktivitäten aufweisen. Für ClpL existieren eindeutige Anzeichen dafür, dass es die Funktion der in *E. coli* charakterisierten ClpB-ATPase besitzt. ClpL und ClpB heben sich von den übrigen Clp-ATPasen dadurch ab, dass sie nicht mit ClpP interagieren. Auch die gemeinsame Induktion von DnaK, GroEL und ClpB unter verschiedenen Stressbedingungen zur Bildung eines Chaperon-Netzwerkes deutet darauf hin, dass ClpL bei *L. sanfranciscensis* die Funktion von ClpB übernimmt und an dessen Stelle mit

DnaK und GroEL interagiert. Für die Denaturierung von Proteinen unter HHD spricht auch die Induktion von TrxB, für das neben der Thioredoxin Reduktase Aktivität ebenfalls eine Funktion als Chaperon nachgewiesen werden konnte. Und auch ClpX, das in dieser Arbeit einzige, spezifisch unter Hochdruck induzierte Protein, besitzt Chaperon-Aktivität. Darüber hinaus wirkt ClpX zusammen mit ClpP auch als spezifische Protease und steht dabei in engem Zusammenhang mit dem als Trans-Translation bekannten Prozess. Die HHD-Stressantwort richtet sich also nicht nur gegen bereits denaturierte Proteine, sondern greift wahrscheinlich auch in die Translation und Neusynthese von Proteinen unter HHD ein. Letzteres bestätigt die von Pavlovic (2006) stammende Hypothese, in der der Trans-Translation im Zusammenhang mit einer HHD-Stressantwort bei *L. sanfranciscensis* eine wichtige Rolle eingeräumt wird.

Während die Induktion von DnaK, GroEL, TrxB und verschiedenen Clp-ATPasen als Reaktion auf Hochdruckstress und andere Stressarten bereits für verschiedene Organismen beschrieben wurde, erscheint das bei *L. sanfranciscensis* unter Hochdruck am stärksten induzierte Protein in diesem Zusammenhang als absolut ungewöhnlich. Es handelt sich dabei um ein in dieser Arbeit erstmals charakterisiertes Enzym, das die Aktivitäten einer Ribokinase und einer Ribose-5-P-Isomerase in einem Enzym kombiniert. Obwohl keine der beiden Enzymfunktionen typisch für eine Stressantwort ist, wird bei *L. sanfranciscensis* dieses Enzym auch unter anderen Stressbedingungen vermehrt gebildet. Über die genaue Funktion des Proteins im Rahmen einer Stressantwort kann daher nur spekuliert werden.

Schließlich wurden in dieser Arbeit auch die Promotoren verschiedener HHD sensitiver Gene analysiert. Dazu wurde ein für *L. sanfranciscensis* geeignetes, auf *mela* basierendes Reportersystem entwickelt. Außerdem wurde *xpk* als passendes Referenzgen für die RT-PCR etabliert. Die Untersuchungen zeigten, dass unter subletalem HHD eine maximale Induktion des *rbsK/rpi*-Promotors um den Faktor 18 im Vergleich zur Kontrolle möglich ist. Eine biotechnologische Anwendung von HHD induzierbaren Promotoren erscheint prinzipiell möglich, muss aber im Einzelfall geprüft werden. Eine allgemeine Promotorsequenz für HHD induzierte Gene konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Innerhalb der verschiedenen Promotorsequenzen konnten zwar auffällige bekannte und unbekannte Sequenzmotive, aber keine generellen Gemeinsamkeiten gefunden werden. Die Regulation der verschiedenen Gene scheint daher individuell organisiert zu sein. Dies unterstützt die These, dass *L. sanfranciscensis* keine allgemeine Stressantwort besitzt, sondern in Abhängigkeit der Stressart die benötigten Gene aus dem vorhandenen Pool jeweils einzeln zu aktivieren scheint.

6 Referenzen

- Abe F., Horikoshi K. 1998. Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (piezo-) physiology. *Extremophiles* 2:223–228.
- Abe F., Kato C., Horikoshi, K. 1999. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends in Microbiology* 447(7):447-453.
- Abe F., Horikoshi K. 2000. Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20:8098–8102.
- Abe F., Horikoshi K. 2001. The biotechnological potential of piezophiles. *Trends Biotechnol.* 19:102-108.
- Abe F. 2004. Piezophysiology of yeast: occurrence and significance. *Cell Mol Biol* 50:437-445.
- Abee T., Wouters J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology* 50:65-91.
- Aertsen A., Masschalck B., Wuytack E.Y., Michiels C.W. 2003. Na⁺-mediated piezoprotection in *Rhodotorula rubra*. *Extremophiles.* 7(6):499-504.
- Aertsen A., Vanoirbeek K., De Spiegeleer P., Sermon J., Hauben K., Farewell A., Nystrom T., Michiels C.W. 2004a. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2660-2666.
- Aertsen A., Van Houdt R., Vanoirbeek K., Michiels C.W. 2004b. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186(18):6133-41.
- Aertsen A., Michiels C.W. 2005. SulA-dependent hypersensitivity to high pressure and hyperfilamentation after high-pressure treatment of *Escherichia coli* lon mutants. *Res Microbiol.* 156(2):233-237.
- Aertsen A., De Spiegeleer P., Vanoirbeek K., Lavilla M., Michiels, C.W. 2005. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2226-2231.
- Allen E.E., Facciotti D., Bartlett, D.H. 1999. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4):1710-1720.
- Allen E.E., Bartlett D.H. 2000. FabF is required for Piezoregulation of cis-vaccenic acid levels and piezophilic growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *J. Bacteriol.* 182:1264–1271.
- Allen E.E., Bartlett, D.H. 2002. Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Microbiology* 148(6):1903-1913.
- Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F., Sikes A., Dunne C.P., Ray B. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4248-4251.
- Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F., Ray B. 2000. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60(1):33-42.
- Ananta E., Knorr D. 2003. Pressure-induced thermotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International* 36:991-997.

- Ananta E., Knorr D. 2004. Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 96(3):307-13.
- Andersson C.E., Mowbray S.L. 2002. Activation of ribokinase by monovalent cations. *J. Mol. Biol.* 315(3):409-419.
- Andersson C.E. 2004. Structure-Function Studies of Enzymes from Ribose Metabolism. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 939.45 pp. Uppsala. ISBN 91-554-5875-0
- Arner E., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267:6102-6109.
- Arnold R.M., Albright L.J. 1971. Hydrostatic pressure effects on the translation stages of protein in a cell-free system in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 238: 347-354.
- Auffrey Y., Gansel X., Thammavongs B., Bouitbonnes P. 1992. Heat shock-induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 24:281-284.
- Ball T.B., Plummer F.A., HayGlass K.T. 2003. Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 130(1):82-6.
- Balny C., Masson P. 1993. Effects of High-Pressure on Proteins. *Food Reviews International* 9:611-628.
- Balny C., Masson P., Heremans K. 2002. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1595:3-10.
- Bartlett D.H., Wright M., Yayanos A.A., Silverman M. 1989. Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature* 342:572-574.
- Bartlett D.H. 1991. Pressure sensing in deep-sea bacteria. *Res. Microbiol.* 142:923-925.
- Bartlett D.H. 1992. Microbial life at high pressure. *Sci. Prog.* 76:479-496
- Bartlett D.H. 1999. Microbial adaptations to the psychrosphere/piezosphere. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:93-100.
- Bartlett D.H., Bidle K.A. 1999. Membrane-based adaptations of deep-sea piezophiles. In: J. Seckbach (Ed.) *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp. 501-512.
- Bartlett D.H. 2002. Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1595:367-381.
- Beltramo C., Grandvalet C., Pierre F., Guzzo J. 2004. Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni clpP-clpL* locus expression in response to stress. *J. Bacteriol.* 186(7):2200-5.
- Benito A., Ventoura G., Casadei M., Robinson T., Mackey, B. 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4):1564-1569.
- Ben-Zvi A.P., Goloubinoff P. 2001. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* 135(2):84-93.
- Bernhardt J., Volker U., Volker A., Antelmann H., Schmid R., Mach H., Hecker M. 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology.* 143(3):999-1017.
- Beyer A. 1997. Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* 6(10):2043-58.

- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissenbach J., Ehrlich D., Sorokin A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11:731-753.
- Bork P., Sander C., Valencia A. 1993. Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* 2:31-40.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry.* 72:248-254.
- Brehmer D., Rudiger S., Gassler C.S., Klostermeier D., Packschies L., Reinstein J., Mayer M.P., Bukau B. 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.* 8(5):427-32.
- Broadbent J.R., Oberg C.J., Wei L. 1998. Characterization of the *Lactobacillus helveticus* *groESL* operon. *Res. Microbiol.* 149(4):247-53.
- Browning D.F., Busby S.J. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(1):57-65.
- Buchberger A., Schroder H., Hestekamp T., Schonfeld H.J., Bukau B. 1996. Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.* 261(3):328-33.
- Bukau B., Walker G.C. 1989. Delta *danK52* mutants of *Escherichia coli* have defects in chromosome segregation and plasmid maintenance at normal growth temperatures. *J. Bacteriol.* 171(11):6030-8.
- Bukau B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol.* 9(4):671-80.
- Burton R.E., Siddiqui S.M., Kim Y.I., Baker T.A., Sauer R.T. 2001. Effects of protein stability and structure on substrate processing by the ClpXP unfolding and degradation machine. *EMBO J.* 20(12):3092-100.
- Butz P., Tauscher B. 2000. Recent studies on pressure-induced chemical changes in food constituents. *High Pressure Res.* 19:11-18
- CAC (Codex Alimentarius Commission). 2003. Report of the Thirty-Fifth Session of the Codex Committee on Food Hygiene, Alinorm 03/13A. Session of the Codex Committee on Food Hygiene.
- Calci K.R., Meade G.K., Tezloff R.C., Kingsley D.H. 2005. High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1):339-343.
- Campanaro S., Vezzi A., Vitulo N., Lauro F.M., D'Angelo M., Simonato F., Cestaro A., Malacrida G., Bertoloni G., Valle G., Bartlett D.H. 2005. Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains. *BMC Genomics.* 6:122
- Casadei M.A., Manas P., Niven G., Needs E., Mackey B.M. 2002. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12):5965-5972.
- Cases I., de Lorenzo V. 1998. Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 1(3):303-10.
- Castaldo C., Siciliano R.A., Muscariello L., Marasco R., Sacco M. 2006. CcpA affects expression of the *groESL* and *danK* operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microb. Cell. Fact.* 5:35.
- Cetin M.S., Zhang C., Hutkins R.W., Benson A.K. 2004. Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor, sigmaB, in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 186(3):794-802.

- Champomier-Verges M-C., Maguin E., Mistou M-Y., Anglade P., Chich J-F. 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J. Chromatogr. B* 771:329-342
- Chandu D., Nandi D. 2003. PepN is the major aminopeptidase in *Escherichia coli*: insights on substrate specificity and role during sodium-salicylate-induced stress. *Microbiology*. 149(12):3437-47.
- Charpentier E., Novak R., Tuomanen E. 2000. Regulation of growth inhibition at high temperature, autolysis, transformation and adherence in *Streptococcus pneumoniae* by clpC. *Mol. Microbiol.* 37(4):717-26.
- Chastanet A., Prudhomme M., Claverys J.P., Msadek T. 2001. Regulation of *Streptococcus pneumoniae* clp genes and their role in competence development and stress survival. *J. Bacteriol.* 183(24):7295-307.
- Chastanet A., Fert J., Msadek T. 2003. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 47:1061-73.
- Chastanet A., Msadek T. 2003. ClpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 185(2):683-7.
- Cheftel J.C. 1995. High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International* 1:75-90.
- Chen Z.M., Tian S.M., Ruan K.C. 2001. A Vaccine to Coxsackievirus Prepared by High Pressure. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 33(1):128-130.
- Chen Y.S., Steele J.L. 2005. Analysis of promoter sequences from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and their activity in other lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98(1):64-72.
- Chi E., Bartlett D.H. 1995. An rpoE-like locus controls outer membrane protein synthesis and growth at cold temperatures and high pressures in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9. *Mol. Microbiol.* 17:713-726.
- Choi I.H., Shim J.H., Kim S.W., Kim S.N., Pyo S.N., Rhee D.K. 1999. Limited stress response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* 43(8):807-12.
- Clery-Barraud C., Gaubert A., Masson P., Vidal D. 2004. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1): 635-7.
- De Angelis M., Bini L., Pallini V., Coconcelli P.S., Gobbetti M. 2001. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology*. 147:1863-73.
- De Angelis M., Gobbetti M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*. 4(1):106-122.
- Delong E.F., Yayanos A.A. 1985. Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228:1101-1103.
- DeLong E.F., Yayanos A.A. 1986. Novel bacterial lipids in deep-sea bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:730-737.
- Derré I., Rapoport G., Msadek T. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 31:117-131.
- Derré I., Rapoport G., Devine K., Rose M., Msadek T. 1999b. ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 32(3):581-93.
- Derré I., Rapoport G., Msadek T. 2000 The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded *in vivo* at 37°C. *Mol. Microbiol.* 38(2):335-347.

- Desai G., Panick G., Zein M., Winter R., Royer C.A. 1999. Pressure-jump studies of the folding/unfolding of trp repressor. *J. Mol. Biol.* 288:461-475.
- Desmond C., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R.P. 2004. Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):5929-5936.
- Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T., Mogk A., Bukau B. 1999. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature.* 400(6745):693-6.
- Deuerling E., Bukau B. 2004. Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39(5-6):261-77.
- Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 37(1):112-4, 116, 118-9.
- Diels A.M., De Taeye J., Michiels C.W. 2005. Sensitisation of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation. *Int. J. Food Microbiol.* 105(2):165-75.
- Dische Z., Borenfreund E. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192(2):583-587.
- Dougan D.A., Mogk A., Bukau B. 2002. Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(10):1607-16.
- Dougan D.A., Mogk A., Zeth K., Turgay K., Bukau B. 2002. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett.* 529(1):6-10.
- Drews O., Weiss W., Reil G., Parlar H., Wait R., Görg A. 2002. High pressure effects stepwise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics.* 2(6):765-774.
- Dulebohn D., Choy J., Sundermeier T., Okan N., Karzai A.W. 2007. Trans-translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay. *Biochemistry.* 46(16):4681-93.
- Ehrmann M.A., Vogel R.F. 1998. Maltose metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and heterologous expression of the key enzymes, maltose phosphorylase and phosphoglucomutase. *FEMS Microbiol. Lett.* 169(1):81-86. (Erratum in: *FEMS Microbiol Lett* 2000. 186(2):333)
- Eleaume H., Jabbouri S. 2004. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *J. Microbiol. Methods.* 59(3):363-70.
- Elo M.A., Sironen R.K., Kaarniranta K., Auriola S., Helminen H.J., Lammi M.J. 2000. Differential Regulation of Stress Proteins by High Hydrostatic Pressure, Heat Shock, and Unbalanced Calcium Homeostasis in Chondrocytic Cells. *J. Cellular Biochem.* 79:610-619.
- Erickson H.P., Stoffler D. 1996. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. *J. Cell. Biol.* 135:5-8.
- Eriksson S., Hurme R., Rhen, M. 2002. Low-Temperature Sensors in bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 357:887-893.
- Estrem S.T., Gaal T., Ross W., Gourse R.L. 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(17):9761-6.
- Farr D. 1990. High pressure technology in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 1:14-16.

- Farrell C.M., Grossman A.D., Sauer R.T. 2005. Cytoplasmic degradation of *ssrA*-tagged proteins. *Mol. Microbiol.* 57(6):1750-61.
- Farrell C.M., Baker T.A., Sauer R.T. 2007. Altered specificity of a AAA+ protease. *Mol. Cell.* 25(1):161-6.
- Fernandes P.M., Domitrovic T., Kao C.M., Kurtenbach E. 2004. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* 556(1-3):153-60.
- Fernandes P.M. 2005. How does yeast respond to pressure? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(8):1239-45.
- Fioretto F., Cruz C., Largeteau A., Sarli T.A., Demazeau G., El Moueffak A. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in tryptic soy broth and caviar samples by high pressure processing. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(8):1259-1265.
- Flynn J.M., Neher S.B., Kim Y.I., Sauer R.T., Baker T.A. 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell.* 11(3):671-83.
- Frees D., Ingmar, H. 1999. ClpP participates in the degradation of misfolded proteins in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 31:79-87.
- Frees D., Chastanet A., Qazi S., Sorensen K., Hill P., Msadek T., Ingmer H. 2004. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 54(5):1445-62.
- Frees D., Savijoki K., Varmanen P., Ingmer H. 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 63(5):1285-95.
- Fujii S., Obuchi K., Iwahashi H., Fujii T., Komatsu Y. 1996. Saccharides protect yeast against pressure correlated to the mean number of equatorial OH groups. In: R. Hayashi and C. Balny (eds.), *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier 1996: pp.245-252
- Gänzle M.G., Ehmann M., Hammes W.P. 1998. Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(7):2616-23.
- Gänzle M.G., Vogel R.F. 2001. On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:477-485.
- Gao X., Li J., Ruan K.C. 2001. Barotolerant *E.coli* Induced by High Hydrostatic Pressure. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 33(1):77-81
- Garcia-Graells C., Hauben K.J., Michiels C.W. 1998. High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1566-1568.
- Garcia-Graells C., Van Opstal I., Vanmuysen S.C., Michiels C.W. 2003. The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 81(3):211-21.
- Gerth U., Kruger E., Derre I., Msadek T., Hecker M. 1998. Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol. Microbiol.* 28(4):787-802.
- Gerth U., Kirstein J., Mostertz J., Waldminghaus T., Miethke M., Kock H., Hecker M. 2004. Fine-tuning in regulation of Clp protein content in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186(1):179-191.
- Gertz S., Engelmann S., Schmid R., Ziebandt A.K., Tischer K., Scharf C., Hacker J., Hecker M. 2000. Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182(24):6983-91.

- Gervilla R., Felipe X., Ferragut V., Guamis B. 1997. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. *J. Dairy Sci.* 80:2297-2303.
- Gervilla R., Ferragut V., Guamis B. 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *J. Dairy Sci.* 83(4): 674-682
- Giard J.C., Hartke A., Flahaut S., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y. 1996. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Curr. Microbiol.* 32(5):264-271.
- Gobbetti M., Corsetti A., Rossi J. 1996. *Lactobacillus sanfrancisco*, a key sourdough lactic acid bacterium: physiology, genetic and biotechnology. *Adv. Food Sci.* 18:167-175.
- Gobbetti M., Corsetti A. 1997. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology* 14:175-188.
- Goerke C., Bayer M.G., Wolz C. 2001. Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(2):279-82.
- Goldberg M., Fessenden J.M., Racker E. 1966. Phosphoketolase. *Methods Enzymol.* 9:515-520
- Goloubinoff P., Mogk A., Zvi A.P., Tomoyasu T., Bukau B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:13732-7.
- Gomez-Lopez V.M., Devlieghere F., Bonduelle V., Debevere J. 2005. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *Int. J. Food Microbiol.* 103(1):79-89.
- Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* 11(7):815-23.
- Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R.T. 1998. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* 12:1338-1347.
- Gottesman S. 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:565-87
- Grandvalet C., Coucheney F., Beltramo C., Guzzo J. 2005. CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J. Bacteriol.* 187:5614-23.
- Groß M., Jaenicke R., Nierhaus K.H. 1992. Why does pressure inhibit protein biosynthesis? *High Pressure and Biotechnology*, John Libbey Eurotext Ltd. 224:159-161.
- Groß M., Lehle K., Jaenicke R., Nierhaus K.H. 1993. Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *Eur. J. Biochem.* 218:463-468.
- Groß M., Kosmowsky I.J., Lorenz R., Molitoris H.P., Jaenicke R. 1994. Response of bacteria and fungi to high-pressure stress as investigated by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 15:1559-1565.
- Groß M., Jaenicke R. 1994. Proteins under pressure – the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of protein complexes. *Eur. J. Biochem.* 221:617-630.
- Gruber T.M., Gross C.A. 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:441-66.
- Guedon E., Renault P., Ehrlich S.D., Delorme C. 2001. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J. Bacteriol.* 183(12):3614-22.

- Haldenwang W.G. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev. 59(1):1-30.
- Hamada K., Ago H., Sugahara M., Nodake Y., Kuramitsu S., Miyano M. 2003. Oxyanion hole-stabilized stereospecific isomerization in ribose-5-phosphate isomerase (Rpi). J. Biol. Chem. 278(49):49183-49190.
- Hammer K., Mijakovic I., Jensen P.R. 2006. Synthetic promoter libraries--tuning of gene expression. Trends Biotechnol. 24(2):53-5.
- Hammes W.P., Stolz P., Gänzle M. 1996. Metabolism of *Lactobacilli* in traditional sourdoughs. Adv. Food Sci. 18:176-184.
- Han W., Christen P. 2003. Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. J. Biol. Chem. 278(21):19038-43.
- Hardon M.J., Albright L.J. 1974. Hydrostatic pressure effects on several stages on protein synthesis in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 20:359-365.
- Harte F., Amonte M., Luedecke L., Swanson B.G., Barbosa-Canovas G.V. 2002. Yield stress and microstructure of set yogurt made from high hydrostatic pressure-treated full fat milk. Journal of Food Science 67:2245-2250.
- Hauben K.J.A., Bartlett D.H., Soontjens C.C.F., Cornelis K., Wuytack E.Y. Michiels C.W. 1997. *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. 63:945-950.
- Hauben K.J., Bernaerts K., Michiels C.W. 1998. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. J. Appl. Microbiol. 85:678-684.
- Hayakawa K., Ueno Y., Kawamura S., Kato T., Hayashi R. 1998. Microorganism inactivation using high-pressure generation in sealed vessels under sub-zero temperature. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50(4):415-418.
- Hecker M., Schumann W., Volker U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 19(3):417-28.
- Hecker M. 1998. Generelle Streßproteine und unspezifische Streßvorsorge in *Bacillus subtilis*. Biospektrum 4:32-41.
- Hendrickx M., Ludikhuyze L., Van den Broeck I., Weemaes C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. Trends in Food Science and Technology. 9:197-203.
- Hengge R., Bukau B. 2003. Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. Mol. Microbiol. 49(6):1451-62.
- Hengge-Aronis R. 1996. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 21(5):887-93.
- Hengge-Aronis R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:373-395.
- Heremans K., Smeller L. 1998. Protein structure and dynamics at high pressure. Biochim. Biophys. Acta 1386:353-370.
- Hightower L.E. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell. 66(2):191-197.
- Hite B.H. 1899. The effect of pressure in the preservation of milk. West Virginia Agricultural Experiment Station, Morgantown, Bulletin 58:15-35.

- Hite B.H., Giddings N.J., Weakly C.E. 1914. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. West Virginia Agricultural Experiment Station, Morgantown, Bulletin 146: 3-67.
- Hope J.N., Bell A.W., Hermodson M.A., Groarke J.M. 1986. Ribokinase from *Escherichia coli* K12. Nucleotide sequence and overexpression of the *rbsK* gene and purification of ribokinase. *J. Biol. Chem.* 261(17):7663-8.
- Hörmann S., Scheyhing C., Behr J., Pavlovic M., Ehrmann M., Vogel R.F. 2006. Comparative proteome approach to characterize the high pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T. *Proteomics* 6:1875-1885.
- Hoskins J.R., Yanagihara K., Mizuuchi K., Wickner S. 2002. ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(17):11037-42.
- Hoskins J.R., Wickner S. 2006. Two peptide sequences can function cooperatively to facilitate binding and unfolding by ClpA and degradation by ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(4):909-14.
- Hove-Jensen B., Maigaard M. 1993. *Escherichia coli rpiA* gene encoding ribose phosphate isomerase A. *J. Bacteriol.* 175(17):5628-35.
- Huang D.C., Huang X.F., Novel G., Novel M. 1993. Two genes present on a transposon-like structure in *Lactococcus lactis* are involved in a Clp-family proteolytic activity. *Mol. Microbiol.* 7(6):957-65.
- Hunkapiller M.W., Hewick R.M., Dreyer W.J., Hood L.E. 1983. High sensitivity sequencing with a gas phase sequenator. *Methods in Enzymology.* 91:399-413.
- Ingmer H., Vogensen F.K., Hammer K., Kilstrup M. 1999. Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC*, and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 199 181(7):2075-83.
- Isaacs N.S., Chilton P., Mackey B. 1995. Studies on the inactivation by high pressure of microorganisms. *High Pressure Processing of Foods*. Eds. D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw, A.P.M. Hasting, Nottingham University Press, Nottingham.
- Ishii A., Sato T., Wachi M., Nagai K., Kato C. 2004. Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers in vivo and in vitro. *Microbiology* 150:1965-1972.
- Ishii A., Oshima T., Sato T., Nakasone K., Mori H., Kato C. 2005. Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure. *Extremophiles* 9(1):65-73.
- Ishikawa K., Matsui I., Payan F., Cambillau C., Ishida H., Kawarabayasi Y., Kikuchi H., Roussel A. 2002. A hyperthermostable D-ribose-5-phosphate isomerase from *Pyrococcus horikoshii* characterization and three-dimensional structure. *Structure.* 10(6):877-886.
- Iwahashi H., Kaul S.C., Obuchi K., Komatsu Y. 1991. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 80:325-328.
- Iwahashi H., Shimuzu H., Odani M., Komatsu Y. 2002. Barophysiology of *Saccharomyces cerevisiae* from the aspect of 6,000 gene-expression levels. In: Hayashi, R. [Hrsg.], *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. pp.239-246.
- Iwahashi H., Shimizu H., Odani M., Komatsu Y. 2003. Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles.* 7(4):291-8.
- Iwahashi H., Odani M., Ishidou E., Kitagawa E. 2005. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS Lett.* 579(13):2847-2852.
- Jaenicke R., Bernhardt G., Lüdemann H.D., Stetter K.O. 1988. Pressure-Induced Alterations in the Protein Pattern of the Thermophilic Archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2375-2380.

- Jannasch H.W. 1987. Effects of hydrostatic pressure on growth of marine bacteria. In: H.W. Jannasch, R.E. Marquis, A.M. Zimmerman (Eds.), *Current Perspectives in High Pressure Biology*, Academic Press, Toronto, pp.1–15.
- Jannasch H.W., Taylor C.D. 1984. Deep-sea microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:487–514.
- Jensen P.R., Hammer K. 1998a. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol. Bioeng.* (2-3):191-5.
- Jensen P.R., Hammer K. 1998b. The Sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:82-87.
- Jung C.H., Hartman F.C., Lu T.Y., Larimer F.W. 2000. D-ribose-5-phosphate isomerase from spinach: heterologous overexpression, purification, characterization, and site-directed mutagenesis of the recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 373(2):409-17.
- Jurkiewicz E., Villas-Boas M., Silva J.L., Weber G., Hunsmann G., Clegg R.M. 1995. Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:575-596
- Kaarniranta K., Holmberg C.I., Helminen H.J., Eriksson J.E., Sistonen L., Lammi M.J. 2000. Protein synthesis is required for stabilization of hsp70 mRNA upon exposure to both hydrostatic pressurization and elevated temperature. *FEBS Lett.* 475:283-286.
- Kalchayanand N., Sikes A., Dunne C.P., Ray B. 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection* 61:425-431.
- Kamimura K., Fuse H., Takimura O., Yamaoka Y. 1993. Effects of growth pressure and temperature on fatty acid composition of a barotolerant deep-sea bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:924-926.
- Kandror O., Busconi L., Sherman M., Goldberg A.L. 1994. Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J. Biol. Chem.* 269(38):23575-82.
- Karatzas K.A., Bennik M.H. 2002. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3183-3189.
- Karatzas K.A., Wouters J.A., Gahan C.G., Hill C. 2003. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol. Microbiol.* 49:1227-1238.
- Karl D.M., Bird D.F., Björkman K., Houlihan T., Shackelford R., Tupas L. 1999. Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. *Science* 286:2144–2147.
- Karlin S., Brocchieri L. 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J. Mol. Evol.* 47(5):565-77.
- Karzai A.W., Roche E.D., Sauer R.T. 2000. The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* 7(6):449-55.
- Kato C., Sato T., Smorawinska M., Horikoshi K. 1994. High pressure conditions stimulate expression of chloramphenicol acetyltransferase regulated by the *lac* promoter in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 122:91-96.
- Kato C., Bartlett D.H. 1997a. The molecular biology of barophilic bacteria. *Extremophiles* 1:111-116
- Kato C., Li L., Tamaoka J., Horikoshi K. 1997b. Molecular analyses of the sediment of the 11,000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles* 1:117-23

- Kato C., Li L., Nogi Y., Nakamura Y., Tamaoka J., Horikoshi K. 1998. Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1510-1513.
- Kato M., Hayashi R. 1999. Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1321-1328.
- Kato C., Horikoshi K. 1996. Gene expression under high pressure. In: R. Hayashi and C. Balny (Eds.): *High Pressure Bioscience and Biotechnology, Proceedings of the International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Kyoto, Japan; Elsevier Science B. V.
- Kato C., Qureshi M.H. 1999. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1):87-92.
- Kato C., Sato T., Horikoshi K. 1995. Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodiv. Conserv.* 4:1-9.
- Kawarai T., Wachi M., Ogino H., Furukawa S. 2004. SulA-independent filamentation of *Escherichia coli* during growth after release from high hydrostatic pressure treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:255-262.
- Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science.* 271(5251):990-3.
- Kilimann K.V. 2005. High Pressure Inactivation of Bacteria: Mathematical and Microbiological Aspects. Dissertation TU München
- Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F.K. 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5):1826-37.
- Kim Y.I., Levchenko I., Fraczkowska K., Woodruff R.V., Sauer R.T., Baker T.A. 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat. Struct. Biol.* 8(3):230-3.
- Kim B.H., Jang A., Lee S.O., Min J.S., Lee M. 2004. Combined effect of electronbeam (beta) irradiation and organic acids on shelf life of pork loins during cold storage. *Journal of Food Protection* 67:168-171.
- Kingsley D.H., Chen H., Hoover D.G. 2004. Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure. *Virus Res.* 102(2):221-224.
- Kirstein J., Zuhlke D., Gerth U., Turgay K., Hecker M. 2005. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J.* 24(19):3435-45.
- Kirstein J., Schlothauer T., Dougan D.A., Lilie H., Tischendorf G., Mogk A., Bukau B., Turgay K. 2006. Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J.* 25(7):1481-91.
- Kirstein J., Dougan D.A., Gerth U., Hecker M., Turgay K. 2007. The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *EMBO J.* 26(8):2061-70.
- Kline L., Sugihara T.F. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough Bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.* 21:459-465.
- Koch B., Kilstrup M., Vogensen F.K., Hammer K. 1998. Induced levels of heat shock proteins in a *danK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180(15):3873-81.
- Kohno K., Izumi H., Uchiumi T., Ashizuka M., Kuwano M. 2003. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays.* 25(7):691-8.

- Komine Y., Kitabatake M., Yokogawa T., Nishikawa K., Inokuchi H. 1994. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(20):9223-7.
- Korakli M., Rossmann A., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2001. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. J. Agric. Food Chem. 49(11):5194-5200.
- Korakli M., Gänzle M.G., Knorr R., Frank M., Rossmann A., Vogel R.F. 2002. Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* under high pressure: investigations using stable carbon isotopes. In: Hayashi, R. [ed.], Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology: pp.287-294.
- Korakli M., Pavlovic M., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2003. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. Appl. Environ. Microbiol. 69(4):2073-2079.
- Knorr D. 1993. Effects of high-hydrostatic pressure processes on food safety and quality. Food Technol. 47:156-161
- Knorr D. 1996. Advantages, opportunities and challenges of high hydrostatic pressure application to food systems. High Pressure Bioscience and Biotechnology pp.279-287.
- Knorr D., 1999. Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. Curr. Opin. Biotechnol. 10:485-491.
- Krebbers B., Matser A.M., Koets M., van den Berg R.W. 2002. Quality and storage-stability of high-pressure preserved green beans. Journal of Food Engineering 54:27-33.
- Krüger E., Volker U., Hecker M. 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. J. Bacteriol. 176(11):3360-7.
- Krüger E., Msadek T., Ohlmeier S., Hecker M. 1997. The *Bacillus subtilis clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. Microbiology. 143:1309-16.
- Krüger E., Hecker M. 1998. The first gene of the *Bacillus subtilis clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. J. Bacteriol. 180:6681-8.
- Krüger E., Witt E., Ohlmeier S., Hanschke R., Hecker M. 2000. The *clp* proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. J. Bacteriol. 182(11):3259-65.
- Krüger E., Zühlke D., Witt E., Ludwig H., Hecker, M. 2001. Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. The EMBO Journal 20:852-863.
- Kuipers O.P., de Ruyter P.G., Kleerebezem M., de Vos W.M. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. Trends Biotechnol. 15(4):135-40.
- Kunugi S. 1992. Enzyme reactions under high pressure and their applications. Annu. NY Acad. Sci. 672:293-304.
- Kuriki Y. 1990. A nucleotide sequence in the translation start signal region is involved in heat shock-induced translation arrest in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 264(1):121-4.
- Kwon H.Y., Kim S.W., Choi M.H., Ogunniyi A.D., Paton J.C., Park S.H., Pyo S.N., Rhee D.K. 2003. Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 71(7):3757-65.
- Kwon H.Y., Ogunniyi A.D., Choi M.H., Pyo S.N., Rhee D.K., Paton J.C. 2004. The ClpP protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge. Infect. Immun. 72(10):5646-53.
- Lacour S., Kolb A., Landini P. 2003. Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial sigmaS-RNA polymerase. J. Biol. Chem. 278(39):37160-8.

- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Landau J.V. 1967. Induction, transcription, and translation in *Escherichia coli*: a hydrostatic pressure study. *Biochim. Biophys. Acta* 149:506–512.
- Lanza M., Priamo W.L., Vladimir Oliveira J., Dariva C., de Oliveira D. 2004. The effect of temperature, pressure, exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO2. *Appl. Biochem. Biotech.* 113-116:181-7.
- Laport M.S., Lemos J.A., Bastos Md. Mdo. C., Burne R.A., Giambiagi-De Marval M. 2004. Transcriptional analysis of the *groE* and *dank* heat-shock operons of *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.* 155(4):252-8.
- Laport M.S., Dos Santos L.L., Lemos J.A., do Carmo F. Bastos M., Burne R.A., Giambiagi-Demarval M. 2006. Organization of heat shock *dank* and *groE* operons of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *Res. Microbiol.* 157(2):162-8.
- Laufen T., Mayer M.P., Beisel C., Klostermeier D., Mogk A., Reinstein J., Bukau B. 1999. Mechanism of regulation of *hsp70* chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(10):5452-7.
- Leistner L. 1978. Hurdle effect and energy saving. In: Downey, W. K. (Ed.), *Food Quality and Nutrition*, Applied Science Publishers, London, UK, pp.553-557.
- Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 5:181-186.
- Leistner L, Gould G.W. 2002. *Hurdle Technologies: Combination Treatment for Food Stability, Safety and Quality*. Series: Food Engineering Series. Springer Berlin (ISBN: 0-306-47263-5)
- Len A.C., Harty D.W., Jacques N.A. 2004. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology*. 150(5):1339-51.
- Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G. 1999a. Gene Expression and Regulatory Mechanisms. In: *Biology of the Prokaryotes* / edited by Joseph W. Lengeler, Gerhart Drews, Hans G. Schlegel. Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany pp.652-673. (ISBN: 3-13-108411-1).
- Liberek K., Marszalek J., Ang D., Georgopoulos C., Zylicz M. 1991. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88(7):2874-8.
- Lopez-Pedemonte T.J., Roig-Sagues A.X., Trujillo A.J., Capellas M., Guamis B. 2003. Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *J. Dairy Sci.* 86(10):3075-81.
- Lopilato J.E., Garwin J.L., Emr S.D., Silhavy T.J., Beckwith J.R. 1984. D-ribose metabolism in *Escherichia coli* K-12: genetics, regulation, and transport. *J. Bacteriol.* 158(2):665-73.
- Ludwig H., Bieler C., Hallbauer K., Scigalla W. 1992. Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. In: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. [eds.]. *High Pressure and Biotechnology* 224:25-32.
- Luthman M., Holmgren A. 1982. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* 21:6628-6633.
- Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72:107-113.

- Maj M.C., Gupta R.S. 2001. The effect of inorganic phosphate on the activity of bacterial ribokinase. *J. Protein Chem.* 20(2):139-44.
- Malone A.S., Shellhammer T.H., Courtney P.D. 2002. Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4357-4363.
- Manas P., Mackey B.M. 2004. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1545-1554.
- Margosch D., Ehrmann M.A., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2004a. Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *J. Food Prot.* 67(11):2530-2537.
- Margosch D., Gänzle M.G., Ehrmann M.A., Vogel R.F. 2004b. Pressure Inactivation of Bacillus Endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):7321-7328.
- Marquis R.E., Bender G.R. 1980. Isolation of a variant of *Streptococcus faecalis* with enhanced barotolerance. *Can. J. Microbiol.* 26:371-376.
- Marquis R.E., Bender G.R. 1987. Barophysiology of Prokaryotes and Proton-translocating ATPases. Academic Press, London, pp.65-73.
- Martin D.D., Bartlett D.H., Roberts M.F. 2002. Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. *Extremophiles.* 6(6):507-14.
- Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E.G.R., Michiels C.W. 2001a. Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:339-344.
- Masschalck B., Van Houdt R., Michiels C.W. 2001b. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 64:325-332.
- Masson P., Clery C. 1996. Pressure-induced molten globule states of proteins. In: R. Hayashi and C. Balny (eds.), *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier pp.117-126.
- Masson P., Tonello C., Balny C., 2001. High pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J. Biomed. Biotech.* 2:85-88.
- Matsumura P., Marquis R.E. 1978. Microbial life under pressure. In: D.J. Kushner (Ed.), *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press, London, pp.105-158.
- Matsumura P., Marquis R.E. 1977. Energetics of Streptococcal growth inhibition by hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:885-892.
- Maurizi M.R., Clark W.P., Kim S.H., Gottesman S. 1990. ClpP represents a unique family of serine proteases. *J. Biol. Chem.* 265:12546-12552.
- Maurizi M.R., Xia D. 2004. Protein binding and disruption by Clp/Hsp100 chaperones. *Structure* 12(2):175-83.
- Mayer M.P., Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(6):670-84.
- Mayo B., Derzelle S., Fernandez M., Leonard C., Ferain T., Hols P., Suarez J.E., Delcour J. 1997. Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 179(9):3039-42.

- McClements J.M., Patterson M.F., Linton M. 2001. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J. Food Prot.* 64(4):514-22.
- McCracken A., Timms P. 1999. Efficiency of transcription from promoter sequence variants in *Lactobacillus* is both strain and context dependent. *J. Bacteriol.* 181(20):6569-72.
- McCracken A., Turner M.S., Giffard P., Hafner L.M., Timms P. 2000. Analysis of promoter sequences from *Lactobacillus* and *Lactococcus* and their activity in several *Lactobacillus* species. *Arch. Microbiol.* 173(5-6):383-9.
- Meile L., Rohr L.M., Geissmann T.A., Herensperger M., Teuber M. 2001. Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (*xfp*) from *Bifidobacterium lactis*. *J. Bacteriol.* 183(9):2929-36.
- Meinkoth J., Wahl G. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138:267-284.
- Mentre P., Hamraoui L., Hui B.H., Debey P. 1999. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cell. Mol. Biol.* 45:353-362.
- Miller J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mills G., Earnshaw R., Patterson M.F. 1998. Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. *Lett. Appl. Microbiol.* 26(3):227-230
- Mizanur R.M., Takata G., Izumori K. 2001. Cloning and characterization of a novel gene encoding L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. strain DL-28 in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1521(1-3):141-5.
- Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rudiger S., Roder D., Langen H., Bukau B. 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* 18(24):6934-49.
- Mogk A., Schlieker C., Strub C., Rist W., Weibezahn J., Bukau B. 2003. Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *J. Biol. Chem.* 278(20):17615-24.
- Molina-Gutierrez A., Stipl V., Delgado A., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2002. In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4399-4406.
- Molina-Höppner A., Sato T., Kato C., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2003. Effects of pressure on cell morphology and cell division of lactic acid bacteria. *Extremophiles* 7:511-516.
- Molina-Höppner A., Doster W., Vogel R.F., Gänzle M.G. 2004. Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high pressure treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2013-2020.
- Moore E.C., Reichard P., Thelander L. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239:3445-3452.
- Morgan S.M., Ross R.P., Beresford T., Hill C. 2000. Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* 88(3):414-20.
- Morild E. 1981. The theory of pressure effects on enzymes. *Adv. Protein Chem.* 34:93-166.
- Mozhaev V.V., Heremans K., Frank J., Masson P., Balny C. 1994. Exploiting the Effects of High Hydrostatic-Pressure in Biotechnological Applications. *Trends in Biotechnology* 12:493-501.

- Nair S., Derre I., Msadek T., Gaillot O., Berche P. 2000. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35:800-11.
- Nakashima K., Horikoshi K., Mizuno T. 1995. Effect of Hydrostatic Pressure on the Synthesis of Outer Membrane Proteins in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(1):130-132.
- Nakasone K., Ikegami A., Kawano H., Kato C., Usami R., Horikoshi K. 1998. Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms. *Extremophiles* 2:149-154.
- Nakasone K., Ikegami A., Kawano H., Kato C., Usami R., Horikoshi K. 2002. Transcriptional regulation under pressure conditions by RNA polymerase sigma54 factor with a two-component regulatory system in *Shewanella violacea*. *Extremophiles* 6(2):89-95.
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Schaechter, M. 1990. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.
- Noma S, Hayakawa I. 2002. Barotolerance of *Staphylococcus aureus* is increased by incubation at below 0 degrees C prior to hydrostatic pressure treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 80(3):261-4.
- Nomura M., Gourse R., Baughman G. 1984. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* 53:75-117.
- Novitsky Morita R.Y. 1978. Starvation-induced barotolerance as a survival mechanism of a psychrophilic marine *Vibrio* in the waters of the Atlantic convergence. *Mar. Biol.* 49:7-10.
- Obuchi K., Iwahashi H., Kaul S.C., Uedaira H., Ishimura M., Komatsu Y. 1992. Heat shock response of yeast confers high pressure tolerance structural modification of membrane. In: Balny C., Hayashi R., Heremans K., Masson P. (eds.). *High Pressure and Biotechnology*. 224:77-81.
- Odani M., Shimizu H., Komatsu Y., Iwahashi H. 2002. Responses of growing yeast cells in the hydrostatic pressure status monitoring by DNA microarray. In: Hayashi, R. (ed.). *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*: pp.247-252.
- Ogawa H., Fukuhisa K., Kubo Y., Fukumoto H. 1990. Pressure inactivation of yeast, molds, and pectinesterase in satsuma mandarin juice: effect of juice concentration, pH and organic acids and comparison with heat sanitation. *Agric. Biol. Chem.* 54:1219-1255.
- O'Reilly C.E., O'Connor P.M., Kelly A.L., Beresford T.P., Murphy P.M. 2000. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11):4890-4896.
- Pagan R., Mackey B. 2000. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2829-2834.
- Pagan R., Jordan S., Benito A., Mackey B. 2001. Enhanced acid sensitivity of pressure damaged *Escherichia coli* O157 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1983-1985.
- Pak M., Hoskins J.R., Singh S.K., Maurizi M.R., Wickner S. 1999. Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. *J. Biol. Chem.* 274(27):19316-22.
- Palhano F.L., Gomes H.L., Orlando M.T., Kurtenbach E., Fernandes P.M. 2004a. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. *Cell. Mol. Biol.* 50(4):447-57.

- Palhano F.L., Orlando M.T., Fernandes P.M. 2004b. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 233(1):139-45.
- Pan Q., Garsin D.A., Losick R. 2001. Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *B. subtilis*. Mol. Cell. 8(4):873-883.
- Pan Q., Losick R. 2003. Unique degradation signal for ClpCP in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 185(17):5275-8.
- Pande C., Wishnia A. 1986. Pressure Dependence of Equilibria and Kinetics of *Escherichia coli* Ribosomal Subunit Association. J. Biol. Chem. 261:6272-6278.
- Patterson M.F., Quinn M., Simpson R., Gilmour A. 1995. Sensitivity of Vegetative Pathogens to High Hydrostatic Pressure Treatment in Phosphate-Buffered Saline and Foods. J. Food Protect. 58(5):524-529.
- Patterson M.F. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. J. Appl. Microbiol. 98(6):1400-1409.
- Parish M.E. 1997. High pressure effects on quality of chilled orange juice. In: K.Heremans (ed.). High pressure research in the biosciences and biotechnology. University Press Leuven, Leuven, Belgium. pp443-446.
- Pavlovic, M. 2006. Dissertation: Genexpression und -regulation bei *Lactobacillus sanfranciscensis* unter subletalem Hochdruck. Technische Universität München, Germany
- Penniston J.T. 1971. High hydrostatic pressure and enzymic activity: inhibition of multimeric enzymes by dissociation. Arch. Biochem. Biophys. 142:322-332.
- Perez-Martin J., Rojo F., de Lorenzo V. 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. Microbiol. Rev. 58(2):268-90.
- Perrier-Cornet J.M., Tapin S., Gaeta S., Gervais P. 2005. High-pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* at subzero temperatures. J. Biotechnol. 115(4):405-12.
- Pope D.M., Berger L.R. 1973. Inhibition of metabolism by hydrostatic pressure: what limits microbial growth? Arch. Microbiol. 93:367-370.
- Porankiewicz J., Wang J., Clarke A.K. 1999. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. Mol. Microbiol. 32(3):449-58.
- Port M., Abend M., Romer B., Van Beuningen D. 2003. Influence of high-frequency electromagnetic fields on different modes of cell death and gene expression. Int. J. Rad. Biol. 79:701-708.
- Posno M., Leer R.J., van Luijk N., van Giezen M.J.F., Heuvelmans P.T.H.M., Lokman B.C., Pouwels P.H. 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. Appl. Environ. Microbiol. 57:1822-1828.
- Posthuma C.C., Bader R., Engelmann R., Postma P.W., Hengstenberg W., Pouwels P.H. 2002. Expression of the xylulose 5-phosphate phosphoketolase gene, *xpkA*, from *Lactobacillus pentosus* MD363 is induced by sugars that are fermented via the phosphoketolase pathway and is repressed by glucose mediated by CcpA and the mannose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. Appl. Environ. Microbiol. 68(2):831-7.
- Price C.W., Fawcett P., Ceremonie H., Su N., Murphy C.K., Youngman P. 2001. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 41(4):757-74.
- Qureshi M.H., Kato C., Horikoshi K. 1998a. Purification of a ccb-type quinol oxidase specifically induced in a deep-sea barophilic bacterium, *Shewanella* sp. strain DB-172F. Extremophiles 2:93-99.

- Qureshi M.H., Kato C., Horikoshi K. 1998b. Purification of two pressure-regulated c-type cytochromes from a deep-sea barophilic bacterium, *Shewanella* sp. strain DB-172F. FEMS Microbiol. Lett. 161:301-309.
- Rangarajan E.S., Sivaraman J., Matte A., Cygler M. 2002. Crystal structure of D-ribose-5-phosphate isomerase (RpiA) from *Escherichia coli*. Proteins. 48(4):737-40.
- Reuter R., Naumann M., Bar J., Miosga T., Kopperschlager G. 1998. Ribose-5-phosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: purification and molecular analysis of the enzyme. Bioseparation. 7(2):107-15.
- Rince A., Flahaut S., Auffray Y. 2000. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. Int. J. Food Microbiol. 55(1-3):87-91.
- Ritz M., Jugiau F., Rama F., Courcoux P. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. Food Microbiol. 17:375-382.
- Robertson G.T., Ng W.L., Foley J., Gilmour R., Winkler M.E. 2002. Global transcriptional analysis of *clpP* mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence. J Bacteriol. 184(13):3508-20.
- Robertson G.T., Ng W.L., Gilmour R., Winkler M.E. 2003. Essentiality of *clpX*, but not *clpP*, *clpL*, *clpC*, or *clpE*, in *Streptococcus pneumoniae* R6. J. Bacteriol. 185(9):2961-6.
- Robey M., Benito A., Hutson R.H., Pascual C., Park S.F., Mackey B.M. 2001. Variation in resistance to high hydrostatic pressure and *rpoS* heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 67:4901-4907.
- Rodriguez E., Arques J.L., Nunez M., Gaya P., Medina M. 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. Appl. Environ. Microbiol. 71(7):3399-404.
- Rollenhagen C., Antelmann H., Kirstein J., Delumeau O., Hecker M., Yudkin M.D. 2003. Binding of sigma(A) and sigma(B) to core RNA polymerase after environmental stress in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 185(1):35-40.
- Rosen R., Biran D., Gur E., Becher D., Hecker M., Ron E.Z. 2002. Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. FEMS Microbiol. Lett. 207(1):9-12.
- Ross W., Gosink K.K., Salomon J., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R.L. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. Science. 262(5138):1407-13.
- Ross A.I., Griffiths M.W., Mittal G.S., Deeth H.C. 2003. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 89:125-138.
- Rouquette C., Ripio M.T., Pellegrini E., Bolla J.M., Tascon R.I., Vazquez-Boland J.A., Berche P. 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 21:977-87.
- Rud I., Jensen P.R., Naterstad K., Axelsson L. 2006. A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. Microbiology. 152(4):1011-9.
- Russel N.J., Evans R.I., ter Stee, P.F., Hellemons J., Verheul A., Abee T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. Int. J. Food Microbiol. 28:255-261.
- Sancho F., Lambert Y., Demazeau G., Largeteau A. 1999. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. J. Food Engineering 39:247-253.

- Sanders J.W., Venema G., Kok, J. 1999. Environmental stress response in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiological Reviews 23:483–501.
- San Martin M.F., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42:627-645.
- Sale J.H., Gould G.W., Hamilton W.A. 1970. Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. J. Gen. Microbiol. 60:323-334.
- Sato T., Kato C., Horikoshi K. 1995. Effect of high pressure on gene expression by *lac* and *tac* promoters in *Escherichia coli*. J. Mar. Biotechnol. 3:89-92.
- Sato T., Nakamura Y., Nakashima K.K., Kato C., Horikoshi K. 1996. High pressure represses expression of the *malB* operon in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 135:111-116.
- Sato T., Miwa T., Ishii A., Wachi M., Nagai K., Aizawa M., Horikoshi K. 2002. The dynamism of *Escherichia coli* under high hydrostatic pressure - repression of the FtsZ-ring formation and chromosomal DNA condensation. In: Hayashi R. (ed.). Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology. pp.233-238.
- Savli H., Karadenizli A., Kolayli F., Gundes S., Ozbek U., Vahaboglu H. 2003. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. J. Med. Microbiol. 52(5):403-8.
- Scheyhing C. 2002. Dissertation: Hochdruckinduzierte Genexpression bei Bakterien. Technische Universität München, Germany
- Scheyhing C., Hörmann S., Vogel R., Ehrmann M.A. 2004. Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451. Lett. Appl. Microbiol. 39:284-289.
- Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. Trends Biochem. Sci. 21(8):289-96
- Schlothauer T., Mogk A., Dougan D.A., Bukau B., Turgay K. 2003. MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(5):2306-11.
- Schmidt G., Zink R. 2000. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. Int. J. Food Microbiol. 55(1-3):41-5.
- Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J. Biochem. Biophys. Methods. 46(1-2):69-81.
- Schulz E., Lüdemann H.-D., Jaenicke R. 1976. High pressure equilibrium studies on the dissociation-association of *Escherichia coli* ribosomes. FEBS Lett. 64:40-43.
- Schulz A., Tzschaschel B., Schumann W. 1995. Isolation and analysis of mutants of the *dnaK* operon of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 15(3):421-429.
- Schumacher M.A., Scott D.M., Mathews I.I., Ealick S.E., Roos D.S., Ullman B., Brennan R.G. 2000. Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. J. Mol. Biol. 296(2):549-567.
- Schwarz J.R., Landau J.V. 1972a. Hydrostatic Pressure Effects on *Escherichia coli*: Site of Inhibition of Protein Synthesis. J. Bacteriol. 109:945-948.
- Schwarz J.R., Landau J.V. 1972b. Inhibition of cell-free protein synthesis by hydrostatic pressure. J. Bacteriol. 112:1222-1227.

- Segal R., Ron E.Z. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *danK* operons in Eubacteria. FEMS Microbiol. Lett. 138(1):1-10.
- Senorans J., Ibanez E., Cifuentes A. 2003. New trends in food processing. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 43:507-526.
- Sigrell J.A., Cameron A.D., Jones T.A., Mowbray S.L. 1997. Purification, characterization, and crystallization of *Escherichia coli* ribokinase. Protein Sci. 6(11):2474-6.
- Sigrell J.A., Cameron A.D., Mowbray S.L. 1999. Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. Structure 15(2):183-193.
- Sigrell J.A., Cameron A.D., Jones T.A., Mowbray S.L. Induced fit on sugar binding activates ribokinase. J. Mol. Biol. 290(5):1009-1018.
- Silva J.F., Foguel D., Da Poian A.T., Prevelige P.E. 1996. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. Current Opin. Struct. Biol. 6:166-175.
- Silva C.C., Giongo V., Simpson A.J., Camargos E.R., Silva J.L., Koury M.C. 2001. Effects of hydrostatic pressure on the *Leptospira interrogans*: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar hardjo. Vaccine. 19(11-12):1511-1514.
- Singh S.K., Grimaud R., Hoskins J.R., Wickner S., Maurizi M.R. 2000. Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(16):8898-903.
- Skinner A.J., Cooper R.A. 1971. The regulation of ribose-5-phosphate isomerisation in *Escherichia coli* K12. FEBS Lett. 12(5):293-296.
- Skinner A.J., Cooper R.A. 1974. Genetic studies on ribose 5-phosphate isomerase mutants of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 118(3):1183-5.
- Skinner M.M., Trempy J.E. 2001. Expression of *clpX*, an ATPase subunit of the Clp protease, is heat and cold shock inducible in *Lactococcus lactis*. J. Dairy Sci. 84(8):1783-5.
- Skorupski K., Taylor R.K. 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. Mol. Microbiol. 25:1003-1009.
- Small P., Blankenhorn D., Welty D., Zinser E., Slonczewski J.L. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. J. Bacteriol. 176(6):1729-37.
- Smeds A., Varmanen P., Palva A. 1998. Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. J. Bacteriol. 180(23):6148-53.
- Smelt J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends Food Sci. Technol. 9:152-158.
- Smith W., Pope D., Landau J.V. 1975. Role of bacterial ribosome subunits in barotolerance. J. Bacteriol. 112:582-584
- Somero G.N. 1992. Adaptations to high hydrostatic pressure. Annu. Rev. Physiol. 54:557-577.
- Sorensen K.I., Hove-Jensen B. 1996. Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. J. Bacteriol. 178(4):1003-1011.
- Spano G., Chiappa G., Beneduce L., Massa S. 2004. Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. J. Appl. Microbiol. 96(1):185-93.

- Spano G., Rinaldi A., Ugliano M., Moio L., Beneduce L., Massa S. 2005. A beta-glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J. Appl. Microbiol.* 98(4):855-61.
- Sprenger G.A. 1995. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* 164(5):324-30.
- Stoschek C.M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology.* 182:50-89.
- Suggs S.V., Hirose T., Miyake T., Kawashima E.H., Johnson M.J., Itakura K., Wallace R.B. 1981. Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences ICN-UCLA Symp. *Mol. Dev. Biol.* 23:683.
- Suokko A., Savijoki K., Malinen E., Palva A., Varmanen P. 2005. Characterization of a mobile *clpL* gene from *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):2061-9.
- Szewzyk U., Szewzyk R., Stenström T.A. 1994. Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1810-1813.
- Takahashi K., Ishii H., Ishikawa H. 1993. Sterilization of bacteria and yeast by hydrostatic pressurization at low temperature: effect of temperature, pH and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids. In: Havashi. R. San-Ei Pub. Co. (ed.). *High Pressure Bioscience and Food Science.* Kyoto. pp.244-249.
- Takahashi K., Kubo T., Arai Y., Hirasawa Y., Imanishi J., Kobayashi K., Takigawa. 1996. Influence of hydrostatic pressure on expression of heat shock protein 70 and matrix synthesis in chondrocytes. In: Hayashi, R., Balny, C. (eds.). *High Pressure Bioscience and Biotechnology* 13:79-82.
- Takami H., Inoue A., Fuji F., Horikoshi K. 1997. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol. Lett.* 152(2):279-285.
- Tamegai H., Kato C., Horikoshi K. 1998. Pressure-Regulated Respiratory System in Barotolerant Bacterium, *Shewanella* sp. Strain DSS12. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 1:213-220.
- Tamegai H., Kawano H., Ishii A., Chikuma S., Nakasone K., Kato C. 2005. Pressure-regulated biosynthesis of cytochrome bd in piezo- and psychrophilic deep-sea bacterium *Shewanella violacea* DSS12. *Extremophiles* 9(3):247-53.
- Tamura K., Miyashita M., Iwahashi H. 1998. Stress tolerance of pressure-shocked *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 20:1167-1169.
- Tanaka T., Burgess J.G., Wright P.C. 2001. High-pressure adaptation by salt stress in a moderately halophilic bacterium obtained from open seawater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:200-204.
- Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75(2-3):291-5.
- Tonello C., Kesenne S., Muterel C., Jolibert F. 1997. Effect of high hydrostatic pressure treatments on shelf-life of different fruit products, pp 439-442. In: K.Heremans (ed.). *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology.* University Press Leuven, Leuven, Belgium. pp.439-442.
- Tonon T., Bourdineaud J.P., Lonvaud-Funel A. 2001. The arcABC gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol.* 152(7):653-61.
- Tu le N., Jeong H.Y., Kwon H.Y., Ogunniyi A.D., Paton J.C., Pyo S.N., Rhee D.K. 2007. Modulation of adherence, invasion, and tumor necrosis factor alpha secretion during the early stages of infection by *Streptococcus pneumoniae* ClpL. *Infect. Immun.* 75(6):2996-3005

- Turgay K., Persuh M., Hahn J., Dubnau D. 2001. Roles of the two ClpC ATP binding sites in the regulation of competence and the stress response. *Mol. Microbiol.* 42(3):717-27.
- Ulmer H.M., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2000. High pressure effects on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW 1.460. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3966-3973.
- Ulmer H.M., Heinz V., Gänzle M.G., Knorr D., Vogel R.F. 2002a. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *J. Appl. Microbiol.* 93:326-335.
- Ulmer H.M., Herberhold H., Fahsel S., Gänzle M.G., Winter R., Vogel R.F. 2002b. Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1088-1095.
- VanBogelen R.A., Neidhardt F.C. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5589-5593.
- Vandecasteele S.J., Peetermans W.E., Merckx R., Van Eldere J. 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J. Bacteriol.* 183(24):7094-101.
- Vandecasteele S.J., Peetermans W.E., Merckx R., Van Ranst M., Van Eldere J. 2002. Use of gDNA as internal standard for gene expression in staphylococci in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291(3):528-34.
- Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., Maguin, E. 2002. Stress response in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 82(1-4):187-216.
- Van Opstal I., Vanmuysen S.C., Michiels C.W. 2003. High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *Int. J. Food Microbiol.* 88:1-9.
- Van Opstal I., Bagamboula C.F., Vanmuysen S.C., Wuytack E.Y., Michiels C.W. 2004. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.* 92(2):227-34.
- Van Schaik W., Zwietering M.H., de Vos W.M., Abee T. 2004. Identification of sigmaB-dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and in vitro transcription analysis. *J. Bacteriol.* 186(13):4100-9.
- Van Schaik W., Tempelaars M.H., Wouters J.A., de Vos W.M., Abee T. 2004. The alternative sigma factor sigmaB of *Bacillus cereus*: response to stress and role in heat adaptation. *J. Bacteriol.* 186(2):316-25.
- Varcamonti M., Arsenijevic S., Martirani L., Fusco D., Naclerio G., De Felice M. 2006. Expression of the heat shock gene *clpL* of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock. *Microb. Cell Fact.* 15;5:6.
- Varmanen P., Ingmer H., Vogensen F.K. 2000. CtsR of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology* 146:1447-1455.
- Ventura M., Zink R., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. 2005. Gene structure and transcriptional organization of the *danK* operon of *Bifidobacterium breve* UCC 2003 and application of the operon in bifidobacterial tracing. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1):487-500.
- Vermeulen N., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2005. Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T during growth in sourdough. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10):6260-6266.

- Vezi A., Campanaro S., D'Angelo M., Simonato F., Vitulo N., Lauro F. M., Cestaro A., Malacrida G., Simionati B., Cannata N., Romualdi C., Bartlett D.H., Valle G. 2005. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* 307(5714):1459-61.
- Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* 23:369-374.
- Walker D.C., Girgis H.S., Klaenhammer T.R. 1999. The *groESL* chaperone operon of *Lactobacillus johnsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7):3033-3041.
- Wall T., Bath K., Britton R. A., Jonsson H., Versalovic J., Roos S. 2007. The Early Response to Acid Shock in *Lactobacillus reuteri* Involves the ClpL Chaperone and a Putative Cell Wall-Altering Esterase. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(12):3924-35.
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Humphery-Smith I. 1995. Progress with gene-product mapping of Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16(7):1090-1094.
- Welch T.J., Bartlett D.H. 1996. Isolation and Characterization of the Structural Gene for OmpL, a Pressure-Regulated Porin-Like Protein from the Deep-Sea Bacterium *Photobacterium* species Strain SS9. *J. Bacteriol.* 178:5027-5031.
- Welch T.J., Bartlett D.H. 1998. Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Mol. Microbiol.* 27:977-985.
- Welch T.J., Farewell A., Neidhardt F.C., Bartlett D.H. 1993. Stress Response of *Escherichia coli* to Elevated Hydrostatic Pressure. *J. Bacteriol.* 175:7170-7177.
- Wemekamp-Kamphuis H.H., Karatzas A.K., Wouters J.A., Abee T. 2002. Enhanced Levels of Cold Shock Proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon Exposure to Low Temperature and High Hydrostatic Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:456-463.
- Whitaker R.D., Batt C.A. 1991. Characterization of the Heat Shock Response in *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(5):1408-1412.
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.
- Wickner S., Gottesman S., Skowyra D., Hoskins J. 1994. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12218-12222.
- Wiegert T., Schumann W. 2001. SsrA-mediated tagging in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 183(13):3885-9.
- Williams C.H Jr. 2000. Thioredoxin - thioredoxin reductase - a system that has come of age. *Eur. J. Biochem.* 267:6101-6101.
- Williams C.H. Jr, Arscott L.D., Müller S., Lennon B.W., Ludwig M.L., Wang P.-F., Veine D.M., Becker K., Schirmer R.H. 2000. Thioredoxin reductase - two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* 267:6110-6117.
- Williams K.P. 2002. The tmRNA Website: invasion by an intron. *Nucleic Acids Res.* 30(1):179-82.
- Wirsen C.O., Jannasch H.W., Wakeham S.G., Canuel E.A. 1987. Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Curr. Microbiol.* 14:319-322.
- Withey J.H., Friedman D.I. 2002. The biological roles of trans-translation. *Curr. Opin. Microbiol.* 5(2):154-9.
- Wood T. 1970. Spectrophotometric assay for D-ribose-5-phosphateketol-isomerase and for D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase. *Anal. Biochem.* 33(2):297-306.

- Wösten M.M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22(3):127-50.
- Wouters P.C., Glaasker E., Smelt J.P.P.M. 1998. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:509-514.
- Wuytack E.Y., Michiels C.W. 2001. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *Int. J. Food Microbiol.* 64(3):333-41.
- Wuytack E.Y., Phuong L.D., Aertsen A., Reyns K.M., Marquenie D., De Ketelaere B., Masschalck B., Van Opstal I., Diels A.M., Michiels C.W. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Prot.* 66:31-37.
- Xiong R., Xie G., Edmondson A.E., Sheard M.A. 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 46:45-55.
- Yano Y., Nakayama A., Yoshida K. 1997. Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2572-2577.
- Yayanos A.A., Pollard E.C. 1969. A study on the effects of hydrostatic pressure on macromolecule synthesis in *Escherichia coli*. *Biophysical J.* 9:1464-1482.
- Yayanos A.A. 1995. Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:777-805.
- Yayanos A.A., Dietz A.S., Van Boxtel R. 1979. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* 205:808-810.
- Yayanos A.A., DeLong E.F. 1987. Deep-sea bacterial fitness to environmental temperatures and pressures. In: H.W. Jannasch, R.E. Marquis, A.M. Zimmerman (eds.). *Current Perspectives in High Pressure Biology*, Academic Press, Toronto. pp.17-32.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Mazhul' M.M., Manukhov I.V. 2002. Role of Hsp70 (DnaK-DnaJ-GrpE) and Hsp100 (ClpA and ClpB) chaperones in refolding and increased thermal stability of bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry* 67(9):986-92.
- Zhang R., Andersson C.E., Savchenko A., Skarina T., Evdokimova E., Beasley S., Arrowsmith C.H., Edwards A.M., Joachimiak A., Mowbray S.L. 2003. Structure of *Escherichia coli* ribose-5-phosphate isomerase: a ubiquitous enzyme of the pentose phosphate pathway and the Calvin cycle. *Structure.* 11(1):31-42.
- ZoBell C.E., Johnson F.H. 1949. The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacteriol.* 57:179-189.
- Zietkiewicz S., Krzewska J., Liberek K. 2004. Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J. Biol. Chem.* 279(43):44376-83.
- ZoBell C.E., Morita R.Y. 1957. Barophilic bacteria in some deep-sea sediments. *J. Bacteriol.* 73:563-8
- ZoBell C.E., Cobet A.B. 1962. Growth, reproduction and death rates of *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J. Bacteriol.* 84:1228-1236.
- ZoBell C.E., Cobet A.B. 1963. Filament formation by *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J. Bacteriol.* 87:710-719.
- ZoBell C.E. 1970. Pressure effects on morphology and life processes of bacteria. In: A. Zimmermann (ed.). *High Pressure Effects on Cellular Processes*, Academic Press, London. pp.85-130.
- Zuber U., Schumann W. 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *danK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176(5):1359-63.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die dem Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Hochdruckinduzierte Stressantwort bei *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T“

am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie unter der Anleitung und Betreuung durch Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- (x) Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- () Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät für hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.

- (x) Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- () Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter Vorlage einer Dissertation mit dem Themadie Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den

.....

Unterschrift

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 28.09.1975

Geburtsort: Fürstenfeldbruck

Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1982-1985 Grundschule in Fürstenfeldbruck

1985-1986 Grundschule in Utting am Ammersee

1986-1995 Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien (Allgemeine Hochschulreife)

WEHRDIENST

1995-1996 Luftwaffen-Kfz-Transportstaffel 31 in Landsberg am Lech

STUDIUM

1996-2001 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

2001-2002 Diplomarbeit bei der Sandoz GmbH in Kundl / Tirol (Novartis);
„Reporter-Genfusionen im Erythromycin-Produzenten *S. erythraea*“

BERUFSERFAHRUNG

2002–2002 Anbics Laboratories AG München
Diplom-Mikrobiologe in R&D: „Antibiotika produzierende Streptomyceten“

2002-2005 Wissenschaftlich Angestellter zur Promotion am Institut für Technische Mikrobiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München (TUM)

Seit Januar 2006 Leitung mikrobiologische Qualitätskontrolle bei der Intervet International GmbH (a member of Schering-Plough) in Unterschleißheim

QUALIFIKATIONEN

- Projektleiter und Beauftragter für die biologische Sicherheit nach §§ 15 und 17 GenTSV
- Zusatzqualifikation für technische Führungskräfte: „BWL für Nicht-Kaufleute“
- Erlaubnis für Tätigkeiten mit Krankheitserregern nach § 44 Infektionsschutzgesetz - IfSG bzw. § 2 Tierseuchenerregerverordnung (TierSEV)
- Teilnahme an zahlreichen Seminaren und Konferenzen zur pharmazeutischen Mikrobiologie