

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

Hochdruckinduzierte Genexpression bei Bakterien

Carsten Heiko Scheyhing

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

DOKTOR-INGENIEURS

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. W. Back
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. R.F. Vogel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. J. Hinrichs, Universität Hohenheim

Die Dissertation wurde am 5. November 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 5. Dezember 2002 angenommen.

Wenn das Leben keine Vision hat,
nach der man strebt,
nach der man sich sehnt,
die man verwirklichen möchte,
dann gibt es auch kein Motiv,
sich anzustrengen.

Erich Fromm

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel von Februar 1999 bis Juni 2002 angefertigt und durch die Förderungen folgender Institutionen ermöglicht: Deutsche Forschungsgesellschaft DFG (EH 176/3-1 und FOR 358/1), Europäische Union (COST D10 „Chemistry under extreme conditions“), Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Vogel für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung der Dissertation bedanken. Herrn Prof. Hinrichs möchte ich für die Übernahme des Korreferats und Herrn Prof. Back für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission meinen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Schlapschy, Herrn Stocker und Herrn Prof. Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TUM), Herrn Boguth, Herrn Drews, Herrn Weiss und Frau Prof. Görg (FG Proteomik, TUM), Herrn Prof. Bengsch (CNRS, Orleans), Herrn Stippl und Herrn Prof. Delgado (Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozessautomation, TUM), Frau Rademacher und Herrn Prof. Kulozik (Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TUM), sowie Frau von Rad (Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF) für die Unterstützung bei einer Vielzahl fachlicher und versuchstechnischer Fragestellungen.

Herrn Meersman und Herrn Prof. Heremans (Chemiedepartment der Katholischen Universität Löwen, Belgien) möchte ich für die Betreuung und überaus kollegiale Zusammenarbeit bei der Untersuchung verschiedener GFPs danken.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Frau Bidle, Herrn Allen und Herrn Prof. Bartlett (Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego). Der Forschungsaufenthalt an diesem Institut wird mir nicht nur wegen der wissenschaftlichen Erkenntnisse und aufgrund der freundschaftlichen Atmosphäre in guter Erinnerung bleiben.

Meinem Betreuer Herrn Ehrmann möchte ich meinen Dank für seine fachlich kompetente und freundschaftliche Betreuung aussprechen, ebenso wie allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Zu guter Letzt möchte ich noch ganz besonders meinen Eltern und meiner Freundin Martina für die moralische Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung.....	1
1.1 Biochemische Prozesse unter Hochdruck.....	2
1.1.1 Wirkung von Hochdruck auf Proteine.....	4
1.1.2 Wirkung von Hochdruck auf Lipide und Membranen	6
1.2 Wirkung hoher Drücke auf Organismen und ihre Proteinbiosynthese.....	6
1.2.1 Druckinduzierte Änderung der Proteinbiosynthese bei Tiefseebakterien	9
1.2.2 Druckinduzierte Änderung der Proteinbiosynthese bei barosensitiven Bakterien .	11
1.2.3 Druckeinfluß bei extremophilen, nicht aus der Tiefsee isolierten Bakterien	13
1.2.4 Hochdruckinduzierte Genexpression bei Eukaryonten	13
1.3 Kreuzresistenzen im Zusammenhang mit Hochdruck.....	15
1.4 Green Fluorescent Protein (GFP).....	16
1.5 Aufgabenstellung.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Mikroorganismen und Plasmide.....	20
2.2 Bezugsquellen.....	21
2.3 Nährmedien und Zusätze	22
2.3.1 Nährmedien	22
2.3.2 Zusatzstoffe für Selektionsmedien	23
2.4 Anzucht und Stammhaltung	24
2.4.1 Anzucht und Zellernte	24
2.4.2 Stammhaltung.....	24
2.5 Messung des Bakterienwachstums	25
2.5.1 Messung der optischen Dichte.....	25
2.5.2 Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten.....	25
2.6 Bakterienkultivierung bei Streßexperimenten	26
2.6.1 Hochdruckbehandlung.....	26
2.6.2 Temperaturstreß.....	26
2.6.3 Salzstreß.....	26
2.6.4 pH-Streß.....	27
2.7 Messung der Fluoreszenz	27

2.8	Reinigung fluoreszierender Proteine	27
2.8.1	Reinigung von wtGFP und red shift Mutanten.....	27
2.8.2	Reinigung von DsRed mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie	30
2.9	Probenaufbereitung für die 2D-Gelelektrophorese.....	32
2.10	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
2.10.1	Coomassie Blue Protein Assay [BRADFORD, 1976]	33
2.10.2	Absorption bei 280 nm [nach STOSCHEK, 1990]	33
2.11	FTIR-Spektroskopie	33
2.12	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	35
2.13	Auftrennung von Proteinen mittels zweidimensionaler Elektrophorese	36
2.13.1	Isoelektrische Fokussierung	36
2.13.2	Äquilibrierung	38
2.13.3	SDS-PAGE zur Trennung in der zweiten Dimension	39
2.14	Proteinfärbungen in Polyacrylamidgelen	41
2.14.1	Coomassie-Färbung	41
2.14.2	Färbung mit Ponceaurot.....	42
2.14.3	Silberfärbung [BLUM <i>et al.</i> , 1987; (mod.)]	42
2.15	Interne Sequenzierung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen	44
2.16	Detektion von GFP mittels Western Blotting.....	44
2.17	Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNS [MARMUR, 1961 (mod.)].....	47
2.18	Isolierung von Gesamt-RNS.....	49
2.19	Plasmidisolierung	50
2.20	Agarosegelelektrophorese	50
2.21	Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren.....	51
2.21.1	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung [SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989].	51
2.21.2	Konzentrationsbestimmung im Elektropherogramm.....	51
2.22	Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten.....	51
2.22.1	Gelextraktion	51
2.22.2	Ammoniumacetat-Isopropanol-Fällung.....	51
2.23	Enzymatische Modifikation von DNS-Molekülen.....	52
2.23.1	Spaltung von DNS-Molekülen mit Restriktionsenzymen	52
2.23.2	Verknüpfung von DNS-Molekülen mit T4-DNS-Ligase	52

2.24 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNS.....	53
2.24.1 Transformation von <i>E. coli</i> durch CaCl ₂ -Kompetenz und Temperaturschock....	53
2.24.2 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation [AUSUBEL <i>et al.</i> , 1987].....	54
2.25 In vitro Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR [SAIKI <i>et al.</i> , 1988]	55
2.25.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	55
2.25.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion	55
2.25.3 Ermittlung der Hybridisierungstemperatur.....	57
2.25.4 Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Primern.....	57
2.25.5 Verwendete Primer	58
2.26 Sequenzanalyse von DNS-Molekülen	59
2.27 Untersuchung der Streßantwort mittels DNS-Microarray.....	59
3 Ergebnisse.....	60
3.1 Untersuchung der Hochdruckantwort von grampositive Bakterien am Beispiel <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.53	60
3.1.1 Bestimmung der Korrelation zwischen optischer Dichte und Keimzahl	60
3.1.2 Einfluß der Temperatur auf das Wachstum von <i>Lb. sanfranciscensis</i> TMW1.53 und <i>Lc. lactis</i> MG1363	60
3.1.3 Einfluß des pH-Werts auf das Wachstum von <i>Lb. sanfranciscensis</i> TMW1.53 und <i>Lc. lactis</i> MG1363	62
3.1.4 Einfluß des Kochsalzgehalts auf das Wachstum von <i>Lb. sanfranciscensis</i> TMW1.53 und <i>Lc. lactis</i> MG1363	63
3.1.5 Einfluß des Drucks auf das Wachstum von <i>Lb. sanfranciscensis</i> TMW1.53 und <i>Lc. lactis</i> MG1363	64
3.1.6 Hochdruckkreuzresistenzen von <i>Lb. sanfranciscensis</i> TMW1.53	65
3.1.7 Untersuchung der streßinduzierten Proteomantwort	68
3.1.8 Identifizierung einzelner Proteine	77
3.1.9 Gensequenz einzelner überexprimierter Proteine.....	81
3.2 Untersuchung der Hochdruckstreßantwort gramnegative Bakterien am Beispiel <i>Escherichia coli</i>	88
3.2.1 Einfluß des Drucks auf das Wachstum von <i>Escherichia coli</i> JM109(DE3).....	88
3.2.2 Untersuchung der Hochdruckstreßantwort von <i>Escherichia coli</i> JM109(DE3) mittels DNS-Micro-Array.....	89

3.3 Untersuchung zur Eignung von GFP als Markerprotein zur Detektion hochdruckinduzierter Streßantworten.....	92
3.3.1 Reinigung von GFP	93
3.3.2 Verhalten von GFP in Abhängigkeit des pH-Werts	95
3.3.3 Verhalten von Rohextrakten und gereinigtem GFP in Abhängigkeit von Temperatur und Druck.....	97
3.3.4 FTIR-spektroskopische Untersuchungen von GFP	100
3.3.5 Expression von GFP unter subletalen Hochdruck.....	109
3.3.6 Streßinduzierte Expression von GFP unter der Kontrolle der Streßpromotoren von <i>clpB</i> , <i>dnaK</i> und <i>groE</i>	112
4 Diskussion	115
4.1 Die Hochdruckstreßantwort von <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW1.53.....	115
4.2 Die Hochdruckstreßantwort von <i>Escherichia coli</i> JM109 (DE3)	124
4.3 Die Eignung von GFP als Reportergen zur Messung hochdruckinduzierter Genexpression	130
4.4 Expression von GFP unter Hochdruck.....	136
5 Zusammenfassung	139
6 Summary.....	142
7 Literaturverzeichnis.....	142

Abkürzungen, Formelzeichen, Konstanten

A	Ampere, Absorption
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Anteil Crosslinker (Anteil des Bis- zum Totalacrylamidanteil)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälbermagen
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Em	Emission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Ex	Extinktion

FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Gramm, Fallbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
GIC	Größenausschlußchromatographie
h	Stunde
H ₂ O _{deion./bidest}	deionisiertes Wasser, zweimal destilliertes Wasser
HIC	Hydrophobizitätsinteraktionschromatographie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
k	Geschwindigkeitskonstante, Kilo
K	Gleichgewichtskonstante
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaar
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
M	Mega (10 ⁶), Molar
m	Milli (10 ⁻³), Meter
min.	Minute
MW	Molekulargewicht
NS	Nukleinsäure
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	Druck
Pa	Pascal
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIP	druckinduzierte Proteine („pressure inducible proteins“)
PRP	druckreprimierte Proteine („pressure repressible proteins“)
R	Gaskonstante
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure

rRNs	ribosomale Ribonucleinsäure
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Standard Saline Citrat
T	absolute Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TMW	Technische Mikrobiologie, Weihenstephan
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/ v	Volumen/ Volumen
Vol.	Volumen
w/ v	Masse/ Volumen

1 Einleitung

Methoden der nichtthermischen Lebensmittelbehandlung gewinnen in zunehmendem Maße in der Lebensmittelindustrie an Bedeutung. Unter diesen Methoden sind innovative Prozesse wie die Pasteurisierung mit elektromagnetischen Wellen hoher Frequenz oder mit konduktiver Erwärmung, die Behandlung mit Ozon, den Einsatz starker Lichtimpulse und die Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck zu verstehen. Hierbei nimmt die letztgenannte Methode eine besondere Rolle ein, da mit ihr nicht nur eine Verbesserung der Haltbarkeit von Lebensmitteln erreicht werden kann, sondern diese Technologie zugleich auch noch das Aroma, die Farbe und wertgebende Inhaltsstoffe besser erhält als z. B. die thermische Behandlung, und zusätzlich zum Teil eine gewünschte Veränderung der Textur hervorruft.

Neben der Verbesserung der Haltbarkeit von Lebensmitteln ist es allerdings auch denkbar, daß sich die Biotechnologie zukünftig der durch Hochdruck hervorgerufenen Adaptions- und Kompensationsmechanismen von Mikroorganismen, insbesondere der bislang auf dem Gebiet der Hochdrucktechnologie am besten untersuchten Tiefseebakterien, zur gezielten Produktion nutzbarer Stoffe bedient. So wird derzeit versucht, die durch Hochdruck induzierbare Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren von Tiefseebakterien in Milchsäurebakterien zu transferieren, um somit essentielle Fettsäuren bei fermentierten Lebensmitteln anzureichern [ALLEN und BARTLETT, 2000]. Des weiteren könnte die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch Transfektion hochdruckinduzierbarer Gene zu einem piezophilen Eukaryonten verändert werden, mit dem Ziel diverse industrielle Applikationen durch Anwendung von hydrostatischem Hochdruck zu verbessern. Auch wird bereits geprüft, ob es möglich ist unter Hochdruckbedingungen neue Antibiotika von piezophilen Mutanten diverser Actinomyceten zu erhalten [ABE und HORIKOSHI, 2001].

Obwohl bereits vor mehr als einhundert Jahren gezeigt wurde, daß sich die natürliche Mikroorganismenflora von Milch durch Hochdruckbehandlung erheblich reduzieren läßt [HITE, 1899], und die Hochdrucktechnologie seit etwa 15 Jahren zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt wird, ist über den Abtötungsmechanismus und die Resistenz einiger Organismen nur sehr wenig bekannt. Außerdem ist bei den bisherigen Untersuchungen kaum

der Aspekt berücksichtigt worden, daß die Technologie der Hochdruckanwendung auch zur Gestaltung neuer biotechnologischer Prozesse unter Verwendung subletaler Drücke verwendet werden könnte.

Andererseits wurden jedoch bereits detaillierte Untersuchungen zum Verhalten (mikrobieller) Enzyme durchgeführt, die deren Denaturierung und Reaktionskinetik beschrieben [SMELLER *et al.*, 1999; SILVA und WEBER, 1993; HEREMANS *et al.*, 1997]. Diese meist in abiotischen Systemen durchgeführten Experimente lieferten Grundlagenkenntnisse zur Thermodynamik enzymatischer Prozesse bis hin zur Proteinfaltung. Sie konnten bisher jedoch kaum zur Erklärung zellulärer Reaktionen herangezogen werden.

Es gibt also auf dem Gebiet der Hochdruckbehandlung noch immer immensen Forschungsbedarf. Insbesondere soll der genaue Abtötungsmechanismus bzw. mögliche biotechnologische Anwendungen gezielt untersucht werden.

1.1 Biochemische Prozesse unter Hochdruck

Allgemein resultieren die meisten chemischen Reaktionen in einer Volumenänderung, da die Summe der partialen molaren Volumina der Produkte generell nicht identisch ist zu der der Edukte. Diese Volumenänderung, die als Reaktionsvolumen (ΔV) bezeichnet wird, kann im Gleichgewichtszustand eines Systems auch als Antwort auf eine Druckveränderung nach der Formel (1) verstanden werden.

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V}{RT} \quad (1)$$

K = Gleichgewichtskonstante, p = Druck, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur

In formaler Analogie hierzu kann die Druckabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k geschrieben werden als:

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^*}{RT} \quad (2)$$

wobei ΔV^* das Aktivierungsvolumen beschreibt. In beiden Gleichungen ist bei den Komponenten der Reaktion jeweils auch das Lösungsmittel eingeschlossen.

Das Prinzip von BRAUN und LECHATelier besagt, daß das Gleichgewicht einer Reaktion, das mit einer Volumenverringernng oder einer Abnahme der Molzahl verbunden ist, sich unter Druck auf die Seite der Produkte verschiebt [CHEFTEL, 1995]. Wird dieses Prinzip berücksichtigt, so ist offensichtlich, daß ein positives bzw. negatives Aktivierungsvolumen unter Hochdruck zu einer Abnahme bzw. Zunahme der Geschwindigkeitsrate führen. Hinsichtlich des Reaktionsvolumens führt ein positives ΔV zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu den Edukten, wohingegen ein $\Delta V < 0$ die Bildung der Produkte favorisiert. Die Reaktionsvolumina einiger ausgewählter Reaktionen mit biologischer Relevanz sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1: Reaktionsvolumina für biochemisch relevante Reaktionen bei 25 °C
[JAENICKE, 1983, GROSS und JAENICKE, 1994]

<i>Reaktionstyp</i>	<i>Reaktion</i>	ΔV
Protonierung/ Ionenpaarbildung	$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$	+21,3
	$Imidazol + H^+ \rightarrow Imidazol \cdot H^+$	-1,1
	$P-COO^- + H^+ \rightarrow P-COOH$	+10,0
	$P-NH_3^+ + OH^- \rightarrow P-NH_2 + H_2O$	+20,0
Wasserstoffbrückenbildung	Poly (L-Lysine): Helixbildung	-1,0
	Poly (A + U): Helixbildung	+1,0
Hydrophobe Hydratation	$C_6H_6 \rightarrow (C_6H_6)_{Wasser}$	6,2
	$(CH_4)_{Hexan} \rightarrow (CH_4)_{Wasser}$	-22,7
Hydratation polarer Gruppen	$n-Propanol \rightarrow (n-Propanol)_{Wasser}$	-4,5
Proteindissoziation/-assoziation	Lactatdehydrogenase (M4 \rightarrow 4 M)	-500,0
	Bildung von Mikrotubuli	+90,0
	Ribosomen-Assoziation (<i>E. coli</i> 70 S)	$\geq +200,0$
Proteindenaturierung	Myoglobin (pH 5, 20 °C)	-98,0

Mit dem Prinzip von BRAUN und LECHATelier ist auch das Gesetz der mikroskopischen Ordnung eng verknüpft. Dieses Gesetz besagt, daß bei konstanter Temperatur eine Erhöhung des Drucks den Grad der Ordnung der Moleküle einer Substanz ebenfalls erhöht. Basierend auf diesem Gesetz wird erwartet, daß sich Temperatur und Druck auf molekularer Ebene

antagonistisch verhalten. Die meisten dieser durch Hochdruck hervorgerufenen ordnenden Effekte sind nicht-kovalente Bindungen zwischen Molekülen, weshalb insbesondere solche Moleküle sensitiv gegenüber dem Einfluß von Hochdruck sind, deren Tertiärstruktur und biologische Funktionalität von der Interaktion nicht-kovalenter Bindungen abhängig sind. Dies ist der Grund, weshalb insbesondere Enzyme und Cytoplasmamembranen hochdrucksensitiv sind [ULMER *et al.*, 2002]. Der Verlust der Funktionalität leitet die Schädigung lebender Zellen ein, die letztendlich bei genügend hohen Drücken bzw. ausreichend langer Haltezeit zum Zelltod führt.

1.1.1 Wirkung von Hochdruck auf Proteine

Die biologisch aktive Struktur eines Proteins ist nur innerhalb enger Temperatur- und Druckbereiche gegeben und ist hierbei zudem noch stark abhängig von der Art und Zusammensetzung des Lösungsmittels.

Generell werden bei Drücken unter 200 MPa reversible Effekte beobachtet. Dies beinhaltet auch Effekte, welche die Aktivität der Enzyme betreffen, Effekte auf die Bindung kleiner Moleküle [BALNY *et al.*, 1989], Änderungen der Konformation und der Interaktionen von Untereinheiten in multimeren Proteinen [SILVA *et al.*, 1992]. Die Änderung und im Extremfall auch reversible Aufhebung der Aktivität von Enzymen ist die Konsequenz des Druckeinflusses a) auf die Reaktion an sich, b) auf Konformationsänderungen des Proteins oder c) der Dissoziation von Enzymen in ihre Untereinheiten [MORILD, 1981]. Die Dissoziation von oligomeren Enzymen in ihre Untereinheiten geht dabei immer mit einer negativen Volumenänderung einher. Der Zerfall in diese Monomere beruht dabei auf der Störung der auf Hochdruck sehr sensibel reagierenden hydrophoben Wechselwirkungen, die in erster Linie für die Stabilisierung der Quartärstruktur verantwortlich sind [BALNY und MASSON, 1993]. Die Dissoziation von Enzymen kann dabei von einer Aggregation der Untereinheiten oder einer Präzipitation gefolgt werden [MASSON *et al.*, 1990].

Irreversible Effekte hingegen treten erst bei Drücken über 300 MPa auf, wobei eine vollständige Inaktivierung des Enzyms und Denaturierung des Proteins beobachtet wurde [HEREMANS, 1992]. Dabei faltet sich das Molekül auf und Lösungsmittel, häufig Wasser dringt in die vorhandenen Hohlräume ein und lagert sich an die ionischen Gruppen der Proteine an. Die derart ausgerichteten Wassermoleküle sind mit einem Volumen von 16 ml/mol kompakter angeordnet als freies Wasser mit einem Volumen von 18 ml/mol. Die

Ionisation der sauren und basischen Proteingruppen wird daher unter Druck verstärkt. Bei kleinen Proteinen, wie z.B. bei der Ribonuklease, treten Auffaltungsreaktionen erst bei 400 bis 800 MPa auf [BRANDTS *et al.*, 1970]. Für diese Proteine kann der Denaturierungsvorgang, der ohne erkennbare Zwischenprodukte verläuft, mit den beiden Molekülzuständen „nativ“ und „denaturiert“ in einem p, T-Diagramm (Abbildung 1.1) beschrieben werden, während die Denaturierung von oligomeren Proteinen ein komplexer Vorgang ist [HEREMANS, 1992].

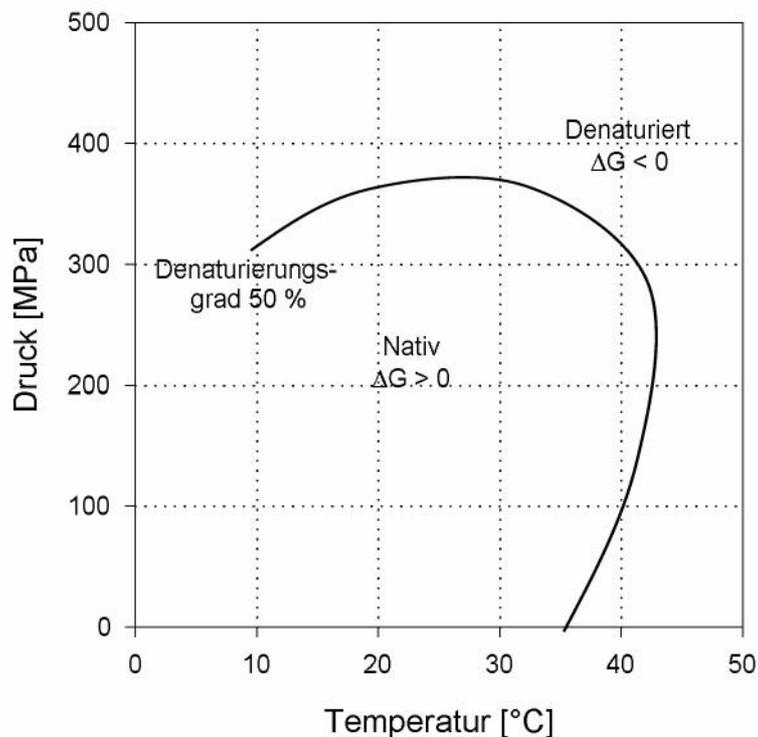


Abbildung 1.1: Druck/ Temperatur-Phasendiagramm von Proteinen [Hawley, 1971; mod.]

Das p, T-Diagramm von Proteinen, das auch als Modell bei der Inaktivierung von Mikroorganismen [SONOIKE *et al.*, 1992] und Bakteriophagen [LUDWIG *et al.*, 1992] herangezogen wird, zeigt, daß bei höheren Temperaturen Druck gegenüber temperaturinduzierter Inaktivierung stabilisiert. Bei niedrigen Temperaturen stabilisiert eine Zunahme der Temperatur gegenüber Hochdruckdenaturierung. Im Gegensatz zur Denaturierung von Proteinen tritt die Inaktivierung von Mikroorganismen schon bei Drücken unter 300 MPa auf, weshalb davon auszugehen ist, daß hydrostatischer Hochdruck zusätzlich noch auf andere essentielle Stoffe, Solute oder Kompartimente der Zelle wirkt.

1.1.2 Wirkung von Hochdruck auf Lipide und Membranen

Im Gegensatz zu den durch Hochdruck hervorgerufenen irreversiblen Effekten, die bei Proteinen beobachtet werden, sind die Auswirkungen auf Lipide und Lipidmischungen reversibel. Bisherige Studien haben sich vorwiegend auf die Untersuchung der Phasenverschiebung der Übergangstemperatur in Abhängigkeit des Drucks konzentriert. Dabei stellte sich heraus, daß die Hauptübergangstemperatur um ungefähr 20 °C pro 100 MPa ansteigt [WONG, 1987].

Untersuchungen an Lipidmischungen zeigen eine Separation der Phasen, ein Prozeß, der Ausgangspunkt für die hochdruckinduzierte Zerstörung von Membranen ist [Heremans, 1992].

KAVECANSKY *et al.* (1992) zeigten, daß durch Hochdruck die Wechselwirkung von Lipiden und Enzymen bei genau definierten Drücken gestört wird und somit eine schnelle Deaktivierung der Membranfunktionalität auftritt. Die zur Störung notwendige Druckintensität hängt dabei von der Zusammensetzung der Lipide und den darin eingeschlossenen Enzymen ab. Die auftretende Störung korreliert mit der Änderung des physikalischen Status der Lipide, die das Enzym umgeben. In den meisten Fällen ist diese Inaktivierung irreversibel. Es wurde in Ausnahmefällen jedoch auch eine Aktivierung beobachtet.

Weiterhin wurde das Herauslösen der Proteine aus der Membran beobachtet. In vielen Fällen liegt der Druck, um solch ein Ereignis hervorzurufen, bei nur wenigen 100 MPa [ORR *et al.*, 1990]. Andererseits weisen Lipide gleichzeitig einen stabilisierenden Effekt auf druckinduzierte Änderungen in der Struktur von Polypeptiden auf [CARRIER *et al.*, 1990]. Somit sind diese Prozesse für das Verständnis des Druckinaktivierungsmechanismus bei Bakterien von Bedeutung [ULMER *et al.*, 2002].

1.2 Wirkung hoher Drücke auf Organismen und ihre Proteinbiosynthese

Während der Einfluß diverser suboptimaler Wachstumsbedingungen thermischer oder osmotischer Natur auf die Gen- und Proteinexpression ebenso gut untersucht sind, wie der Einfluß von Sauerstoff, pH und DNS-schädigender Substanzen [HECKER, 1998; SANDERS *et al.*, 1999; STORZ und HENGGE-ARONIS, 2000] ist die Wirkung von hydrostatischem Hochdruck auf die Transkription und Translation weitestgehend unbekannt.

Wie bereits gezeigt wurde, kann Hochdruck sowohl biochemische Prozesse, die mit der Expansion als auch mit der Reduktion von Systemvolumina einhergehen, inhibieren oder stimulieren [SOMERO, 1992]. Die Relevanz von Hochdruck als ein Selektionsparameter der Evolution kann durch die Existenz barophiler, auch als piezophil bezeichneter Tiefseebakterien unterstrichen werden. Diese wachsen unter hohen Drücken schneller als bei Atmosphärendruck [KATO *et al.*, 1998; REYSENBACH und DEMING, 1991; YAYANOS, 1998; YAYANOS, 1986]. Bei diesen Tiefseebakterien, die durch vertikale Mobilität mit starken Druckschwankungen konfrontiert sind, konnten bislang einige hochdruckinduzierte Veränderungen beschrieben werden [BARTLETT *et al.*, 1989; KATO und HORIKOSHI, 1996]. Diese Veränderungen wurden zum Teil auch schon bei nicht piezophilen Organismen beobachtet [GROSS *et al.*, 1994; WELCH *et al.*, 1993].

Um die Adaptionsmechanismen und die Streßantwort von Bakterien auf hydrostatischen Hochdruck verstehen zu können, ist es zunächst notwendig, die zellulären Prozesse zu identifizieren, die in erster Linie durch starke Druckverschiebungen beeinflusst werden.

Zum einen ist bekannt, daß Mikroorganismen auf zunehmenden Druck mit Streß [WELCH *et al.*, 1993] oder im Extremfall sogar mit Tod [LUDWIG *et al.*, 1992; HERDEGEN und VOGEL, 1999] reagieren. Bei *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* äußert sich dieser Streß bei einem Druck von ca. 50 MPa und 4 °C in einer Verringerung der Wachstumsrate bzw. einer Verlängerung des Lebenszyklusses. Andere drucksensitive Bakterien wie *Vibrio parahaemolyticus* oder *Clostridium perfringens* zeigten bei diesen Bedingungen ein rasches Absterben [BAROSS *et al.*, 1975]. Generell läßt sich sagen, daß moderate Drücke viele Bakterienkulturen in einen Ruhezustand versetzten, sofern sich die Zellen bei der Druckbehandlung nicht in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden [ZOBELL, 1970]. Bei einem Druck von 55 MPa nimmt beispielsweise bei *E. coli* die Proteinbiosynthese um 87% ab, während die Keimzahl konstant bleibt [WELCH *et al.*, 1993]. Der lebensmittelrelevante Stamm *Lactobacillus sanfranciscensis* zeigt bei einem Druck von 100 MPa bzw. 150 MPa keine signifikante Reduktion der Keimzahl, jedoch eine Abnahme des Maltoseverbrauchs um 68 bzw. 82% im Vergleich zu unbehandelten Zellen [KORAKLI *et al.*, 2002]. Auch zeigt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bei einem Druck von 30 MPa eine nahezu vollständige Inhibierung der Synthese von Makromolekülen [PIPER, 1993].

Ein möglicher Grund für die Inhibierung der Makromolekülsynthesen ist in der durch Druckeinwirkung hervorgerufenen Störung des Transports vieler Komponenten über die Membran zu suchen. Der Einbau von radioaktiv markierten Kohlestoffquellen wie Glutamat und Acetat ist bei einer Mischung von Meeresbakterien bei einem Druck von 18 MPa wesentlich geringer als bei Atmosphärendruck [JANNASCH und TYLOR, 1984]. WOUTERS *et al.* (1998b) konnten anhand von *Lactobacillus plantarum* zeigen, daß zunächst nicht die glykolytische Aktivität durch Hochdruck beeinflusst wird, sondern die Fähigkeit des Protonentransports an der Zellmembran. Generell führt eine Druckzunahme zu einer Abnahme der passiven Permeabilität und der Inhibierung des aktiven Transports [HALL und EULOGY, 1987].

Ein weiterer kritischer Angriffspunkt stellt die DNS-Replikation dar. Obwohl moderate Drücke nur geringe Auswirkungen auf die Schmelztemperatur der DNS haben [HAWLEY und MACLEOD, 1977], zeigen Druckänderungen signifikante Effekte auf den DNS-Gehalt und die DNS-Replikation von Bakterien. Bei moderaten Drücken, bei denen einige drucksensitive Bakterien noch in der Lage sind zu wachsen, ist das „Kernvolumen“ von Bakterien der Gattung *Lactobacillus*, *Salmonella* und *Listeria* sehr reduziert [WOUTERS *et al.*, 1998b; MACKEY *et al.*, 1994], auch wenn andere zelluläre Komponenten wie Ribosomen offensichtlich unberührt bleiben. Dennoch ist es nicht möglich, eine generelle Aussage über die Wirkung von Druck auf den DNS-Gehalt zu treffen. Ein Bakterium der Gattung *Corynebacterium* besitzt bei einem Druck von 40 MPa im Vergleich zu Atmosphärendruck einen hohen Gehalt an DNS, jedoch eine geringe Zahl an Ribosomen. Zellen von *E. coli*, die bei 45 MPa inkubiert wurden, produzieren weniger Biomasse. Der Proteingehalt pro Zelle hingegen ist ungefähr gleich. Der Anteil an RNS nimmt zu und der DNS-Gehalt pro Zelle ist signifikant reduziert [ZOBELL und COBET, 1963]. YAYANOS und POLLARD (1969) konnten anhand der Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymin, Leucin und Uracil von *E. coli* zeigen, daß die DNS-Synthese bei Druck ab 50 MPa, die Proteinbiosynthese bei ca. 48 MPa und die RNS-Synthese ab 77 MPa unterdrückt wird.

Die Proteinbiosynthese wurde als der Faktor ausgemacht, der für das durch Hochdruck limitierte Wachstum am ehesten verantwortlich ist. Es wurden sowohl ganze Zellen als auch zellfreie Proteinbiosynthesesysteme von *E. coli* verwendet, um den Einfluß von Hochdruck auf verschiedene Aspekte des Translationsprozesses zu untersuchen [JAENICKE, 1981; JAENICKE, 1991; NIVEN *et al.*, 1999; POPE und BERGER, 1973; SCHWARZ und LANDAU, 1972].

Drücke, welche die Proteinbiosynthese vollständig hemmen, haben keinen Effekt auf die Bildung von Aminoacyltransfer-RNS, auf den Transport von Aminosäuren durch die Membran oder die Integrität der Ribosomen. Ein Schritt, der durch Druck in einer ähnlichen Weise sensitiv ist wie die gesamte Zellproteinsynthese, ist die Bindung der Aminoacyltransfer-RNS an den Komplex aus Ribosomen und mRNA [ARNOLD und ALBRIGHT, 1971; GROSS *et al.*, 1992; GROSS *et al.*, 1993; SCHULZ *et al.*, 1976; PANDE und WISHNIA, 1986]. Die druckinduzierte Inhibierung der Proteinbiosynthese ist reversibel. Sie wird unmittelbar nach der Dekompression wieder aufgenommen. Die Zugabe von Magnesiumchlorid vor der Druckbehandlung stabilisiert zwar die Ribosomen, die daraus resultierende Konformationsänderung hat jedoch keinen Effekt auf das Überleben der Zellen [NIVEN *et al.*, 1999].

1.2.1 Druckinduzierte Änderung der Proteinbiosynthese bei Tiefseebakterien

Obwohl oder gerade weil hydrostatischer Hochdruck in viele wichtige zelluläre Prozesse eingreift, reagieren sowohl piezophile als auch barosensitive Zellen auf diese Störungen. Eine Übersicht über druckregulierte Gene und Proteine geben Tabelle 1.2 bis Tabelle 1.4. Insbesondere bei Tiefseebakterien sind schon eine Reihe druckinduzierter Gene bekannt. Das nicht obligat barophile Bakterium *Photobacterium profundum* SS9 zeigt eine druckinduzierte Expression des als unspezifischen Porin-Membrankanals fungierenden Proteins OmpH, dessen Expression mit einer Repression des Proteins OmpL einhergeht [BARTLETT *et al.*, 1989; WELCH und BARTLETT, 1996]. Neben diesen zwei Membranproteinen wird zusätzlich die Expression des sich in der Membran befindlichen Proteins OmpI durch Druck induziert [CHI und BARTLETT, 1993]. Die Expression dieser drei Membranproteine wird vermutlich von den beiden transmembranen Proteinen ToxR und ToxS reguliert, da diese durch Druck ihre Konformation ändern [ABE *et al.*, 1999]. OmpH-Mutanten sind nicht hochdrucksensitiv, was zu der Hypothese führt, daß OmpH nur für das Wachstum unter Hochdruck bei bestimmten physiologischen Bedingungen notwendig ist und entweder mehrere Funktionen hat, die das Wachstum unter Hochdruck erleichtern, oder daß die Druckregulierung von OmpH von dem Zusammenspiel von Hochdruck mit anderen in der Tiefsee vorkommenden Faktoren wie Nährstoffmangel herrührt [BARTLETT *et al.*, 1995]. Die Promotorsequenz dieses Gens zeigt große Ähnlichkeit zu der Promoterstruktur eines aus *Shewanella benthica* isolierten, stark konservativen druckregulierten Operons [KATO *et al.*, 1995], das auch in anderen

Tiefseebakterien vorkommt [KATO *et al.*, 1996a; KATO *et al.*, 1997a]. Die Funktion dieses Operons ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, codiert jedoch für ein anderes Protein.

Tabelle 1.2: Beispiele hochdruckregulierter Gene und Proteine bei Tiefseebakterien [BARTLETT *et al.*, 1995 (mod.)]

<i>Organismus</i>	<i>Protein/ Gene</i>	<i>Methode</i>	<i>Bemerkungen</i>	<i>Referenz</i>
<i>Photobacterium profundum</i>	OmpH-Induktion	SDS-Page, Western-Blot	0,1-28 MPa	BARTLETT <i>et al.</i> , 1989
<i>Photobacterium profundum</i>	OmpL-Repression, OmpI-Induktion	Mutationsstu- dien	0,1-28 MPa	CHI und BARTLETT, 1993
<i>Photobacterium profundum</i>	OmpL-Repression	Western-Blot	0,1-28 MPa	WELCH und BARTLETT, 1996
<i>Shewanella benthica</i>	Quinol-Oxidase- Induktion	SDS-PAGE	60 MPa	QURESHI <i>et al.</i> , 1998a
<i>Shewanella benthica</i>	<i>asd</i> -Induktion	Western-Blot	10 und 30 MPa	KATO <i>et al.</i> , 1997b
<i>Shewanella benthica</i>	CytochromC-551 & 552	SDS-PAGE	60 MPa	QURESHI <i>et al.</i> , 1998b
<i>Shewanella benthica</i>	CAT-Fusions-Gen	Northern Blot	30 MPa; druckre- gulierter Promoter	KATO <i>et al.</i> , 1995
<i>Shewanella violacea</i>	CytochromC- Induktion	Spektrophoto- metrie	50 MPa	TAMEGAI <i>et al.</i> , 1998
<i>Shewanella violacea</i>	<i>glnA</i> -Induktion	Primer- Extension	0,1-50 MPa	IKEGAMI <i>et al.</i> , 2000

Weiterhin wurde beobachtet, daß das barotolerante Bakterium *Shewanella violaceae* spezifisch ein membrangebundenes Cytochrom C synthetisiert, wenn es unter Hochdruckbedingungen inkubiert wird [TAMEGAI *et al.*, 1998]. Neben diesem im bakteriellen respirativen System eine wichtige Rolle spielende Cytochrom wurden weitere druckregulierte Gene bzw. membrangebundene Proteine wie Cytochrom C-551, Cytochrom C-552 und ccb-ähnliche Quinoloxidase aus der Atmungskette von *Shewanella benthica* isoliert [QURESHI *et al.*, 1998a; QURESHI *et al.*, 1998b]. Neben verschiedenen Membrankanälen und der

Atmungskette wird bei *Shewanella violacea* auch die Expression von Glutaminsynthetase (GlnA), einem Enzym aus dem Stickstoffmetabolismus durch Druck beeinflusst [IKEGAMI *et al.*, 2000].

1.2.2 Druckinduzierte Änderung der Proteinbiosynthese bei barosensitiven Bakterien

Sogar Mikroorganismen, die nicht aus Umgebungen mit hohen Drücken kommen, sind in der Lage auf Druckerhöhung durch die Synthese sogenannter Streßproteine oder der Repression von Enzymen zu reagieren (Tabelle 1.3). Mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-PAGE) konnten für *E. coli* bei einem Druck von 28 MPa bzw. 53 MPa die Induktion von 55 Proteinen („Pressure Inducible Proteins“ PIPs) detektiert werden, von denen viele klassische Hitzeschock, Kälteschock, ribosomale Proteine, oder Proteine waren, deren Funktion nicht bekannt war. Zwei der wichtigsten PIPS wurden unabhängig mittels Immunopräzipitation als GroEL und DnaK bestimmt [WELCH *et al.*, 1993]. GROSS *et al.* (1994) konnten hingegen mit der selben Methode bei einem Druck von 40 MPa nur vier schwach druckinduzierbare Proteine detektieren, von denen sich zwei auch bei Zellen finden ließen, die sich in der stationären Phase befanden.

Neben diesen klassischen Streßproteinen ist auch die Funktion des Gens *rpoS*, das für den Sigmafaktor σ^S codiert für eine Erhaltung der Lebensfähigkeit bei Druckeinwirkung notwendig [ROBEY *et al.*, 2001]. *RpoS* ist neben der Kompensation von Hochdruckeinflüssen noch im Zusammenhang mit UV-Resistenz und der Replikation von Genen, die in der stationären Phase induziert werden in Erscheinung getreten und reguliert letztendlich mehr als 50 Proteine [STORZ und HENGGE-ARONIS, 2000].

Als hochdruckkontrollierte Gene wurden bei *E. coli* neben einer Reihe klassischer Streßproteine auch die Membranproteine OmpF, OmpC, LamB detektiert, die allesamt reprimiert werden [NAKASHIMA *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1996]. Auch treten bei *E. coli* in Analogie zu Tiefseebakterien durch Hochdruck Änderungen in der Proteinbiosynthese der Atmungskette auf. Das *cydD*-Genprodukt, das für die Zusammenlagerung des CytochromBD-Komplexes, eine der Komponenten der Atmungskette von *E. coli* notwendig ist, wird durch Hochdruck induziert [KATO *et al.*, 1996b]. Daneben werden auch die beiden Promotoren *lac* und *tac* durch Hochdruck angeschaltet, welche die für die Aufnahme und Verwertung von β -Galactosiden notwendigen Proteine regulieren [KATO *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995].

Tabelle 1.3: Beispiele hochdruckregulierter Gene und Proteine bei barosensitiven Bakterien [BARTLETT *et al.*, 1995 (mod.)]

<i>Organismus</i>	<i>Protein/ Gene</i>	<i>Methode</i>	<i>Druck</i>	<i>Referenz</i>
<i>E. coli</i>	4 PIPs	2-D-PAGE	40 MPa	GROSS <i>et al.</i> 1994
<i>E. coli</i>	<i>cydD</i>	Mutationsstudien	30 MPa	KATO <i>et al.</i> , 1996b
<i>E. coli</i>	<i>plac/ ptac</i> - Induktion	CAT-Fusions-Gen Primer Extension	30-50 MPa	KATO <i>et al.</i> , 1994; SATO <i>et al.</i> , 1995
<i>E. coli</i>	OmpF/ C, LamB Repression	SDS-PAGE	30 MPa	NAKASHIMA <i>et al.</i> , 1995
<i>E. coli</i>	<i>rpoS</i>	Mutationsstudie	50 MPa	ROBEY <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli</i>	<i>malB</i> -Repression	CAT-Fusions-Gen	0,1-30 MPa	SATO <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i>	FtsZ-Repression	Imuno- Fluoreszenz- Mikroskopie	48 MPa	SATO <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i>	55 PIPs	2-D PAGE	28 bzw. 53 MPa	WELCH <i>et al.</i> , 1993
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	13 PIPs bzw. PRPs	2-D-PAGE	0,1-200 MPa	DREWS <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	2 PIPs (Csps)	2-D-PAGE	200 MPa	WEMEKAMP- KAMPHUIS <i>et al.</i> , 2002

Wird *E. coli* unter Hochdruck inkubiert, so werden die Zellen größer, bilden Ketten und sind nicht mehr in der Lage sich voneinander zu trennen [WELCH *et al.*, 1993]. Dieses Auftreten der Ketten wird hervorgerufen durch die Repression des FtsZ-Rings, der eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung spielt, oder durch einen der vorangehenden Schritte der Zellteilung [SATO *et al.*, 2002].

Bei den barosensitiven Bakterien konnten auch bei grampositive Bakterien eine hochdruckinduzierte Streßantwort nachgewiesen werden. *Listeria monocytogenes*, ein

Lebensmittelverderber, zeigt nach einer zehnmütigen Hochdruckbehandlung mit 200 MPa zwei überexprimierte Kälteschockproteine (Csp1, Csp2) [WEME KAMP-KAMPHUIS, 2002]. Die Induktion eines Kälteschock-, „like“-proteins durch Hochdruck konnte auch für *Lactobacillus sanfranciscensis* bei einem Druck von bis zu 150 MPa gezeigt werden. Gleichzeitig wurde jedoch ein Protein mit gleichem Molekulargewicht und unterschiedlichem isoelektrischen Punkt reprimiert, was vermuten läßt, daß es sich nur um eine druckinduzierte Modifikation und nicht um eine echte Induktion bzw. Repression handelt. Neben diesen Proteinen wurde bei einem Druck von bis zu 200 MPa die Überexpression einer Ribokinase, eines Elongationsfaktors und acht weiterer nicht näher bestimmter Proteine sowie die Repression einer GMP-Synthetase und zweier weiterer Proteine beobachtet („Pressure Repressible Proteins“ PRPs) [DREWS *et al.*, 2002].

1.2.3 Druckeinfluß bei extremophilen, nicht aus der Tiefsee isolierten Bakterien

Die Genexpression extremophiler Bakterien, die nicht aus der Tiefsee isoliert wurden, wird ebenso durch Hochdruck beeinflusst. *Methanococcus thermolithotrophicus* zeigt beispielsweise bei einem Druck von 50 MPa eine Überexpression einiger basischer Proteine [JAENICKE *et al.*, 1988], ebenso wie *Thermococcus barophilus*, der bei einer Druckbehandlung von 40 MPa ebenfalls zwei Proteine deutlich stärker exprimiert [MARTEINSSON *et al.*, 1999].

1.2.4 Hochdruckinduzierte Genexpression bei Eukaryonten

Eingehende Untersuchungen mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, daß ein Druck von 75 MPa die Expression des Hitzeschockproteins hsp104 induziert [TAMURA *et al.*, 1998]. Bei einem Druck von 25 MPa werden hingegen die beiden Proteine Tat2 und Gap1, Permeasen für die spezifische Aufnahme von Tryptophan bzw. einem breiten Spektrum von Aminosäuren reprimiert [ABE und HORIKOSHI, 2000]. DNS-Microarray-Untersuchungen zeigten, daß sich bei einem Druck von 10 MPa für 12 h bei 6000 untersuchten Genen solche überexprimiert sind, welche die Transportmechanismen, die Transkription, die Zellkommunikation, das Zellwachstum, Zellteilung und die DNS-Synthese betreffen. Erstaunlicherweise war die Funktion von 49,5% der überexprimierten Gene noch unbekannt [ODANI *et al.*, 2002]. Bei höheren Drücken, niedrigeren Temperaturen oder längerer

Druckhaltezeit ändert sich das Bild der überexprimierten Gene signifikant und es treten auch klassische Streßproteine auf [IWAHASHI *et al.*, 2002].

Tabelle 1.4: Beispiele hochdruckregulierter Gene und Proteine bei extremophilen nicht aus der Tiefsee isolierten Bakterien und Eukaryonten [BARTLETT *et al.*, 1995 (mod.)]

<i>Organismus</i>	<i>Protein/ Gene</i>	<i>Methode</i>	<i>Druck</i>	<i>Referenz</i>
<i>Extremophile Bakterien</i>				
<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	einige basische PIPs	2-D-PAGE	50 MPa	JAENICKE <i>et al.</i> , 1988
<i>Thermococcus barophilus</i>	2 PIPs	SDS-PAGE	40 MPa	MARTEINSSON <i>et al.</i> , 1999
<i>Eukaryonten</i>				
<i>Rhodospiridium shaerocarpum</i>	4 PIPs	2-D-PAGE	45 MPa	GROB <i>et al.</i> , 1994
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tat2 und Gap1-Repression	Western-Blot	25 MPa	ABE und HORIKOSHI, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.000 Gene untersucht	DNS-Micro-Array	0,1-180 MPa	IWAHASHI <i>et al.</i> , 2002 ODANI <i>et al.</i> , 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hsp104-Induktion	SDS-Page	75MPa	TAMURA <i>et al.</i> , 1998
<i>Chondrocyten</i>	hsp70-Induktion	Northern-Blot	0,1-50 MPa	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 1996
<i>Chondrocyten</i>	einige PIPs	SDS-Page 2-D-PAGE	0,1-30 MPa	ELO <i>et al.</i> , 2000
<i>HeLa-Zellen</i> <i>HaCat-Zellen</i> <i>MG-63-Zellen</i>	hsp70-Induktion	Northern-Blot	30 MPa	KAARNIRANTA <i>et al.</i> , 2000

Neben der Hefe *S. cerevisiae* wurde auch für die Meereshefe *Rhodospiridium shaerocarpum* mittels 2-D-PAGE nach einer Druckbehandlung von 40 bzw. 45 MPa die Induktion von einem bzw. von vier Proteinen beobachtet [GROSS *et al.*, 1994].

Für Chondrozyten konnte ELO *et al.* (2000) und TAKAHASHI *et al.* (1996) mittels 2-D-PAGE bzw. Northern-Blot eine durch Hochdruck hervorgerufene Induktion des Hitzeschockproteins *hsp70* nachweisen. Die durch hohe Drücke hervorgerufene Überexpression dieses Proteins konnte auch bei HeLa (Krebszellen), HaCat (Keratinocyten) und MG-63 (Osteosarcomazellen) bei Drücken von bis zu 30 MPa beobachtet werden [KAARNIRANTA *et al.*, 2000]. ELO *et al.* (2000) konnten neben diesem Hitzeschockprotein nach zwölfstündiger Inkubation bei 30 MPa noch die Überexpression eines 67 kDa und 82 kDa großen Proteins sowie die Repression einiger Proteine im Bereich von 89 bis 92 kDa (pI 5,1-5,3) beobachten, wobei die Gesamtproteinsynthese auf 64% reduziert war.

1.3 Kreuzresistenzen im Zusammenhang mit Hochdruck

Werden Zellen vor einer letalen Streßbehandlung einem subletalen Streß gleicher Art ausgesetzt, so reagieren sie in der Regel mit erhöhter Toleranz. Diese erhöhte Resistenz kann evtl. auch durch andere Streßarten hervorgerufen werden. Durch die Induktion von generellen Streßproteinen während der Vorbehandlung wird der gestreßten Zelle folglich eine multiple, vorsorgliche und unspezifische Streßresistenz übertragen, eine Resistenz die gegen mehrere möglicherweise auftretenden Belastungsfaktoren ihre Wirkung zeigt. Die Zellen werden also auch vor Streßfaktoren geschützt, denen sie noch nicht begegnet sind [HECKER, 1998]. Dieser Effekt wird als Kreuzresistenz oder „cross protection“ bezeichnet und wurde insbesondere für Hitzestreßvorbehandlungen schon sehr genau beschrieben [SANDERS *et al.*, 1999; WHITAKER und BATT, 1991].

Auch für die Ausbildung einer Hochdruckresistenz wurde ein solches Phänomen bei einigen Mikroorganismen beobachtet. Psychrophile Meeresbakterien reagieren auf Nährstoffmangel, also Hungerstreß vor der Hochdruckbehandlung mit erhöhter Druckresistenz im Vergleich zu logarithmisch wachsenden Zellen [NOVITSKY und MORITA, 1978]. Ebenso zeigt das aus Meerwasser isolierte halophile Bakterium *Micrococcus roseus* nach der Vorbehandlung mit bis zu 15% Kochsalz bei einem Druck von 138 MPa eine Überlebensquote von bis zu 95%, die unabhängig ist von der Kochsalzkonzentration während der Druckbehandlung [TANAKA *et al.*, 2001]. Weiterhin zeigen *Lysteria monocytogenes* [WEMEKAMP-KAMPHUIS *et al.*, 2002]

und *Staphylococcus aureus* [NOMA und HAYAKAWA, 2002] nach Kältevorschock eine 100 bzw. 200-fach erhöhte Barotoleranz. Neben tiefen Temperaturen kann auch eine Hitzebehandlung eine Erhöhung der Druckresistenz bewirken. Dies wurde am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt [IWAHASI *et al.*, 1991]. Andererseits zeigten mit Hochdruck vorbehandelte Hefezellen eine Zunahme des Hitzeschockproteins hsp104. Während die Druckresistenz und Ethanolresistenz hierdurch um bis zu 18% zunahmten, nahm die Hitzestressresistenz in Abhängigkeit der Druckvorbehandlung hingegen nur um bis zu 5% zu [TAMURA *et al.*, 1998].

1.4 Green Fluorescent Protein (GFP)

Das Screening und die Charakterisierung von Promotoren wird mit speziellen Vektorsystemen durchgeführt, die promotorenlose Reportergene enthalten [DEVOS und SIMONS, 1994]. Die zu untersuchenden Sequenzen werden vor das Reportergen gebracht und über dessen Expression analysiert. Als Reportergen wird beispielsweise die Chloramphenicolacetyltransferase verwendet [VAN DER VOSSEN *et al.*, 1985; ACHEN *et al.*, 1986; KATO *et al.* 1994]. Der Nachteil dieses Systems besteht in der Selektion auf die Chloramphenicolresistenz, die eine hohe Expression des Gens erfordert und so nur für sehr starke Promotoren geeignet ist. Als wesentlich geeigneter haben sich Reportergene wie β -Galactosidase [ISRAELSEN *et al.*, 1995] oder Phospho- β -Galactosidase [SIMONS *et al.*, 1990] erwiesen. Für Milchsäurebakterien sind diese Reportergene jedoch nur bedingt geeignet, da sie in einer Vielzahl dieser Mikroorganismen natürlich vorkommen [DEVOS und SIMONS, 1988; HICKEY *et al.*, 1986; JIMENO *et al.*, 1984]. Als weitere Reportergene werden unter anderem Luciferase aus *Vibrio fischeri* [WATERFIELD *et al.*, 1995; EATON *et al.*, 1993], β -Glucuronidase [PLATTEEUW *et al.*, 1994] und Green Fluorescent Protein (GFP) beschrieben. Mit Ausnahme von GFP ist es jedoch stets notwendig, zusätzliche Cosubstrate zuzuführen, oder zur genauen Quantifizierung einen Zellaufschluß mit anschließender enzymatischer Reaktion durchzuführen. GFP aus der pazifischen Tiefseequalle *Aequorea victoria* rief deshalb in den letzten Jahren im Bereich der Biochemie, Zellbiologie und Molekularbiologie ein großes Interesse hervor. Dieses relativ große Molekül ist mit seinen 27 kDa einzigartig unter den lichtemittierenden Proteinen. Das Gen weist alle notwendigen Informationen für die posttranslationale Modifikation des Proteins auf. Es sind zur vollständigen Reifung und zur Ausbildung des Chromophors im Inneren des Proteins keine quallenspezifischen Proteine

notwendig. Es sind auch keine weiteren Substrate oder Cofaktoren für das Auftreten der Fluoreszenz notwendig. Lediglich das Vorhandensein weniger Moleküle Sauerstoff ist notwendig, die bei der Ausbildung des Chromophors als Katalysator fungieren.

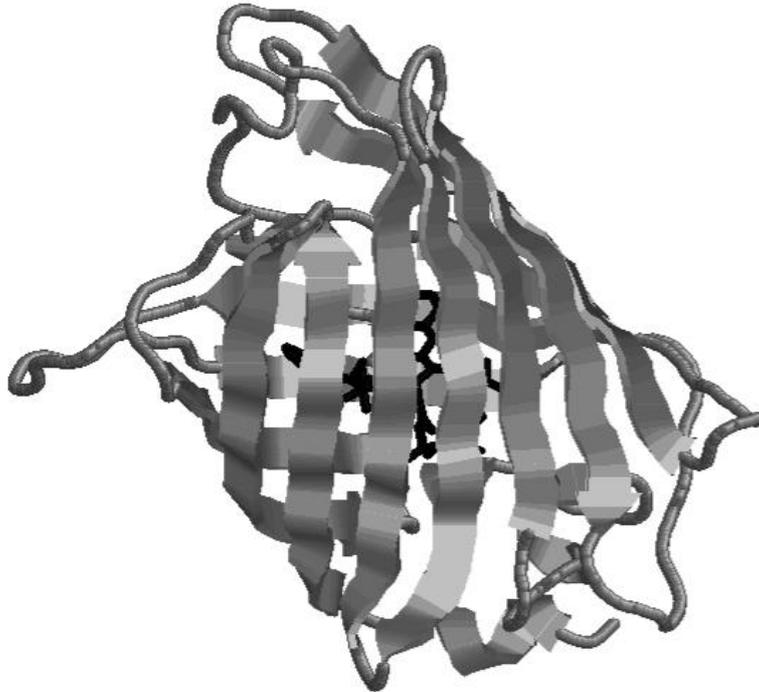


Abbildung 1.2: Struktur eines GFP-Moleküls, Chromophor dunkel dargestellt.

GFP ist gegenüber Temperaturen bis zu 76 °C stabil [BOKMAN und WARD, 1981; WARD, 1981, WARD und BOKMAN, 1982]. Diese Stabilität ist offensichtlich die Konsequenz der einzigartigen dreidimensionalen Struktur [ORMÖ *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1996]. Elf β -Faltblätter umschließen und schützen das Chromophor, das sich in der Nähe des geometrischen Zentrums des sogenannten β -Dose befindet. Kurze Schleifenregionen und ungeordnete α -Helices bedecken die Öffnungen der Dose (vgl. Abbildung 1.2). Der Schutz ist so vollständig, daß klassische fluoreszenzlöschende Substanzen („Quenching“) wie Acrylamid, Halogenide und ein Übermaß an molekularem Sauerstoff keinen Effekt auf die Fluoreszenz von GFP haben [RAO *et al.*, 1980]. Die Fluoreszenz von GFP ist im pH-Bereich von 6,5 bis 12 stabil, mit einem zusätzlichen Maximum bei einem pH-Wert von 12 für wild-type GFP (wtGFP) [WARD, 1981].

Um die Effizienz der richtigen Faltung und die Fluoreszenzintensität zu steigern und die Neigung der Bildung von Dimeren zu verringern, wurden verschiedene Mutanten konstruiert.

Sie werden in sieben Klassen eingeordnet, die auf die unterschiedlichen Komponenten des Chromophors beruhen. Eine Übersicht über die verschiedenen Klassen und die Eigenschaften des Chromophors gibt Tabelle 1.5. Jede Klasse hat verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen. Die Klassen eins bis vier entstanden aus einem Polypeptid mit Tyrosin in der Position 66, wohingegen die Klassen fünf bis sieben einen Tryptophan-, Histidin- oder Phenylalaninrest an dieser Stelle aufweisen.

Tabelle 1.5: Klassifizierung und Eigenschaften von GFP [TSIEN, 1998 (mod.)]

Klasse	Beschreibung	$\lambda(\text{Ex})$ [nm]	$\lambda(\text{Em})$ [nm]	Anmerkung
1	Wildtyp	395-397 bzw. 470-475	504	
2	Phenolatanion	487-489	507-511	„redshift GFP“
3	neutraler Phenolrest	399	511	
4	Phenolatanion mit vollständigem π -Elektronensystem	508-516	518-529	gelb fluoreszierende Proteine
5	Indol im Chromophor	434-436 bzw. 452	476-505	cyan fluoreszierende Proteine
6	Imidazol im Chromophor	380-384	440-448	blau fluoreszierende Proteine
7	Phenyl im Chromophor	360	442	

In biologischen Anwendungen wird GFP entweder als Fusionsprotein oder als Indikator für die Genexpression oder subzelluläre Lokalisation verwendet. So wurde das Protein bislang in Prokaryonten wie *Bacillus subtilis* [LEWIS und ERRINGTON, 1996; SHARPE und ERRINGTON, 1996] und *Escherichia coli* [CHALFIE *et al.*, 1994; CORMACK *et al.*, 1996], als auch in Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* [KAHANA und SILVER, 1996; HAMPTON *et al.*, 1996] und *Caenorhabditis elegans* [CHALFIE *et al.*, 1994; SENGUPTA *et al.*, 1996] oder *Drosophila* [PLAUTZ *et al.*, 1996; EDWARDS *et al.*, 1997] exprimiert, wobei die Expression auch unter hohen Temperaturen möglich war [CHA *et al.*, 1999]. In Milchsäurebakterien war die Expression dieses Proteins bislang jedoch wenig erfolgreich [EHRMANN, persönliche

Mitteilung]. Die Eignung von GFP als Markerprotein für hochdruckinduzierte Genexpression wurde jedoch bislang noch nicht untersucht.

1.5 Aufgabenstellung

Es gibt bereits zahlreiche Untersuchungen, die sich mit der Hochdruckinaktivierung von Mikroorganismen befassen. Der genaue Mechanismus der bakteriellen Inaktivierung konnte jedoch bislang immer noch nicht eindeutig geklärt werden. Auch die Möglichkeit der Hochdruckanwendung als neuen biotechnologischen Prozeß zur Gewinnung neuartiger Inhaltsstoffe wurde bislang kaum in Erwägung gezogen. Insbesondere fehlen genaue Untersuchungen über die Streßreaktion von Bakterien auf subletalen Hochdruck.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Streßantwort von *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Escherichia coli* gegenüber Hochdruckanwendung zu untersuchen. Diese Streßantwort sollte mit der bei anderen Streßarten auftretenden Antwort verglichen werden. Die Charakterisierung neu bzw. vermehrt gebildeter mRNA bzw. Proteine sollte hierbei zur Konstruktion von Fusionsgenen genutzt werden. Damit sollte zunächst eine Beschreibung der Antwort zellulärer Systeme auf die Hochdruckeinwirkung erfolgen, die zur Abschätzung von Überleben bzw. Resistenz von Mikroorganismen in technischen Prozessen der Lebensmittelindustrie herangezogen werden kann. Die Art und Funktion (z. B. Chaperone) der gebildeten Proteine sollte Hinweise geben auf die letalen Veränderungen in der Zelle, denen sie durch die Antwort entgegenzuwirken versucht, bzw. die Mechanismen, die nach Hochdruckeinwirkung zum Absterben einer Zelle führen.

Weiterhin sollte zur Charakterisierung der hochdruckinduzierbaren Gene und insbesondere deren Promotoren untersucht werden, ob sich das in der Molekularbiologie eingesetzte fluoreszierende Protein GFP als Markerprotein in Genfusionaten für die *in situ* Messung der druckinduzierten Genexpression eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 2.1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen

Mikroorganismus	Stamm*	Charakterisierung	Referenz/ Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	JM 109	<i>endA1, recA1, gyrA96 thi hsdR17(r_k⁻ m_k⁺), relA1, supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac^qZΔM15]</i>	Promega, Mannheim
<i>Escherichia coli</i>	JM 109 DE3	<i>endA1, recA1, gyrA96 thi hsdR17(r_k⁻ m_k⁺), relA1, supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac^qZΔM15], chromosomale T7- RNS polymerase</i>	Promega, Mannheim
<i>Escherichia coli</i>	BL 21	<i>F dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal</i>	Stratagene, Niederlande
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	<i>Δ(mcrA), 183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr), 173 endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac [F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c</i>	Stratagene, Niederlande
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	TMW1.53, DSM20451 ^T	Typstamm	DSMZ, Braunschweig
<i>Lactococcus lactis</i>	MG1363	plasmidfreie Variante von NCDO712, <i>Lac</i> ⁻	GASSON, 1983

* TMW: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan, Deutschland

DSMZ: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen,
Braunschweig, Deutschland

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pGFP	3,3 kb, <i>amp^r</i> , pUC ori, <i>lac</i> , wtGFP	BD Biosciences, Heidelberg
pQBI63 (AFP)	6,3 kb, <i>amp^r</i> , pUC ori, T7, rsGFP (Leu64, Cys65, Thr167)	Qbiogene, Heidelberg
pGFP _{mut1} (EGFP)	3,4 kb, <i>amp^r</i> , pUC ori, <i>lac</i> , GFP _{mut1} (Leu64, Thr65)	BD Biosciences, Heidelberg
pGFP _{mut2}	<i>amp^r</i> , <i>lac</i> , GFP _{mut2} (Ala65, Leu68, Ala72)	CORMACK <i>et al.</i> , 1996
pDsRed	3,4 kb, <i>amp^r</i> , pUC ori, <i>lac</i> , DsRed	BD Biosciences, Heidelberg
pET3a, mod.	<i>amp^r</i> , T7, Modifikation: 6 × His	ROSENBERG, 1987

2.2 Bezugsquellen

Die verwendeten Arbeitsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Enzyme:

Resitriktions- und Ligationsenzyme stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Hybaid-AGS (Heidelberg), MBI- Fermentas (St. Leon-Rot) und Promega (Mannheim), Proteinase K wurde von der Firma Hybaid-AGS (Heidelberg), RNase A von der Firma Roche (Mannheim), und Lysozym von Serva (Heidelberg) bezogen.

Chemikalien:

Die Chemikalien wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Gerbu (Gaiberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisendorf) bezogen.

Oligonukleotide:

Primer wurden von Interactiva (Ulm), MWG Biotech (Ebersberg) oder Roth (Karlsruhe) synthetisiert.

Proteingrößenmarker:

LMW und HMW- Marker wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), Broad Range Standard von BioRad (München) bezogen.

DNS-Größenmarker:

Lambda-DNS *HindIII* verdaut und Lambda-DNS *HindIII/PstI* verdaut wurden von der Firma Hybaid-AGS (Heidelberg) sowie die 100 bp-Leiter von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

2.3 Nährmedien und Zusätze

2.3.1 Nährmedien

Falls nicht näher ausgeführt, wurden alle Medien 20 min. bei 121 °C und 1.013×10^5 Pa Überdruck autoklaviert. Als Kohlenstoffquellen wurden Zucker als sterilfiltrierte Lösungen zugesetzt. Hitzelabile Zusatzstoffe wurden erst zugefügt, wenn die Temperatur des hitzesterilisierten Mediums auf 50 °C abgesunken war. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 14 g/l Agar-Agar (Difco, Augsburg).

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

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

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

Trypton (Casei-Pepton, tryptisch verdaut)	20,0 g	
Hefeextrakt	5,0 g	
Glucose	20 mM	
MgCl ₂	10 mM	
NaCl	10 mM	
KCl	2,5 mM	
MgSO ₄	10 mM	
Aqua _{deion.}	ad 1000 ml,	pH 7,0

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

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	10,0 g	
Fleischextrakt	5,0 g	
Hefeextrakt	5,0 g	
Maltose	10,0 g	
Fructose	10,0 g	
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	2,6 g	
Kaliumdihydrogenphosphat	4,0 g	
Ammoniumchlorid	3,0 g	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	100 mg	
Mangansulfat-Tetrahydrat	50 mg	
Cystein-HCl	0,5 g	
Tween 80 [®]	1 ml	
Aqua _{deion.}	ad 1000 ml,	pH 6,5

MG17 [TERZAGHI und SANDINE, 1975]:

Pepton aus Casein	2,5 g	
Pepton aus Fleisch	2,5 g	
Pepton aus Soja	5,0 g	
Fleischextrakt	5,0 g	
Hefeextrakt	2,5 g	
Ascorbinsäure	0,5 g	
Na-β-Glycerophosphat	19,0 g	
MgSO ₄	0,25 g	
Glucose (1%)	10,0 g	
Lactose (0,5%)	5,0 g	
Aqua _{deion.}	ad 1000 ml,	pH 7,2

2.3.2 Zusatzstoffe für Selektionsmedien

Als Selektionsmedium für *E. coli* JM109 DE3, *E. coli* BL21 und *E. coli* XL 1-Blue mit den rekombinanten Plasmiden wurde LB-Medium mit den folgenden Zusatzstoffen supplementiert:

Ampicillin (Sigma, Steinheim)

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

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Gerbu, Gaiberg)

Die Stammlösung von 200 mg/ml wurden in Aqua_{deion.} gelöst, sterilfiltriert und in einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

2.4 Anzucht und Stammhaltung

2.4.1 Anzucht und Zellernte

Die Anzucht von aerob wachsenden Stämmen erfolgte entweder als Flüssigkultur mit Belüftung oder auf agarhaltigen Nährböden in Petrischalen. Laktobazillen und Laktokokken wurden als Flüssigkultur ohne Belüftung oder auf festen Nährböden im Anaerobiertopf unter Verwendung des Aerocult-Systems (Merck, Darmstadt) bzw. im Anaerobier-Brutschrank mit einem Verhältnis Stickstoff : Kohlendioxid = 80% zu 20% angezogen.

2.4.2 Stammhaltung

Die Bakterien wurden regelmäßig, wenn nötig unter Selektionsdruck (Ampicillin bzw. Chloramphenicol bei Resistenz kodierenden Plasmiden), als Verdünnungsausstriche und 10 ml Flüssigkulturen angezogen und nach Wachstum bei 4 °C aufbewahrt. Eine Kontrolle auf Reinheit erfolgte durch Verdünnungsausstrich und durch Mikroskopieren. Zur längeren Konservierung wurden Glycerinkulturen der entsprechenden Stämme angelegt. Dazu wurden 10 ml einer log-Kultur abzentrifugiert und mit 800 µl frischem Medium resuspendiert. Diese wurden mit 800 µl sterilem Glycerin (80%) vermischt und bei –80 °C gelagert.

2.5 Messung des Bakterienwachstums

2.5.1 Messung der optischen Dichte

Das Bestimmen der optischen Dichte (OD) einer flüssigen Bakteriensuspension erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers NovaspecII (Amersham Biosciences, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm bzw. SpectraFluor (Tecan, Österreich) bei einer Wellenlänge von 590 nm. Bei Extinktionswerten $>0,7$ wurden die Proben mit Medium verdünnt. Als Blindwert diente steriles Medium.

2.5.2 Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten

Zum Bestimmen der Kolonie bildenden Einheiten (KbE) eines Volumens flüssiger Bakteriensuspension wurde mit einem 1 ml Aliquot eine Verdünnungsreihe (Dezimalverdünnung) angelegt, wobei als Verdünnungsmedium eine physiologische Kochsalzlösung mit 0,86% NaCl verwendet wurde. Anschließend wurden 100 μ l jeder Verdünnungsstufe auf festes Nährmedium (Agarplatte) mittels eines Spiralplaters EddyJet 1.2 (IUL Instruments, Königswinter) aufgebracht. Nach Bebrüten bei den für die verwendeten Organismen erforderlichen Bedingungen wurde die Anzahl der Kolonien auf der jeweiligen Agarplatte ausgezählt, wobei nur Platten berücksichtigt wurden, deren Koloniezahl zwischen 30 und 300 lagen. Die Angabe erfolgte als Kolonie bildende Einheiten pro Milliliter (KbE/ml). Bei Mehrfachbestimmungen wurde das gewichtete arithmetische Mittel der Koloniezahlen der auswertbaren Verdünnungsstufen nach der Formel 2.1 errechnet.

$$\tilde{x} = \frac{\sum x}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1} * d \quad \langle 2.1 \rangle$$

\tilde{x} : gewichtetes Mittel der Koloniezahlen

$\sum x$: Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden

n_1 : Anzahl der Petrischalen der niedrigsten Verdünnungsstufe

n_2 : Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe

d : Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

2.6 Bakterienkultivierung bei Streßexperimenten

Falls nicht anders angegeben, wurde die Bakterienkultivierung für Streßexperimente in flüssigem, für den Stamm jeweils erforderlichen Nährmedium durchgeführt. Hierzu wurde eine frische Übernachtskultur 1-2%ig in vorgewärmtes (optimale Wachstumstemperatur) Medium überimpft. Unnötiges Einbringen von Sauerstoff wie etwa durch Schütteln der Bakteriensuspension wurde dabei vermieden. Die Kultur wurde bis zum Streßbeginn bei optimaler Wachstumstemperatur bebrütet. Falls nicht anders angegeben begann die Streßsituation in Experimenten der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 0,4-0,6$. Bei Untersuchungen in der stationären Wachstumsphase wurde die Suspension nicht vor einer optischen Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 1,3$ in die jeweilige Streßsituation überführt.

2.6.1 Hochdruckbehandlung

Für Hochdruckbehandlungen wurden die Kulturen zunächst wie in Kapitel 2.6 beschrieben angezüchtet, bis die gewünschte Dichte der Bakteriensuspension erreicht wurde. Das durch Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in frischem vorgewärmten Medium aufgenommen und in Eppendorfreaktionsgefäße (ERG) bzw. Reagenzgläser überführt und mit Silikonstopfen verschlossen. Diese Behältnisse wurden verschiedenen Drücken ausgesetzt.

2.6.2 Temperaturstreß

Für das Ausüben von Temperaturstreß wurden die Kulturen zunächst wie in Kapitel 2.6 beschrieben, angezüchtet und nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte bei der optimalen Wachstumstemperatur zentrifugiert und das Zellpellet in frischem auf Streßtemperatur vorgewärmten Nährmedium aufgenommen. Dieses Vorgehen ermöglicht ein zeitlich auf Minuten definiertes Ausüben von Temperaturstreß. Die Intensität des Temperaturstress varierte zwischen einzelnen Versuchen und ist im Ergebnisteil dieser Arbeit jeweils beschrieben.

2.6.3 Salzstreß

Für das Ausüben von Salzstreß wurden die Kulturen zunächst wie in Kapitel 2.6 beschrieben angezüchtet, bis die gewünschte Dichte der Bakteriensuspension erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in Medium welches zwischen

0 und 2,5% (w/v) NaCl enthielt, gelöst. Die Salzkonzentrationen wurden direkt in das Medium eingewogen, gelöst und anschließend autoklaviert.

2.6.4 pH-Streß

Für das Ausüben von pH-Streß wurden die Kulturen zunächst wie in Kapitel 2.6 beschrieben angezüchtet, bis die gewünschte Dichte der Bakteriensuspension erreicht wurde. Das durch Zentrifugation erhaltene Pellet wurde anschließend in Nährmedium aufgenommen, welches zusätzlich mit 20 mM Asparaginsäure und 20 mM Zitronensäure gepuffert und zuvor mit HCl bzw. NaOH auf die gewünschten pH-Werte eingestellt wurde.

2.7 Messung der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz von Bakterienzellen, Rohextrakten und gereinigtem Protein wurde in einer schwarzen Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) mit einem SpectraFluor Fluorescence Reader (Tecan, Österreich) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen. Die Detektion der Translation von streßinduzierten GFP-Fusionsgenen in *E. coli* und Online-Messungen unter Druck wurden mit einem Lumineszenz Spektrometer LS50B (Perkin Elmer, Überlingen) bei den optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen von AFP (473 nm; 509 nm) durchgeführt.

2.8 Reinigung fluoreszierender Proteine

2.8.1 Reinigung von wtGFP und red shift Mutanten

Lösung:

Puffer TES: 50 mM Tris*HCL
 50 mM NaCl
 10 mM EDTA, pH 8.0

Die Reinigung von wtGFP und dreier verschiedener rsGFPs (AFP, EGFP, GFP_{mut2}) erfolgte bei Raumtemperatur mittels einer FPLC-Anlage (BioRad). Das Chromatographiematerial wurde von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Die Reinigung erfolgte im wesentlichen in drei Schritten, a) Ammoniumsulfat-Fällung, b) hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, c) Größenausschlußchromatographie.

2.8.1.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Peptide und Proteine lassen sich durch Fällung mit Salzen aus Lösungen präzipitieren. Die zugegebenen Salzionen konkurrieren mit den Proteinen um solvatisierende Moleküle und verdrängen die Proteine aus ihrer Hydrathülle. Der Lösungsmittelvorrat reicht nicht aus, und die Proteine fallen schließlich aus. Dies wird als Aussalzeffekt der Proteine bezeichnet. Dazu wird sehr häufig Ammoniumsulfat verwendet, da dieses Salz eine sehr hohe Löslichkeit besitzt und so Lösungen mit sehr großer Ionenstärke erreicht werden können. Die Ionen stabilisieren zudem die native Struktur, so daß ausgefällte Proteine nicht denaturiert werden. Die Fällung mit Ammoniumsulfat wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

Durchführung:

- 200 ml LB-Medium (vgl. 2.3.1) mit Ampicillin (vgl. 2.3.2) in 1.000 ml Erlenmeyerkolben 1%ig mit ÜK animpfen, bei 37 °C und 220 upm bis zu einer optischen Dichte OD_{578nm} von 0,5 bis 0,6 inkubieren, dann die Bildung von GFP mit IPTG induzieren
- nach weiteren 24 bis 36 h Zellen pelletieren ($5.000 \times g$, 10 min., 4 °C), in 50 ml TES lösen und 10 min. mittels einer Ultraschallsonde UP200S (Dr. Hielscher, Berlin; Einstellungen: 60 Amp., 0,5 Cycle) im Eisbad aufschließen
- lösliche Proteine mit 50% (w/v) Ammoniumsulfat bei den Mutanten bzw. 20% bei wtGFP versetzen und 1 h im Eisbad unter Rühren inkubieren
- zentrifugieren der ausgefällten Proteine bei $5.000 \times g$, 20 min., 4 °C
- Zugabe von 21 g Ammoniumsulfat je 100 ml Überstand, 1 h im Eisbad unter Rühren inkubieren
- Sediment in 5 ml Aqua_{deion.} resuspendieren, unlösliche Partikel entfernen ($5.000 \times g$, 10 min., 4 °C) und Überstand (Fraktion I) für weitere Reinigungsschritte verwenden

2.8.1.2 Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie

Bei der Anwendung hydrophober Säulenmaterialien werden Wechselwirkungen zwischen dem Material und hydrophoben Aminosäuren ausgenutzt, wobei große Mengen an Salz die hydrophoben Wechselwirkungen verstärken. Die hydrophoben Gruppen der Proteine stehen in Wechselwirkung mit den hydrophoben Liganden der Säule. Hydrophile Moleküle binden nicht oder nur ungenügend und werden so mit dem Waschschrift entfernt. Die Elution erfolgt durch eine geringere Salzkonzentration im Elutionsmittel, da diese zu einer Erniedrigung der

hydrophoben Wechselwirkungen führt und sich schließlich die Proteine ablösen. Die Reinigung mittels hydrophober Wechselwirkungs-Chromatographie wurde mit einer 26 ml Phenyl-Sepharose Säule wie folgt durchgeführt.

Lösungen:

Lösung A: 80% TES (vgl. 2.8.1)
 20% Ammoniumsulfat

Lösung B: Aqua_{bidest.}

Durchführung:

- Phenylsepharose-Säule mit Lösung A äquilibrieren
- Auftragen der Fraktion I, mit folgendem Gradienten bei einer Flußrate von 2 ml/min. waschen und eluieren:
 - a) 20 min.: 100% Lösung A
 - b) 50 min.: 100% Lösung A → 100% Lösung B
 - c) 20 min.: 100% Lösung B
 - d) 20 min.: 100% Lösung A
- fluoreszierende Fraktionen vereinigen und mittels Ultrazentrifugation (Centriprep YM-20 Centrifugal Filter Device, Millipore, Schwalbach) aufkonzentrieren (Fraktion II)

2.8.1.3 Größenausschlußchromatographie

Die Größenausschlußchromatographie oder Gelfiltration trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße. Für das Trennverhalten sind das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle und die Größe der Poren im Trenngel entscheidend. Große Moleküle können nicht in die Poren der Gelmatrix eindringen. Kleinere Moleküle hingegen bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den einzelnen Teilchen der stationären Phase sondern dringen auch in ihre Poren ein. Dadurch erfahren sie eine Verzögerung. Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden zuletzt eluiert. Die mobile Phase dient nur als Lösungsmittel und hat keinen Einfluß auf die Trennung. Die Reinigung mittels Größenausschlußchromatographie wurde mit einer Superdex 200 HR-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) wie folgt durchgeführt.

Lösung:

Puffer TES: vgl. 2.8.1

Durchführung:

- Superdex 200 HR-Säule mit TES-Puffer (vgl. 2.8.1) äquilibrieren
- Auftragen der Fraktion II und mit einer Flußrate von 0,4 ml/min. eluieren
- Fluoreszierende Fraktionen vereinigen und mittels Ultrazentrifugation (Centriprep YM-20 Centrifugal Filter Device, Millipore, Schwalbach) entsalzen und aufkonzentrieren
- gereinigtes Protein in Speed-Vac bis zur Trockne eindampfen

2.8.2 Reinigung von DsRed mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie

Bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie ist eine Metall-chelatierende Gruppe (meist Imidodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure oder Tris(carboxymethyl)ethylendiamin am Säulematerial immobilisiert. An dieses Trägermaterial werden multivalente Übergangsmetall-Ionen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} oder Fe^{3+} gebunden, die in der Lage sind mit einem Polyhistidin-Schwanz (His-Tag) rekombinanter Proteine einen Chelatkomplex zu bilden. Nach dem Waschen der Säule werden die mit einem His-Tag versehenen rekombinanten Proteine durch eine EDTA-Lösung aus dem Komplex verdrängt. Die Reinigung von rekombinanten, mit einem Polyhistidin-Anhang versehenen DsRed wurde mit einer 6 ml HiTrap Chelating HP-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Lösungen:

Puffer PBS:	1,44 g/l Na_2HPO_4	
	0,24 g/l KH_2PO_4	
	0,20 g/l KCl	
	8,00 g/l NaCl,	pH 7,4
8 x Phosphatpuffer:	14.2 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
	11.1 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	
	233.8g/l NaCl,	pH 7,4
Imidazolstammllösung (2M):	136,2 g/l Imidazol,	pH 7,4

Startpuffer:	6,25 ml 8 × Phosphatpuffer
	0,25 ml Imidazolstammlösung
	43,5 ml Aqua _{deion.}
Waschpuffer:	6,25 ml 8 × Phosphatpuffer
	3,75 ml Imidazolstammlösung
	40,0 ml Aqua _{deion.}
Elutionspuffer:	6,25 ml 8 × Phosphatpuffer
	10,0 ml Imidazolstammlösung
	33,75 ml Aqua _{deion.}

Durchführung:

- 200 ml LB-Medium (vgl. 2.3.1) mit Ampicillin (vgl. 2.3.2) in 1.000 ml Erlenmeyerkolben 1%ig mit ÜK animpfen, bei 37 °C und 220 upm bis zu einer optischen Dichte OD_{578nm} von 0,5 bis 0,6 inkubieren und dann mit IPTG die Bildung von DsRed induzieren.
- Zellen pelletieren (5.000 upm, 10 min., 4 °C) und mit 10 ml PBS waschen
- Pellet in 5 ml Startpuffer aufnehmen, 2 min. mit Ultraschallsonde (HD-70, Bandelin Electronics, Berlin; Einstellung: Cycle 30%, Power 90%) im Eisbad aufschließen, Überstand abziehen und Pellet zwei Mal mit 5 ml Startpuffer extrahieren; Überstände vereinigen
- Entfernen der unlöslichen Partikel (5.000 upm, 4 °C, 20 min)
- Säulenmaterial mit Startpuffer äquilibrieren
- Auftragen des Rohextrakts und mit folgendem Stufengradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min. waschen und eluieren:
 - a) 12 min.: Startpuffer
 - b) 30 min.: Waschpuffer
 - c) 12 min.: Elutionspuffer
- fluoreszierende Fraktionen vereinigen und mittels Ultrazentrifugation (Centriprep YM-20 Centrifugal Filter Device, Millipore, Schwalbach) entsalzen und aufkonzentrieren
- gereinigtes Protein in Speed-Vac bis zur Trockne eindampfen

2.9 Probenaufbereitung für die 2D-Gelelektrophorese

Lösungen:

PBS-Puffer:	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l	
	KH ₂ PO ₄	0,24 g/l	
	KCl	0,20 g/l	
	NaCl	8,00 g/l,	pH 7,4
Harnstoffpuffer:	Harnstoff	7 M	
	Thioharnstoff	2 M	
	CHAPS	4% (w/v)	
	DTT	2% (w/v)	
	Pharmalyte 3-10	2% (v/v)	
SDS-Puffer:	Tris/HCl	100 mM	
	SDS	1% (w/v)	pH 9,5

Durchführung:

Bei der im Folgenden beschriebenen Herstellung von Rohextrakten für die Analyse mittels zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde der oben beschriebene SDS-Puffer während des Zellaufschlusses verwendet. Das aus 20 ml unbehandelter oder streßbehandelter Zellkultur abzentrifugierte Pellet (30 °C, 9.000 x g, 3 min.) wurde einmal mit 20 ml vortemperierten PBS-Puffer gewaschen (30 °C, 9.000 x g, 3 min.), in 200 µl SDS-Puffer aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße (ERG) überführt. Anschließend erfolgte in zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden Intervallen zu je 30 Pulsen der Zellaufschluß mittels eines Ultraschallgeräts (HD-70, Bandelin Electronics, Berlin; Einstellung: Cycle 30%, Power 90%). Während der Ultraschallbehandlung wurde die Zellsuspension in einem eisgekühlten Metallblock vor dem Erwärmen geschützt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (14.000 upm, 4 °C, 30 min.) und die als Überstände erhaltenen Rohextrakte bei -80 °C eingefroren bzw. zur Bestimmung des Proteingehalts (vgl. 2.10) verwendet. Vor der isoelektrischen Fokussierung wurde die Probe auf eine SDS-Konzentration von weniger als 0,25% SDS/ml mit Harnstoffpuffer verdünnt.

2.10 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2.10.1 Coomassie Blue Protein Assay [BRADFORD, 1976]

Lösungen:

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

Proteinstandard: Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BioRad, München)

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Rinderserumalbumin als Eichsubstanz. Die Bestimmungsmethode beruht dabei auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs in saurer Lösung von 465 nm auf 595 nm nach der Zugabe von Protein, hervorgerufen durch die Stabilisierung der anionischen Form der Farbreagenz durch hydrophobe und ionische Interaktion. Der Farbstoff reagiert dabei grundsätzlich mit Arginin-, Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninresten [STOSCHEK, 1990]. War die Konzentration der Zellrohextrakte nicht im linearen Meßbereich der Eichkurve, so wurden die Probenlösungen entsprechend mit Aqua_{deion.} verdünnt.

2.10.2 Absorption bei 280 nm [nach STOSCHEK, 1990]

Für Proteinmischungen kann als Annäherung eine direkte Korrelation der Konzentration in Milligramm pro Milliliter zur Absorption des Proteins bei 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$) angenommen werden. Da Nukleinsäuren sehr stark bei 280 nm absorbieren führen Zellrohextrakte die RNS und DNS beinhalten fälschlicherweise zu hohen Proteinkonzentrationen, weshalb der erhaltene Wert zusätzlich durch die Absorption bei 260 nm ($A_{260 \text{ nm}}$) nach folgender Formel korrigiert wurde:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 1,55 A_{280 \text{ nm}} - 0,76 A_{260 \text{ nm}} \quad \langle 2.2 \rangle$$

2.11 FTIR-Spektroskopie

Mittels der FTIR-Spektroskopie ist es möglich Änderungen der Sekundärstruktur von Proteinen in Abhängigkeit von Temperatur und Druck zu messen. Das Spektrum der Proteine ist dabei im wesentlichen auf die Schwingung der Peptidbindungen des Proteinrückgrates zurückzuführen. Insgesamt neun Absorptionsbanden der Peptidschwingung werden

beobachtet und nach MIYAZAWA und BLOUT (1961) als AmidA-, AmidB- und AmidI- bis VII-Banden bezeichnet. Die genaue Lage der AmidI-Bande und der AmidII-Bande hängt von der Stärke der Wasserstoffbrücken der Carbonyl- und NH-Gruppen des Proteinrückgrates ab. Da die verschiedenen Sekundärstrukturelemente, wie die α -Helix oder das β -Faltblatt, eine definierte Geometrie aufweisen, die durch charakteristische Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Sekundärstrukturelementen und Frequenz der AmidI- und der AmidII-Bande.

Die Untersuchung der Druckstabilität von GFP wurde mit einer Diamantamboßzelle (Diacell Products Ltd., England) durchgeführt. Die Ausgangsdicke des Probenbehälters betrug 0,05 mm. Der Druck wurde mittels BaSO₄ als internem Standard nach der Methode von WONG und MOFFAT (1989) bestimmt. Die Temperatur wurde über ein Thermoelement gemessen und betrug 25 °C. Die temperaturinduzierte Auffaltung von GFP wurde in einer, mit einem CaF₂-Fenster und einer Teflondichtung von 50 μ m ausgestatteten Zelle aufgenommen. Die Zelle wurde in einen Thermomantel eingebracht, dessen Temperatur um 1 °C pro 5 Minuten zunahm und von einem Graseby Specac Automatic Temperatur Controller (Graseby Specac, England) reguliert wurde. Die Infrarotspektren wurden mit einem Bruker IFS66FTIR Spektrometer aufgenommen, das mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellurit-Detektor ausgestattet war und mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Es wurden 250 Interferogramme mit einer Auflösung von 2 cm⁻¹ aufgenommen und gemittelt, um ein gutes rauscharmes Signal zu erhalten.

Die Proben wurden in mit schwerem Wasser hergestellten Tris*HCl-Puffer (20 mM, pD = pH + 0,4 = 8,0) in einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um einen Austausch aller zugänglicher Protonen durch Deuteriumionen zu ermöglichen. AFP wurde des weiteren in Acetatpuffer mit einem pD-Wert von 3,5 bzw. 5,6 aufgenommen, um den Effekt des pH-Werts auf die druckinduzierte Auffaltung des Proteins zu untersuchen. Es wurde Acetatpuffer gewählt, da dieser im Gegensatz zu einem Succinatpuffer keine Überlappung mit der Absorption des IR-Spektrums des Proteins zeigt.

2.12 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Lösungen:

Sammelgel (4%):	Aqua _{deion.}	6,1 ml
	1,5 M Tris*HCl, pH 8,8	2,5 ml
	25% (w/v) SDS-Lösung	40,0 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid (29/1)	1,3 ml
	10% Ammoniumpersulfat	50,0 µl
	TEMED	5,0 µl
Trenngel (12%):	Aqua _{deion.}	3,35 ml
	1,5 M Tris*HCl, pH 8,8	2,50 ml
	25% (w/v) SDS-Lösung	40,0 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid (29/1)	4,0 ml
	10% Ammoniumpersulfat	50,0 µl
	TEMED	5,0 µl
5× Laufpuffer:	Tris*HCl	9,0 g
	Glycin	43,2 g
	SDS	3,0 g
	Aqua _{deion.}	ad 600 ml, pH 8,3
Probenpuffer:	0,5 M Tris*HCl, pH 6,8	1,0 ml
	87% Glycin	0,92 ml
	25% (w/v) SDS-Lösung	0,7 ml
	2-Mercaptoethanol	0,4 ml
	1% Bromphenolblau	0,4 ml
	Aqua _{deion.}	4,58 ml

Verwendete Geräte:

Mini-Protean II Electrophoresis Cell (BioRad, München)

Gel dryer GD-1 (Heto-Lab Equipment)

Spannungsquelle MWG-Biotech, Power supply PPS 200-100

In Anlehnung an die von LAEMMLI (1970) beschriebene Methode wurde eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts erzielt, wobei diese mit Natriumdodecylsulfat - Molekülen (SDS) umgeben werden und somit die Eigenladung maskiert wird. Hierzu wurde ein Teil der Probe in vier Teilen Probenpuffer aufgenommen und 10 min. bei 85 °C denaturiert.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 180 V, 120 mA, 50 min. in einer Vertikalapparatur Mini-Protean II Electrophoresis Cell der Firma BioRad (München).

Für die Proteinfärbung wurde das Gel mit einer der unter 2.14 beschriebenen Methoden gefärbt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde einer der unter 2.2 beschriebenen Größenstandards verwendet.

Das Gel wurde nach dem Färben unter Vakuum für 1,5 h bei 80 °C in Cellophanfolie getrocknet.

2.13 Auftrennung von Proteinen mittels zweidimensionaler Elektrophorese

Die hochauflösende zweidimensionale (2-D) Polyacrylamidgelelektrophorese wird eingesetzt, um komplexe Proteingemische in eine weitaus größere Anzahl von Einzelkomponenten aufzutrennen, als dies durch eindimensionale elektrophoretische Trenntechniken möglich ist. Die 2-D Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt) wird nach der Methode von GÖRG *et al.* (1995, 1999, 2000) durchgeführt. Die Trennung von Proteingemischen gliedert sich im wesentlichen in die drei Schritte a) isoelektrische Fokussierung, b) Äquilibrierung und c) Trennung nach dem Molekulargewicht mittels der Natriumdodecylsulfat-Poylacrylamid-Gelelektrophorese.

2.13.1 Isoelektrische Fokussierung

Lösungen:

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

Materialien:

Immobiline DryStrip pH 5.5-6.7, 18 cm

Immobiline DryStrip pH 4-7, 18 cm

Immobiline DryStrip Reswelling Tray

Immobiline DryStrip Kit

Geräte:

Multiphor II

Electrophoresis Power Supply-EPS 3501 XL

MultiTempIII Thermostatic Circulator

Bei der isoelektrischen Fokussierung wird ein Polyacrylamidgelstreifen mit eingegossenem, immobilisierten pH-Gradienten verwendet. Die Proteine der Probe wandern in der Gelmatrix in einem elektrischen Feld genau soweit, bis sie die Stelle im pH-Gradienten erreicht haben, an welcher der isoelektrische Punkt (pI) des Proteins dem pH-Wert seiner Umgebung entspricht. An diesem Punkt ist die Nettoladung gleich Null und somit kann durch das elektrische Feld keine Kraft mehr auf das Protein einwirken.

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden kommerziell erhältliche IPG-Streifen (Amersham Biosciences, Freiburg) mit verschiedenen pH-Gradienten verwendet. Es wurden stets 10 gleiche IPG-Streifen gleichzeitig verwendet. Diese getrockneten pH-Gradienten wurden zunächst im Immobiline DryStrip Reswelling Tray über Nacht mit 350 µl Quelllösung rehydriert, wobei die Quellflüssigkeit vorgelegt wurde. Die Streifen wurden mit der Gelseite nach unten Luftblasenfrei aufgelegt und anschließend mit 1,5 ml inertem Öl überschichtet. Die gequollenen Streifen wurden mit Aqua_{deion.} gespült und auf die auf 20 °C temperierte Kühlplatte aufgelegt. Anschließend wurden die Probencups in der Nähe der Anode, mit 1 ml Wasser getränkte Elektrodenstreifen und die Elektroden wie vom Hersteller beschrieben vorsichtig angebracht. Die IPG-Streifen und die Probencups wurden mit Öl überschichtet. Die Proben wurden in die Probencups unter das Öl pipettiert und dann das elektrische Feld in Abhängigkeit vom pH-Gradienten und der Art der Untersuchung (analytisch, präparativ) angelegt (vgl. Tabelle 2.3). Die Elektrodenstreifen wurden alle zwei Stunden gewechselt. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen bei -80 °C eingefroren oder unmittelbar für die anschließenden Schritte verwendet.

Tabelle 2.3: Parameter der isoelektrischen Fokussierung

	Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit
Analytische IEF				
pH 4-7	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	} 42.000 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	
Mikropräparative IEF				
pH 4-7	50 V	0,5 A	50 W	16 h
	300 V	0,5 A	50 W	1 h
	3.500 V	0,5 A	50 W	18 h

2.13.2 Äquilibrierung

Vor der Trennung der Proteine nach dem Molekulargewicht werden diese nach dem Prinzip von LAEMMLI (1970) zur Kaschierung der Eigenladung mit SDS-Molekülen umgeben. Diese Beladung mit negativer Ladung geschieht unter denaturierenden Bedingungen. Als denaturierendes Agens dient Dithiothreitol (DTT). Anschließende Behandlung mit Iodacetamid soll die erneute Verknüpfung von Cysteinbindungen verhindern. Die Äquilibrierung der IPG-Streifen wurde nach dem Entfernen des Öls im Immobiline DryStrip Kit durchgeführt, wobei zum Fixieren der Gelstreifen eine Elektrode verwendet wurde. Die Äquilibrierung erfolgte zunächst 15 min. mit Äquilibrierungslösung 1, anschließend 15 min. mit Äquilibrierungslösung 2.

Lösungen:

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

Äquilibrierungslösung 1: Äquilibrierungspuffer 100 ml
DTT 1 g

Äquilibrierungslösung 2: Äquilibrierungspuffer 100 ml
Iodacetamid 4 g

2.13.3 SDS-PAGE zur Trennung in der zweiten Dimension

Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht beruht auf dem selben Prinzip wie die eindimensionale SDS-PAGE (vgl. 2.12). Die äquilibrierten Probestreifen werden dazu luftblasenfrei auf ein Polyacrylamidgel gelegt und mit Agarose fixiert, die mit dem geladenen Farbstoff Bromphenolblau versetzt wurde. Der Probeneinlauf in das Gel erfolgte für eine Stunde bei 80 mA, 200 V, die elektrophoretische Trennung bis zum Austritt der Bromphenolblau nach ca. 16h bei 165 mA und 200 V in einer Vertikalapparatur Hoefer DALT multiple Electrophoresis Tank (Amersham Biosciences, Freiburg) mit bis zu 10 Gelen der Größe 20 × 23 cm. Die Temperatur betrug bei beiden Schritten 20 °C. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde einer der in Kapitel 2.2 beschriebenen Größenstandards verwendet. Analytische Gele wurden nach der in Kapitel 2.14.2, mikropräparative Gele nach der in Kapitel 2.14.1 beschriebenen Methode gefärbt.

Die Gele wurden nach dem Schrumpfen zur Dokumentation und weiteren computergestützten Auswertung mittels eines Durchlichtscanners 1600 Pro (Epson, Düsseldorf) digitalisiert. Die Unterschiede in der Proteinexpression wurden visuell und mittels des Computerprogramms Image Master 2D (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt. Zur besseren Konservierung wurden die Gele nach dem Scannen feucht in Klarsichtfolien eingeschweißt.

Lösungen:

Glycerinlösung: Glycerin 87% 87 ml
Bromphenolblau 1 ml
Aqua_{deion.} 62 ml

Puffer 1:	Tris	90,83 g
	SDS	2,00 g
	In 300 ml deion. Wasser aufnehmen, mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,6 einstellen, filtrieren und auf 500 l auffüllen.	
Puffer 1-gesättigtes Butanol:	20 ml Puffer 1 mit 30 ml 2-Butanol ausschütteln und 2-Butanol abdekantieren	
Gellösung (12%):	Acrylamidlösung (29/1)	389,5 ml
	Puffer 1	250,0 ml
	Aqua _{deion.}	315,0 ml
	Glycerin	50,0 g
	TEMED	55,0 µl
	Ammoniumpersulfat (10%)	7,0 ml
Tankpuffer:	SDS	19,9 g
	Glycin	299,6 g
	Tris	58,0 g
	Aqua _{deion.}	19,9 l
Agaroselösung:	Agarose	250,0 mg
	Tankpuffer	49,0 ml
	Bromphenolblau	1,0 ml

Geräte:

Gelgießstand Hoefer Dalt Gel Caster

10 × Hoefer Dalt Gel Kassetten, Dicke: 1,5 mm

Hoefer Dalt multiple Electrophoresis Tank mit Umwälzpumpe

Wasserbad MultiTemp III Thermostatic Circulator

Spannungsgeber EPS 3501 XL

Alle genannten Geräte stammten von Amersham Biosciences, Freiburg.

Durchführung:

- die gereinigten trockenen Gel-Kassetten zusammen mit Spacerplatten in den Gelgießstand stellen
- zwischen jede Kassette und zwischen die Spacer zur besseren Trennung nach der Polymerisation eine Plastikfolie legen und Gießstand verschließen
- Gellösung über Trichter einfüllen, Trichterschlauch herausziehen
- jedes Gel mit 2 ml Puffer 1 gesättigter Butanolösung überschichten und Kammer mit Folie abdecken
- Gele mind. 12 h polymerisieren lassen
- Gelkassetten voneinander trennen, gründlich reinigen und Flüssigkeit ablaufen lassen
- Molekulargewichtsmarker auf Filterstück auftragen und antrocknen lassen
- äquilibrierten IPG-Streifen in Tankpuffer tauchen, abtropfen lassen und mit Spatel in die Kassette einlegen
- Molekulargewichtsmarker einlegen
- Streifen mit 3 ml vorgewärmter Agaroselösung fixieren
- Gelkassetten in Kämme stecken, überstehenden Tankpuffer absaugen und Lauf starten
- nach Beendigung des Laufs Kassetten kurz abspülen, vorsichtig öffnen und Gele färben

2.14 Proteinfärbungen in Polyacrylamidgelen

2.14.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Blau-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet um die durch die 2D-Elektrophorese aufgetrennten Proteine in der Gelmatrix zu visualisieren. Einerseits ist diese Färbemethode weniger sensitiv wie andere Färbemethoden, z.B. Silberfärbung oder Fluoreszenzfärbung, andererseits eignet sie sich besser um quantitative Unterschiede darzustellen (NEUHOFF *et al.*, 1988). Auch ist es bei dieser Färbemethode einfacher im Anschluss Proteine zu sequenzieren.

Lösungen:

Fixierlösung: 40% Ethanol, 10% Eisessig

Waschlösung: 25% Ethanol, 8% Eisessig

- Färbelösung:** 0,1% ServaBlueR in 45% Ethanol, 10% Eisessig
(400 mg ServaBlueR in 180 ml ca. 1 h lösen. 40 ml Eisessig in 180 ml
Aqua_{deion.} dazugeben)
- Entfärbelösung:** 25% Ethanol, 8% Eisessig

Durchführung:

Es werden je Gel ca. 200 ml Lösung verwendet, so dass das Gel vollständig benetzt ist. Die Färbewannen werden während aller Schritte mit 60 Umdrehungen pro Minute geschwenkt.

Fixierung: 1 Stunde oder über Nacht

Waschen: 30 Minuten

Färben: 30 bis 45 Minuten

Entfärben: 1 × 10 Minuten

2 × 30 bis 60 Minuten

Den Hintergrund hierbei nicht ganz entfärben und die Gele anschließend über Nacht in Aqua_{deion.} mit etwas Entfärbelösung schwenken.

2.14.2 Färbung mit Ponceaurot

Im Gegensatz zu Coomassie-Blau kann Ponceaurot wieder aus SDS-Gelen entfernt werden, so daß eine anschließende Antikörperreaktion nicht beeinflusst wird. Im Einzelnen wird das zu färbende SDS-Gel für mindestens 5 min. mit Ponceau S (Amersham Biosciences, Freiburg) unter leichtem schwenken inkubiert. Eine Erhöhung der Temperatur beschleunigt den Färbvorgang. Nach erfolgter Digitalisierung des Gels kann der Farbstoff durch schwenken in Phosphatpuffer (vgl. 2.8.2) wieder entfernt werden. Die Dauer des Entfärbvorgangs kann je nach Proteinkonzentration und Intensität der Färbung stark variieren. Gegebenenfalls ist der Phosphatpuffer mehrere Male zu wechseln.

2.14.3 Silberfärbung [BLUM *et al.*, 1987; (mod.)]

Im Gegensatz zur Coomassie-Blau-Färbung ist die Silberfärbung wesentlich sensitiver [MERRILL *et al.*, 1981; SWITZER *et al.*, 1979], eignet sich allerdings im Hinblick auf die Intensität der Färbung eines Proteinspots nicht so gut zur densitometrischen Auswertung. Über die Spotgröße eines angefärbten Proteins im Gel ist allerdings eine semiquantitative Bewertung möglich.

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung: 40% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)

Thiosulfatreagenz: 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat

Silbernitratreagenz: 0,2% (w/v) Silbernitrat (MERCK)
0,02% (v/v) Formaldehyd (37%)

Entwickler: 3% (w/v) Natriumcarbonat
0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)
0,0005% (w/v) Natriumthiosulfat

Stoppreagenz: 0,5% (w/v) Glycin

Schrumpflösung: 30% Ethanol
12% (w/v) Glycerin

Für die Herstellung aller Lösungen wurde Aqua_{bidest.} verwendet. Soweit nicht anders angegeben ist der Hersteller nicht entscheidend für die Sensitivität des Färbeprotokolls. Alle Reagenzien sollten analytische Reinheit aufweisen. Die Silbernitratreagenz und der Entwickler sollten kühl gestellt werden und die Formaldehydlösung erst kurz vor der Verwendung der Reagenzien zugegeben werden.

Durchführung:

Fixieren: 3 Stunden
Waschen: 3 × 20 Minuten
Sensibilisieren: 1 Minute (Thiosulfatlösung)
Waschen: 3 × 20 Sekunden
Silbern: 20 Minuten
Waschen: 2 × 20 Sekunden
Entwickeln: ca. 5 Minuten
Waschen: 1 × 20 Sekunden
Stoppreagenz: 5 Minuten
Waschen: 3 × 10 Minuten
Schrumpfen: 5 Minuten

Zur Konservierung wurden die Gele einzeln naß in eine Folie eingeschweißt.

2.15 Interne Sequenzierung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen

Die interne Sequenzierung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen wurde als Auftragsarbeit von der Firma TopLab (Martinsried) durchgeführt. Es wurde eine Spaltung mit den Endoproteinasen Trypsin, Lys-C oder Asp-N vorgenommen. Die erhaltenen Peptide wurden über eine 300 µm × 150 mm Kapillar-HPLC-Säule (Vydac RP18, LC Packings) getrennt und die gesammelten Fraktionen mittels MALDI-MS auf für die Sequenzierung geeignete Peptide geprüft. Einzelne geeignete Peptide wurden N-Terminal nach der Methode von EDMAN in einer Modifikation nach HUNKAPILLER *et al.* (1983) sequenziert. Es wurde ein Aminosäuresequencer Procise 492 der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt) mit Online PTH Analyser 140 C und UV Detektor 785 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit den vom Hersteller (Applied Biosystems, Weiterstadt) gelieferten Chemikalien und Reagenzien, und unter Verwendung der Programme Pulsed Liquid (Reaktionszyklus, Konvertierungszyklus und Gradientenprogramm für die PTH-Trennung).

2.16 Detektion von GFP mittels Western Blotting

Mit der hier beschriebenen Methode wurde die Bildung an GFP in *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.53 unter der Kontrolle eines Maltosepermeasepromotors und in *Escherichia coli* JM109 DE3 unter der Kontrolle der Hitzeschockpromotoren der Gene *rpoH*, *clpB*, *dnaK* und *groE* untersucht. Hierzu wurden die Zellen zunächst in Medium mit Maltose als einzige Kohlenstoffquelle (*Lb. sanfranciscensis*) bzw. unter Hitzeschockbedingungen (*E. coli*) inkubiert. Die in TE-Puffer (vgl. 2.17) löslichen Zellproteine und die mittels 8 M Harnstofflösung aus dem unlöslichen Pellet extrahierten Proteine wurden zunächst über SDS-PAGE (vgl. 2.12) aufgetrennt, dann über Elektro-Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Trennung der Proteine wurde vor dem Transfer durch Anfärbung mit Ponceau S kontrolliert (vgl. 2.14.2). Vor der Reaktion des Blots mit GFP-spezifischen Antikörpern wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit BSA abgesättigt. An die GFP-spezifischen Antikörper wurde ein zweiter enzymmarkierter Antikörper (alkalische Phosphatase) angekoppelt. Das nun mit dem nachzuweisenden Protein indirekt verbundene Enzym konnte eine anschließende Farbreaktion starten [HORWITZ *et al.*, 1972]

Lösungen:

Kathodenpuffer:	Tris	25 mM	
	Glycin	40 mM	
	Methanol	10%	pH 9,4
Anodenpuffer I:	Tris	0,3 M	
	Methanol	10%	pH, 10,4
Anodenpuffer II:	Tris	25 mM	
	Methanol	10%	pH 10,4
PBS:	vgl. 2.8.2		
Wasch-Puffer (PBS-T):	Tween 20	0,1 Vol.-% in PBS	
Blocking-Reagenz (PBS-T-BSA):	5% BSA in PBS-T		
Reaktionspuffer:	NaCl	100 mM	
	MgCl ₂	5 mM	
	Tris*HCl	100 mM	
	Aqua _{deion.}	ad 1000 ml	pH 9,5
NBT-Lösung:	NBT	5% (w/v)	
	DFMA	70% (w/v)	
BCIP-Lösung:	BCIP	5% (w/v)	
Färbelösung:	NBT-Lösung	66 µl	
	Reaktionspuffer	10 ml	
	BCIP-Lösung	33 µl	
Stop-Lösung:	20 mM EDTA in PBS		
Primäre Antikörperlösung:	Anti-GFP-Serum 1:100 in PBS-T-BSA		
Sekundäre Antikörperlösung:	Phosphatase konjugierte	Anti-Kaninchen-Antikörper	
	1:10.000 in PBS-T		

Geräte:

Semi-Dry Elektrobloetter OWL (Peqlab, Erlangen)

Electrophoresis Power Supply-EPs 3501 XL

Durchführung:

- Proteingel 15 min. in Kathodenpuffer inkubieren
- Nitrocellulose-Membran mit Anodenpuffer II befeuchten
- Whatman-Papiere mit Anoden bzw. Kathodenpuffer befeuchten und Anlage wie in Abbildung 2.1 aufbauen
- Transfer erfolgt in 30 bis 45 min. bei 15 V, 400 A
- 5 min. Membran mit PBS-T waschen
- Sättigen freier Proteinbindungsstellen mit PBS-T-BSA für 30 min. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C
- 5 min. Membran mit PBS-T waschen
- Membran 1 h in primärer Antikörperlösung inkubieren
- Membran mindestens 3 × 10 min. in PBS-T waschen
- Membran 1 h in sekundärer Antikörperlösung inkubieren
- Membran 3 × 5 min. in PBS-T waschen
- Membran 5 min. in Reaktionspuffer inkubieren
- Inkubation der Membran in Färbelösung; Farbreaktion sollte nach max. 30 min. abgeschlossen sein
- Inkubation der gefärbten Membran in Stop-Lösung für 10 min.
- Trocknen der Membran

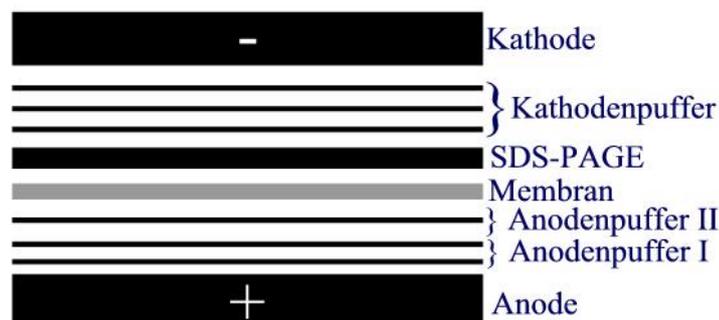


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blotting-Apparatur

2.17 Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNS [MARMUR, 1961 (mod.)]

Alle Lösungen wurden, soweit nicht ausdrücklich anders vermerkt, autoklaviert. Enzymlösungen wurden entweder frisch oder in größerem Maßstab hergestellt, aliquotiert, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und nicht autoklaviert. Lösungsmittel war Aqua_{deion.} bzw. Pufferlösungen.

Lösungen:

Tris-EDTA-Puffer (TE):	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	10 mg/ml Lysozym (Boehringer, Mannheim) in Tris-EDTA-Lösung, pH 8,0
SDS-Lösung:	25% (w/v) Natriumdodecylsulfat (nicht autoklaviert)
NaCl-Lösung:	5 M NaCl
Waschpuffer:	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 (Boehringer, Mannheim)

Durchführung:

a) Lyse der Zellen:

- Zellen für 10 min. bei 5000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugieren
- Zellen in Waschpuffer resuspendieren und erneut abzentrifugieren
- Zellen in 10 mg/g Naßgewicht TE-Puffer resuspendieren
- Zugabe von 0,1 ml Lysozym-Lösung je 10 ml Zellsuspension
- Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min. bis 2 h oder bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht (Viskositätserhöhung zeigt Lyse an)
- Zugabe von SDS bis zu einer Endkonzentration von 2% (Vervollständigung der Lyse)
- zur Inaktivierung von DNasen 10 min. bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren und abzentrifugieren

- Zugabe von 5 M NaCl-Lösung bis zur Endkonzentration von 1 M NaCl (Protein fällt aus, DNS bleibt in Lösung)
- Lysat auf 0 °C abkühlen

b) Reinigung der hochmolekularen DNS:

Phenolchloroformextraktion:

- Zugabe von 1 Vol Phenol: Chloroform-Isoamylalkohol (1:1)
- Inkubation für 20 min. unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 5 min. bei 6.000 g, RT
- Abheben der oberen, wässrigen DNS-haltigen Phase
- Wiederholung mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) bis keine Interphase mehr sichtbar ist

Isopropanolfällung:

- Zugabe von 1/9 Vol Natriumacetat-EDTA-Lösung und 0,6 Vol Isopropanol
- langsames Schwenken macht DNS an der Grenze als weiße Fäden sichtbar
- ausgefällte, hochmolekulare DNS mit steriler Pasteurpipette aufwickeln oder zentrifugieren
- DNS an der Luft trocknen und in TE-Puffer aufnehmen

c) RNase-Behandlung:

- RNase A-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml DNS-Lösung zugeben
- Inkubation bei 37 °C für 1 h

d) Proteinase K-Behandlung:

- Proteinase K-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml DNS-Lösung zugeben
- Inkubation für 1 h bei 50 °C
- Phenol-Chloroform-Extraktion
- Zugabe von 2,5 Vol Ethanol
- Zentrifugation für 10 min. bei 12.000 g, 4 °C
- Entfernen der wässrigen Lösung
- Lufttrocknung des DNS-Pellets
- DNS in TE-Puffer oder Aqua_{deion.} lösen und bei -20 °C lagern

2.18 Isolierung von Gesamt-RNS

Um eine Kontamination mit RNase zu vermeiden wurden alle Glaswaren, Spitzen und Spatel mehrfach autoklaviert. Verwendete Lösungen wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelten Wasser hergestellt. Beim Umgang mit RNS wurden stets puderfreie Handschuhe getragen. Zur Inhibierung der RNasen wurde die Reagenz Bacteria Protect (Qiagen, Hilden) wie unten beschrieben eingesetzt. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasyTM Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) mit folgenden Abwandlungen.

Für die Isolierung der Gesamt-RNS bei *Lactobacillus sanfranciscensis* wurden 5,0 ml Zellkultur der optischen Dichte 0,5, gemessen bei 578 nm, mit 10 ml Bacteria Protect Reagent versetzt, pelletiert (5000 × g, 3 min., 4 °C) und mit vorgekühltem TE-Puffer gewaschen (5000 × g, 3min., 4 °C). Das Zellpellet wurde in 100 µl Aufschlußpuffer (TE-Puffer mit 10 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 10 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung nach Zugabe des Lysepuffers RLT aus dem Mini-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers, wobei die Option einer DNase Behandlung nach den Angaben des Herstellers auf der Säule wahrgenommen wurde. Die Gesamt-RNS wurde mit zwei mal 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Isolierung der Gesamt-RNS bei *Escherichia coli* JM109 DE3 wurden 20,0 ml Zellkultur der optischen Dichte 0,5, gemessen bei 578 nm, mit 40 ml Bacteria Protect Reagent versetzt. Die Isolierung erfolgte analog zum Vorgehen bei *Lb. sanfranciscensis*, wobei zum Aufschluß die Zellen in 1,0 ml TE-Puffer mit 1,0 mg/ml Lysozym aufgenommen wurden. Die Isolierung erfolgte mittels des Midi-Kits, wobei ein DNase-Verdau erst nach dem Eluieren der RNS mit 250 µl wie folgt durchgeführt wurde.

Reaktionsansatz:

RNS (ca. 400 µg):	250 µl
25 mM MgCl ₂ :	62,5 µl
200 mM Tris-Puffer, pH 8,0:	35 µl
DNaseI, 10 U/µl (RNase-frei):	7 µl

Durchführung:

- Reaktionsansatz für 30 min. bei 30 °C inkubieren
- Zugabe von einem Volumen Phenol: Chloroform-Isoamylalkohol (1:1)
- 1 min. vortexen und für 2 min. bei 12.000 upm zentrifugieren

- obere wäßrige Phase in neues ERG überführen
- Zugabe von einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol
- 1 min. vortexen und für 1 min. bei 12.000 upm zentrifugieren
- obere wäßrige Phase in neues ERG überführen
- Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M NaCl und 2 Volumina Ethanol (abs.), mischen
- 45 min. bei -20 °C inkubieren
- bei 14.000 upm für mindestens 10 min. zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Pellet mit 500 µl Ethanol (70%-ig) überschichten
- bei 14.000 upm für mindestens 7 min. zentrifugieren
- Überstand vorsichtig entfernen und Pellet an der Luft trocknen
- RNS in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren

2.19 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus rekombinanten Klonen erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Mini oder Midi Kit (Qiagen, Hilden). Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.20 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese wurde zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNS-Molekülen angewandt. Die Agarose wurde bis sie vollständig gelöst war in $0,5 \times$ TBE-Puffer aufgekocht und nach Ankühlen auf 60 °C in den Gelträger gegossen, anschließend wurde ein Kamm eingesetzt. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNS-Moleküle wurden 0,9-1,3%ige Agarosegele verwendet. Die aufzutrennenden DNS-Lösungen, die zuvor mit 0,1 Volumen Probenpuffer versetzt worden waren, wurden nach Erkalten des Gels mit $0,5 \times$ TBE-Puffer bei Raumtemperatur und konstanter Spannung durchgeführt. Es wurden Minigele (14 × 11 cm, max. 90 V) oder große Gele (25,5 × 20 cm, max. 170 V) verwendet. Nach dem Lauf wurden die Gele in einer 0,001%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend auf dem Transilluminator bei 302 nm betrachtet. Als Längenstandards für lineare DNS-Fragmente wurden die in Kapitel 2.2 beschriebenen DNS-Größenstandards verwendet.

2.21 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

2.21.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung [SAMBROOK *et al.*, 1989]

Die Nukleinsäurekonzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm in Wasser bestimmt. Bei doppelsträngigen Nukleinsäuren entspricht eine $E_{260\text{ nm}} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngigen von 40 µg/ml.

Das Verhältnis $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ gibt Aufschluß über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung. Bei reinen Lösungen ist das Verhältnis $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}} = 1,8-2,0$.

2.21.2 Konzentrationsbestimmung im Elektropherogramm

Eine näherungsweise Mengenbestimmung der DNS konnte durch Vergleich der Intensität mit den Banden im Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid mit den Banden einer definierten Menge an DNS (Größenstandard) durchgeführt werden.

2.22 Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten

2.22.1 Geextraktion

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen sowie zu deren Reinigung und Konzentrierung wurden kommerziell erhältliche DNS-Reinigungskits verwendet. Die Reinigungswirkung dieser Kits beruht darauf, daß man sich die vorübergehende, selektive Bindung von Nukleinsäuren an aktivierte Glasoberflächen zu Nutze macht, wodurch eine Abtrennung von Verunreinigungen, wie Proteine und Salze, ermöglicht wird. Verwendet wurden der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) und der Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen). Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.22.2 Ammoniumacetat-Isopropanol-Fällung

Lösungen: 4 M Ammoniumacetat-Lösung
Isopropanol absolut
70%iger Ethanol

Um nicht verbrauchte Primer von PCR-Amplifikaten abzutrennen, wurde eine Ammoniumacetat-Isopropanol-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde ein Volumen der PCR-Produkte mit einem Volumen Ammoniumacet-Lösung und 2 Volumina Isopropanol versetzt, bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert und anschließend für 15 min. und $12.000 \times g$ zentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.23 Enzymatische Modifikation von DNS-Molekülen

2.23.1 Spaltung von DNS-Molekülen mit Restriktionsenzymen

Zur Anwendung kamen Restriktionsendonukleasen vom Typ II mit den mitgelieferten Inkubationspuffern der Firma Roche (Mannheim), AGS (Heidelberg) und Promega (Mannheim). Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.23.2 Verknüpfung von DNS-Molekülen mit T4-DNS-Ligase

Zur kovalenten Verknüpfung von DNS-Enden wurde T4-DNS-Ligase (AGS, Heidelberg) verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxyl- und einem 5'-Phosphatende von doppelsträngigen DNS-Fragmenten unter gleichzeitigem ATP-Verbrauch (WEISS *et al.*, 1968). Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte ÜN bei RT.

Lösungen: 50 mM ATP
 50 mM DTT
 Blunt-End-Ligation: 5 × Puffer für blunt-end
 Sticky-End-Ligation: 10 × Puffer für sticky-end

Reaktionsansatz: 1 × Reaktionspuffer
 1 mM ATP
 1 mM DTT
 Insert-DNS (100-200 ng)
 Vektor-DNS (100-200 ng)
 ad 15 µl mit Aqua_{deion.} auffüllen
 1-3 U Enzym

2.24 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNS

2.24.1 Transformation von *E. coli* durch CaCl₂-Kompetenz und Temperaturschock

Lösungen:

LB:	vgl. 2.3.1
SOC:	vgl. 2.3.1
MgCl₂:	100 mM in Aqua _{bidest.} , autoklavieren
CaCl₂:	100 mM in Aqua _{bidest.} , autoklavieren
Glyzerin:	autoklavieren

Herstellung kompetenter Zellen:

- 250 ml LB (1.000 ml Kolben) wurden einprozentig mit einer frischen ÜNK beimpft und mit 220 upm bei 37 °C bis zur frühen log-Phase geschüttelt (OD_{578 nm} = 0,4-0,5).
- Die Zellen wurden in sterilen Behältern in einem Ausschwingrotor (Hermle, 4.700 x g, 10 min., 4 °C) geerntet, der Überstand verworfen.
- Das Pellet wurde in 60 ml eiskalten MgCl₂ aufgenommen erneut sedimentiert (wie oben), der Überstand verworfen.
- Die Zellen wurden vorsichtig in 30 ml gekühltem CaCl₂ aufgenommen und 30 min. auf Eis stehend inkubiert.
- Durch Zentrifugieren (wie oben) wurden die Zellen erneut geerntet, der Überstand entfernt, das Pellet in 20 ml CaCl₂ aufgenommen. Diese Zellen wurden direkt zur Transformation verwendet oder mit 0,1 Vol. Glyzerin vermischt, aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformationsprotokoll:

100 µl frische Zellen (oder auf Eis aufgetaute tiefgefrorene Zellen) wurden mit maximal 10 µl Plasmidlösung vermischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 min. bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt.

Zur phänotypischen Expression wurde der Ansatz mit 1ml SOC 30 min. bei 37 °C inkubiert, 100-200 µl auf Platten mit Selektionsdruck ausplattiert und 18-24 h bei 37 °C bebrütet.

2.24.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation [AUSUBEL *et al.*, 1987]

Lösungen:

LB: vgl. 2.3.1

Aqua_{bidest.}: autoklavieren

Glyzerin: autoklavieren

SOC: vgl. 2.3.1

Herstellung kompetenter Zellen:

- ÜN Kultur (220 upm, 37 °C) in LB hergestellt und mit dieser 200 ml LB (in 1.000 ml Erlenmeyerkolben) 0,2% beimpft
- Zellen bei 220 upm und 37 °C bis zu einer OD_{578 nm} von 0,5 bis 0,6 schütteln und dann rasch unter ständigem Rühren auf einer Eis-Wasser-Mischung kühlen; alle weiteren Schritte erfolgen in der Kälte (Eis oder 4 °C).
- Zellen in sterilen Polypropylen-Flaschen ernten und anschließend durch wiederholtes Resuspendieren und Pelletieren wie folgt waschen: 2 × mit 200 ml Aqua_{bidest.}, 1 × mit 30 ml Glyzerin
- Zellen in Glyzerin 20 min. auf Eis inkubieren, erneut pelletieren und in 400 µl Glycerin aufnehmen
- Zellen zu 100 µl aliquotieren und direkt zur Transformation einsetzen oder schockgefrieren und bei –80 °C lagern

Transformation:

- Zellen auf Eis auftauen und davon 90 µl mit 10 µl DNS-Lösung vermischen
- Ansatz in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand; BioRad, München) pipettieren und bei 2.500 V, 200 Ω und 25 µF elektroporieren („Gene-Pulser“ und „Pulse-Controller“ der Firma BioRad, München)
- zur phänotypischen Expression Zellen mit 1 ml SOC (1 h, 37 °C) schütteln, in Aliquoten auf selektives LB plattieren und 18 h bei 37 °C inkubieren

2.25 In vitro Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR [SAIKI et al., 1988]

2.25.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen, spezifischen Amplifikation von DNS-Abschnitten aus großen Nukleinsäuremolekülen (genomische DNS, Plasmide usw.). Die Spezifität der Reaktion beruht auf der Anwendung von zwei Oligonukleotid-Primern, die den zu amplifizierenden DNS-Abschnitt flankieren. Sie binden aufgrund ihrer zu je einem der beiden Matrizenstränge komplementären Sequenzen an das jeweilige 3'-OH-Ende. Die Reaktion läuft in den drei Teilschritten (1) thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNS, (2) spezifische Hybridisierung der Primer und (3) Verlängerung der gebundenen Primer durch eine DNS-Polymerase ab. Durch Anwendung einer thermostabilen Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) können alle Teilschritte in mehreren Zyklen wiederholt werden, was eine exponentielle Amplifikation zur Folge hat. Die erhaltenen DNS-Fragmente können dann zur Klonierung oder direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.25.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Es wurden die *Taq*-Polymerasen von Amersham Biosciences (Freiburg) und Promega (Mannheim) in Verbindung mit den jeweilig mitgelieferten Reaktionspuffern verwendet. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurde immer eine $MgCl_2$ -Endkonzentration von 1,5 mM eingestellt.

Lösungen:

Primer-Arbeitslösung: 50 pmol/μl Oligonukleotid
Nukleotidstammlösung: 10 mM ATP
10 mM CTP
10 mM GTP
10 mM TTP

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) oder Primus 96 Plus (MWG Biotech AG, Ebersberg)-PCR-Gerät wie nachfolgend beschrieben:

Reaktionsansatz:

Oligonukleotid-Lösung Primer 1	1 µl
Oligonukleotid-Lösung Primer 2	1 µl
Reaktionspuffer (10 × konzentriert)	10 µl
Nukleotidlösung	2 µl
DNS	0,1-500 ng
Taq-polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
Aqua _{bidest. steril}	ad 100 µl

Amplifikation:

1 Zyklus:	Denaturierung: 2-5 min. 95 °C
25-35 Zyklen:	a) Denaturierung: 30-90 sek., 95 °C
	b) Annealing: 30-120 sek., 40-60 °C
	c) Elongation: 45-180 sek., 72 °C
1 Zyklus:	Auffüllreaktion: 5 min., 72 °C

ad b) Die Primerhybridisierungstemperaturen sind abhängig von Länge und Sequenz der Primer (Faustregel: Hybridisierungstemperatur 2 °C unter T_D)

ad c) Die genaue Amplifikationszeiten sind abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNS-Fragments (Faustregel: 60 sek. Extensionszeit für 1 kb-Fragmente)

Um Kontaminationen von Parallelproben zu vermeiden, wurde die DNS als letzte Komponente in den Ansatz pipettiert. Bei jedem Amplifikationsexperiment wurden Kontaminationskontrollen ohne Zugabe von DNS mitgeführt.

Die hergestellten Amplifikate wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.20) analysiert.

2.25.3 Ermittlung der Hybridisierungstemperatur

Die Dissoziationstemperatur T_D bei der Hybridisierung mit Oligonukleotiden ist von der Basenzusammensetzung und Länge der Oligonukleotide abhängig. Zu ihrer Berechnung wurde folgende Formel [SUGGS *et al.*, 1981] verwendet:

$$T_D [^\circ\text{C}] = 2 * (A + T) + 4 * (G + C) \quad \langle 2.3 \rangle$$

wobei A, G, C, T die Anzahl der jeweiligen Nukleotide darstellt.

Diese Berechnungsmethode gibt allerdings nur einen ersten Anhaltspunkt. Die optimale Annealing-Temperatur lag in der Regel 2 °C unter der berechneten T_D , wurde aber stets empirisch ermittelt und kann auch über der ermittelten T_D liegen.

2.25.4 Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Primern

Die Aminosäuresequenz der sequenzierten Peptide dienten als Grundlage für Datenbankrecherchen. Die vollständige Sequenz der ähnlichen bzw. homologen Proteine diente als Grundlage zur Ableitung von degenerierten Primern. Als Primer dienten 19 bis 21-mere, die unterschiedlich viele Wobbles trugen. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich deren Degeneration auf wenige Basen am 3'-Ende beschränkte [NEWTON und GRAHAM, 1994]. Anstatt hochgradig degenerierte Primer herzustellen, die an vielen Positionen drei oder vier verschiedene Basen aufwiesen, wurden teilweise diese Positionen mit der universellen Base Inosin ersetzt. Inosin ist ein seltenes, natürlich vorkommendes Purin, das in der Lage ist, sich mit allen vier Basen zu paaren. Dabei ist die Bindungsstärke zu U, C und A größer als zu G und T.

Die MgCl_2 -Konzentration kann die Spezifität und Ausbeute der PCR wesentlich beeinflussen. Die Endkonzentration an MgCl_2 im Reaktionsansatz kann über einen Bereich von 0,5-5,0 mM variiert werden, um die günstigsten Bedingungen auszutesten. Die Mg^{2+} -Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Zusätzlich stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen die Schmelztemperatur sowohl des DNS-Doppelstranges als auch die Bindung zwischen Primer und Matrize, was bei degenerierten Primern besonders von Interesse ist. Daher wurde zum mitgelieferten 10 × konzentrierten Puffer gegebenenfalls zusätzliches MgCl_2 aus einer 25 mM Stammlösung zugesetzt.

2.25.5 Verwendete Primer

Zur Amplifizierung von Nukleotidpartialsequenzen wurden die aus Peptidsequenzen abgeleiteten und in Tabelle 2.4 aufgeführten degenerierten Primer verwendet.

Tabelle 2.4: Die zur Amplifizierung der Nukleotidpartialsequenzen von *adhE*, *clpL*, *groEL* und Ribokinase verwendeten Primer

<i>Protein</i>	<i>Primerbezeichnung</i>	<i>Primersequenz</i>
ADH	ADHv2	5'-TGY CAY ACI GTY YTI CTY G-3'
	ADH2r	5'-CKI GTI CCI ACI TRS WIC C-3'
ClpL	clpLv1	5'-GAT GAA ATY CAY CAR ATT-3'
	clpLr1	5'-GCY TTT TCR ATT TCA TC-3'
GroEL	groELv2	5'-GAA GGD ATG CAR TTT GAY CG-3'
	groELr1	5'-GCA AYD GAA GCD GCR TTT TG-3'
RbsK	RK-v	5'-GCI AAY CAR GCI ATH GCI GC-3'
	RK-r	5'-TCI CCI GCI GCI GTI GTR TC-3'

Zur Untersuchung der Streßantwort von *Escherichia coli* JM109 mittels GFP wurden verschiedene Streßpromotoren vor GFP ligiert und in *E. coli* kloniert. Zur Amplifizierung dieser Streßpromotoren wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Primer verwendet.

Tabelle 2.5: Die zur Amplifizierung der Promotorensequenzen von *clpB*, *dnaK*, *rpoH* und *groE* verwendeten Primer

<i>Promotor</i>	<i>Primersequenz</i>
<i>clpB</i>	5'-TAT ATG CAT GCC CGG CAA TTG GTC CAC GCG CG-3'
	5'-TAT ATG CTA GCC ATA ACT CCT CCC ATA ACG GAT C-3'
<i>dnaK</i>	5'-TAT ATG CAT GCC GAA ATT TCT GCG CAA AAG CAC-3'
	5'-TAT ATG CTA GCC ATC TAA ACG TCT CCA CTA TAT ATT C-3'
<i>rpoH</i>	5'-TAT ATG CAT GCA AGC TTG CAT TGA ACT TGT G-3'
	5'-TAT ATG CTA GCC ATT CAA ATC CTC TCA ATC GAT ATC-3'
<i>groE</i>	5'-TAT ATG CAT GCC GAT GGT AGC ACA ATC AGA T-3'
	5'-TAT ATG CTA GCC ATT GAT AAC TCT CCT TTG AGA AAG-3'

2.26 Sequenzanalyse von DNS-Molekülen

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde als Auftragsarbeit von Dr. W. Metzger (Sequivserve, Vaterstetten) durchgeführt. Es 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. Als Sequenzierprimer kamen bei Plasmiden die Sequenzierprimer T7 und T3 zum Einsatz, während bei der Direktsequenzierung von PCR-Fragmenten die jeweiligen PCR-Primer verwendet wurden.

2.27 Untersuchung der Streßantwort mittels DNS-Microarray

Die Untersuchung der Hitze- und Hochdruckstreßantwort von *Escherichia coli* JM109 DE3 auf Transkriptomebene erfolgte mit dem Pan[®] StarterKit (MWG Biotech AG, Ebersberg). Die RNS wurde wie unter 2.18 beschrieben isoliert. Die Markierung und Hybridisierung erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Auswertung wurde mit einem Scanner GenePix 4000A (AXON, USA) und der Software GenePix Pro 4.0 (Axon, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Hochdruckantwort von grampositive Bakterien am Beispiel *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.53

3.1.1 Bestimmung der Korrelation zwischen optischer Dichte und Keimzahl

Zur Untersuchung der Korrelation zwischen optischer Dichte und der Keimzahl wurde die optische Dichte bei 578 nm und 590 nm sowie die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KbE/ml) in Abhängigkeit von der Wachstumsphase für *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lactococcus lactis* MG1363 bestimmt. Abbildung 3.1 zeigt das relative Wachstum, aufgenommen als der Logarithmus der optischen Dichte und als Logarithmus der KbE/ml. Die ähnlichen Verläufe verdeutlichen den Zusammenhang zwischen optischer Dichte, als Meßwert für die sich in einer Flüssigkultur befindenden lebenden und toten Zellen und der Lebendkeimzahl, gemessen als Kolonien bildende Einheiten pro ml Kultur.

3.1.2 Einfluß der Temperatur auf das Wachstum von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur für die Induktion der Hitzeschockantwort von *L. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363 wurde das Wachstumsverhalten dieser beiden Organismen bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Dazu wurde vortemperiertes mMRS-Medium (vgl. 2.3.1) mit einer ÜN-Kultur angeimpft, und das Wachstum durch Messen der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Aus den so gewonnenen Wachstumskurven wurde die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt. Parallel hierzu wurde die Änderung der optischen Dichte bei 578 nm ($\Delta OD_{578 \text{ nm}}$) ermittelt. Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, weisen die Organismen bei einer Temperatur von 25 °C bis 38 °C ein sehr gutes Wachstum mit hoher Wachstumsrate μ auf, das bei einer Temperatur von 40 °C und höher deutlich abnimmt. Bei einer Temperatur von 44 °C konnte weder bei *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 noch bei *Lc. lactis* MG1363 ein Wachstum beobachtet werden. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} war sowohl bei *Lb. sanfranciscensis* 1.53 als auch bei *Lc. lactis* MG1363 bei einer Temperatur von 42 °C bis 43 °C auf ein Zehntel reduziert. Bei dieser

Temperatur war die Änderung der optischen Dichte bei 578nm nach einer Stunde gerade kleiner oder gleich 0,1. Da aus der Literatur für *Lc. lactis* bereits bekannt ist [SANDERS *et al.*, 1999], daß bei einer Reduktion der maximalen Wachstumsrate um eine Zehnerpotenz eine sehr starke Hitzeschockantwort zu erwarten ist wurde für die Induktion der Hitzeschockantwort von *Lb. sanfranciscensis* eine Temperatur von 43 °C gewählt.

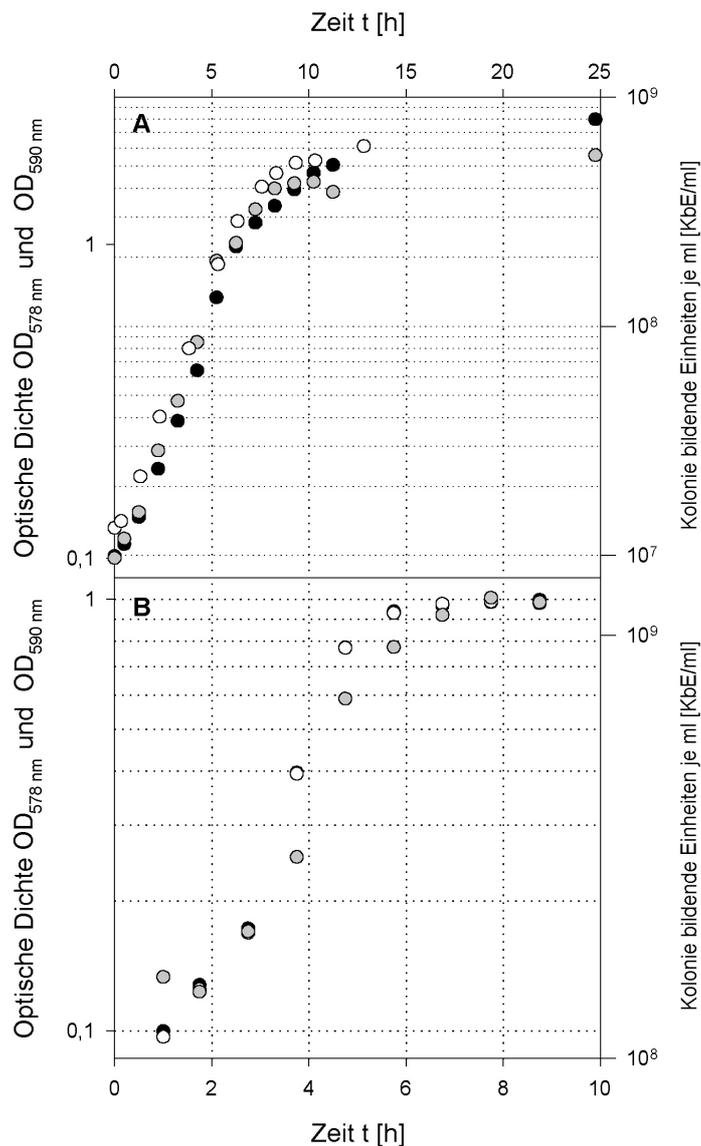


Abbildung 3.1: Korrelation zwischen OD_{578 nm} (schwarz), OD_{590 nm} (weiß) und Kolonie bildender Einheiten (grau) von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (A) und *Lc. lactis* MG1363 (B)

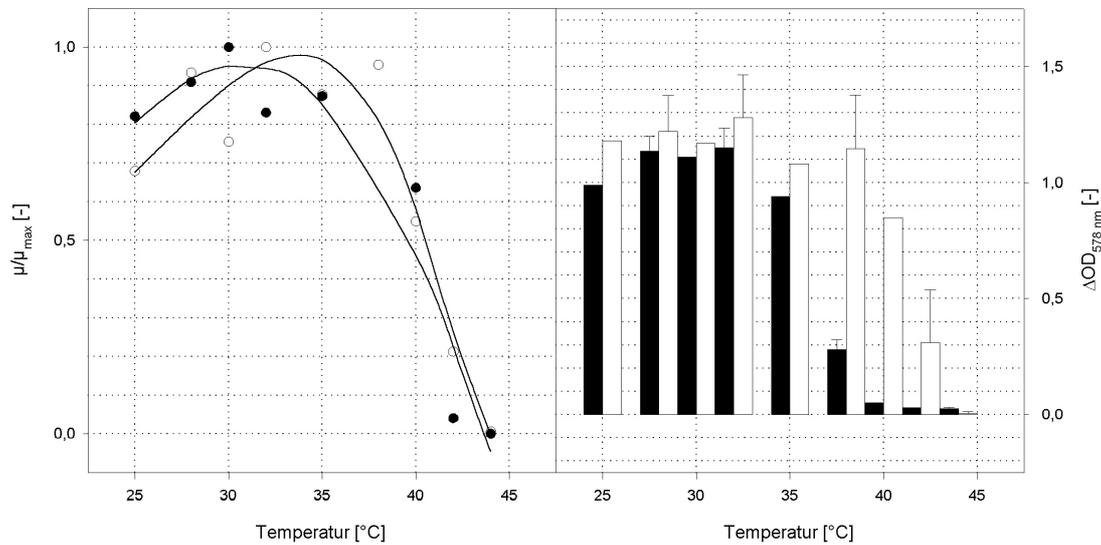


Abbildung 3.2: Einfluß verschiedener Wachstumstemperaturen auf die relative Wachstumsgeschwindigkeit μ/μ_{\max} [-] und die Änderung der optischen Dichte $\Delta OD_{578 \text{ nm}}$, sowie die Standardabweichung bei drei unabhängigen Experimenten nach zwölfstündiger Inkubation von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (schwarz) und *Lc. lactis* MG1363 (weiß)

3.1.3 Einfluß des pH-Werts auf das Wachstum von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363

Zur Ermittlung des optimalen pH-Werts für die Induktion der Säurestreßantwort von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363 wurde das Wachstumsverhalten dieser beiden Organismen bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dazu wurde vortemperiertes mMRS-Medium mit verschiedenen pH-Werten mit einer ÜN-Kultur angeimpft, und das Wachstum durch Messen der optischen Dichte bei 590 nm im SpectraFluor (Tecan, Österreich) bei 30 °C verfolgt. Aus den so gewonnenen Wachstumskurven wurde die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit der eingestellten pH-Werte ermittelt. Parallel hierzu wurde die Änderung der optischen Dichte bei 578 nm ($\Delta OD_{578 \text{ nm}}$) ermittelt. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, zeigt *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 bei einem pH-Wert von etwa 5,8 maximales Wachstum, *Lc. lactis* MG1363 hingegen bei etwa 6,6. Bei einem pH-Wert von 3,7 bzw. 4,0 beträgt die Wachstumsrate gerade noch 10% der maximalen Wachstumsrate. Bei diesen pH-Werten ist nach einer Inkubation von 12 Stunden die Änderung der optischen

Dichte 0,1 oder kleiner. Da aus der Literatur für *Lc. lactis* bekannt ist, daß bei einer Reduktion der maximalen Wachstumsrate um 90% eine sehr starke Säurestressantwort zu erwarten ist, wurde für die Induktion der Säurestressantwort von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 pH-Wert von 3,7 gewählt.

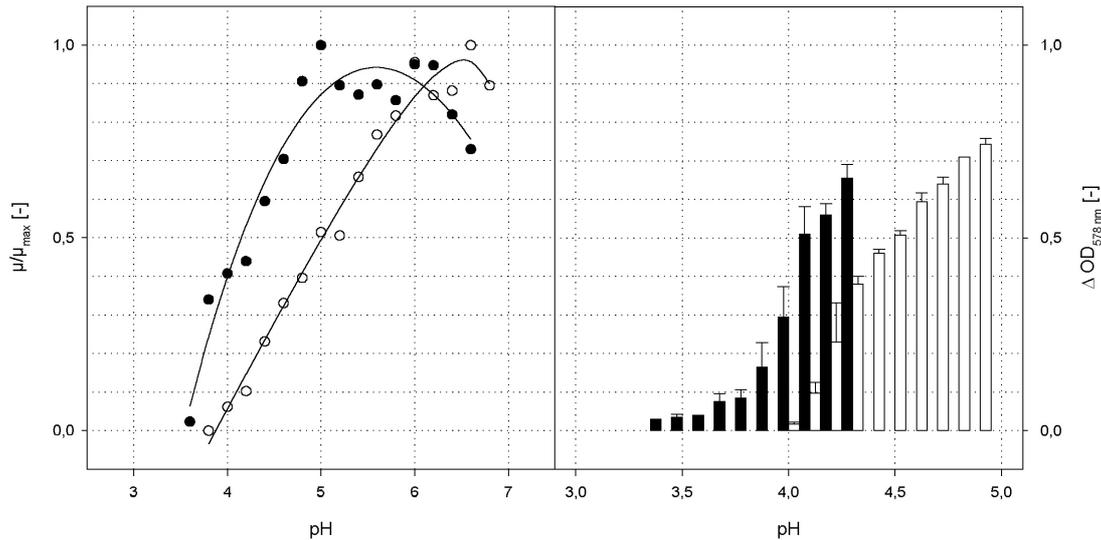


Abbildung 3.3: Einfluß verschiedener pH-Werte auf die relative Wachstumsgeschwindigkeit μ/μ_{max} [-] und die Änderung der optischen Dichte $\Delta OD_{578\text{ nm}}$, sowie die Standardabweichung bei drei unabhängigen Experimenten nach zwölfstündiger Inkubation von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (schwarz) und *Lc. lactis* MG1363 (weiß)

3.1.4 Einfluß des Kochsalzgehalts auf das Wachstum von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363

Zur Ermittlung des optimalen Kochsalzgehalts für die Induktion der Osmoschockantwort von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363 wurde das Wachstumsverhalten dieser beiden Mikroorganismen bei verschiedenen Kochsalzkonzentrationen untersucht. Dazu wurde vortemperiertes, mit verschiedenen Kochsalzkonzentrationen versetztes Medium mit einer ÜN-Kultur angeimpft und das Wachstum durch Messen der optischen Dichte bei 590 nm im SpectraFluor (Tecan, Österreich) verfolgt. Aus den so gewonnenen Wachstumskurven wurde die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Kochsalzkonzentration ermittelt. Parallel hierzu wurde die Änderung der optischen Dichte bei 578 nm nach zwölfstündiger

Inkubation verfolgt. Wie in Abbildung 3.4 dargestellt ist für *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 bei einem Kochsalzgehalt von 1,9% (w/v) die Wachstumsrate um ca. 90% reduziert, bei *Lc. lactis* MG1363 hingegen bei etwa 3,5% (w/v). Bei einem Kochsalzgehalt von 0,5% bzw. 0,1% wurde hingegen die maximale Wachstumsrate erreicht. Bei der Salzkonzentration, bei der das maximale Wachstum um eine Zehnerpotenz reduziert ist, ist auch die Änderung der optischen Dichte nach zwölfstündiger Inkubation gerade 0,1 oder kleiner. Literaturrecherchen haben ergeben, daß für *Lc. lactis* gerade dann eine starke Osmostreßantwort zu erwarten ist, wenn die Wachstumsrate um 90% reduziert ist, weshalb in den weiteren Versuchen für die Osmoschockinduktion von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 eine Kochsalzkonzentration von 1,9% (w/v) verwendet wurde.

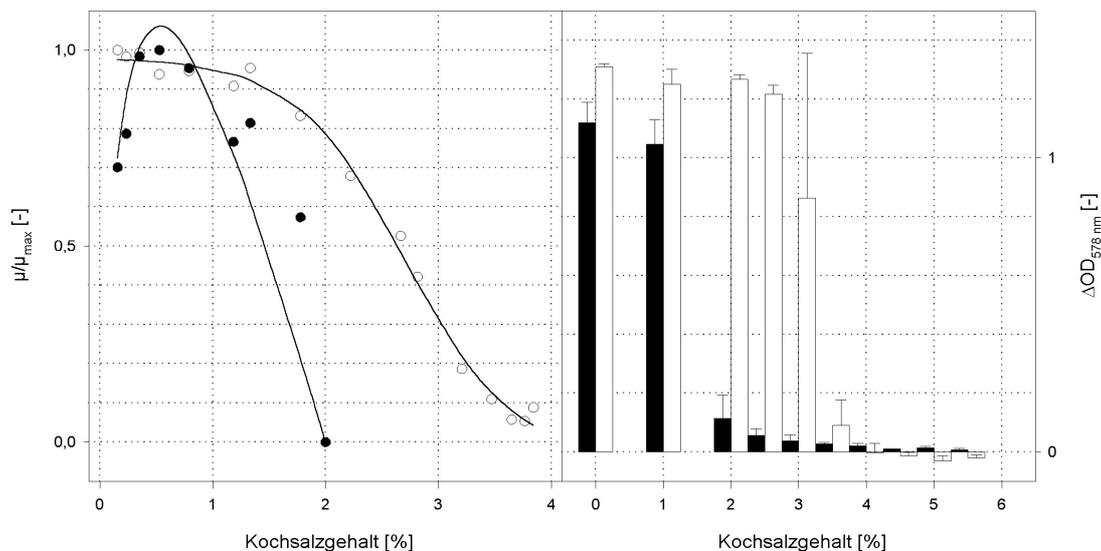


Abbildung 3.4: Einfluß verschiedener Kochsalzkonzentrationen auf die relative Wachstumsgeschwindigkeit μ/μ_{\max} [-] und die Änderung der optischen Dichte $\Delta OD_{578 \text{ nm}}$, sowie die Standardabweichung bei drei unabhängigen Experimenten nach zwölfstündiger Inkubation von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (schwarz) und *Lc. lactis* MG1363 (weiß)

3.1.5 Einfluß des Drucks auf das Wachstum von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 und *Lc. lactis* MG1363

Zur Bestimmung der optimale Druckintensität zur Induktion der Hochdruckstreßantwort wurde eine ÜK von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 bzw. *Lc. lactis* MG1363 in mehrere

Proben aliquotiert und für zwölf Stunden bei verschiedenen Drücken inkubiert. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt ist, bei einem Druck zwischen 50 und 100 MPa die Änderung der optischen Dichte gerade 0,1 Einheiten oder weniger. In Anlehnung an die Versuche zur Bestimmung der Streßantwortinduktionsparameter für Temperatur, pH und Salzkonzentration wird für *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ein Druck zwischen 50 und 100 MPa als optimal zur Induktion der Streßantwort erachtet.

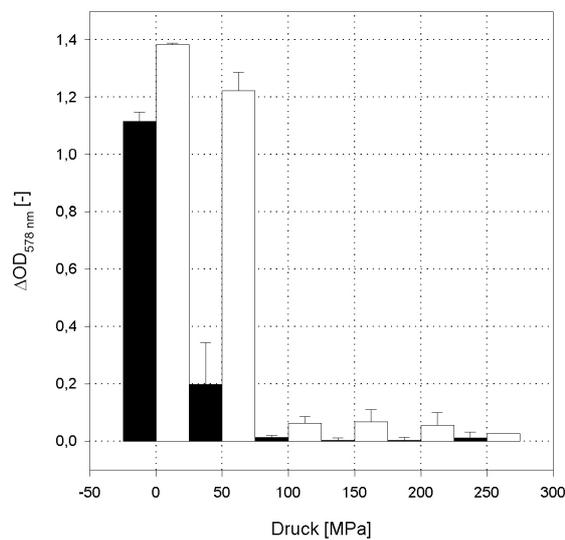


Abbildung 3.5: Einfluß verschiedener Drücke auf die Änderung der optischen Dichte $\Delta OD_{578 \text{ nm}}$ von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (schwarz) und *Lc. lactis* MG1363 (weiß) bei zwölfstündiger Inkubation

3.1.6 Hochdruckkreuzresistenzen von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53

Werden Zellen vor einer letalen Streßbehandlung einem subletalen Streß gleicher oder anderer Art ausgesetzt, so reagieren sie in der Regel mit erhöhter Toleranz, die als Kreuzresistenz bezeichnet wird. Durch die Induktion von generellen Streßproteinen während der Vorbehandlung wird der gestreßten Zelle eine unspezifische Streßresistenz übertragen, die gegen mehrere möglicherweise auftretende Belastungsfaktoren ihre Wirkung zeigt. Zur Untersuchung möglicher im Zusammenhang mit Hochdruck auftretender Kreuzresistenzen wurden analog zu der von HARTKE *et al.* (1996) für Säurestreß beschriebenen Methode die optimale Vorstreßintensität und Dauer bestimmt. Hierzu wurden logarithmisch wachsende Zellen von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 zunächst für 30 min. und 30 °C verschiedenen subletalen Drücken von 1 bis 120 MPa ausgesetzt. Nach einer Regenerationsphase von 15

min. wurden die vorgestreßten Zellen für 30 min. bei 30 °C einem letalen Druck von 300 MPa ausgesetzt. Vor und nach der letalen Druckbehandlung wurde die Keimzahl bestimmt und hieraus die Überlebensquote ermittelt. Wie Abbildung 3.6 zeigt nimmt der prozentuale Anteil überlebenden Zellen bis zu einem Druck von 80 MPa exponentiell zu. Bei höheren Drücken hingegen nimmt der Anteil überlebender Zellen wieder ab.

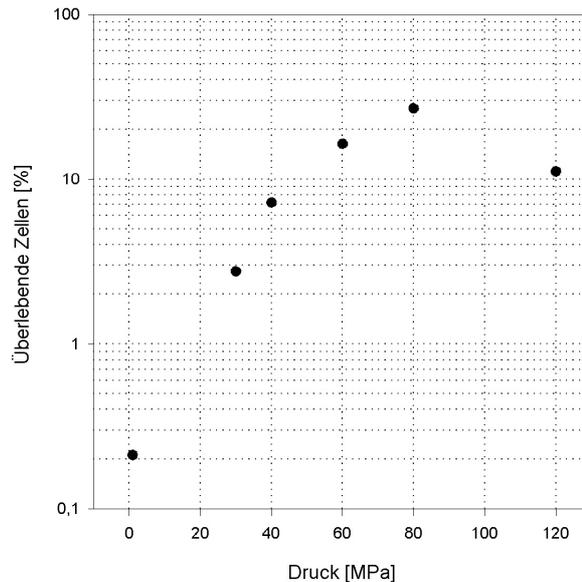


Abbildung 3.6: Überlebensquote von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 bei einer Inkubation von 30 min. bei 300 MPa nach einer Vorbehandlung mit verschiedenen hohen Drücken (Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen)

Zur Untersuchung der optimalen Vorstreßdauer wurden eine logarithmisch wachsende Kultur von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 unterschiedlich lange bei 80 MPa, 30 °C inkubiert und nach einer 15-minütigen Regenerationsphase bei Atmosphärendruck für 30 min. einem letalen Druck von 300 MPa ausgesetzt. Abbildung 3.7 zeigt, daß die Überlebensquote in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbehandlung zunächst exponentiell zunimmt. Ab einer Inkubationszeit von 30 min. nimmt die Überlebensquote weiterhin zu, jedoch nicht mehr exponentiell.

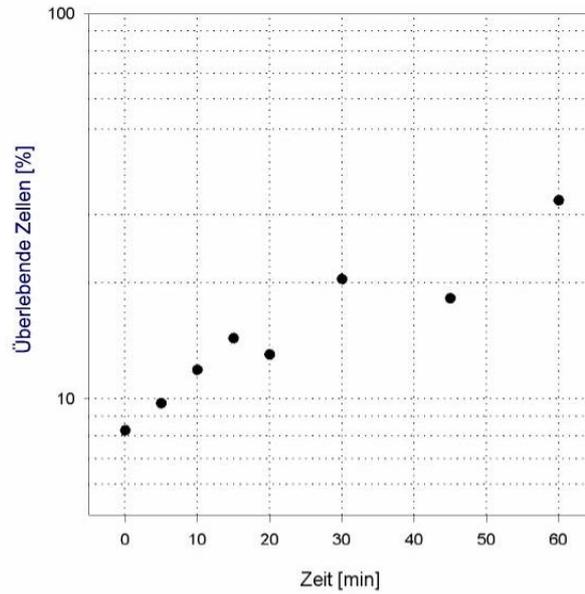


Abbildung 3.7: Überlebensquote von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 bei einer Behandlung von 300 MPa, 30 min., nach verschieden langer Vorbehandlung bei 80 MPa (Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen)

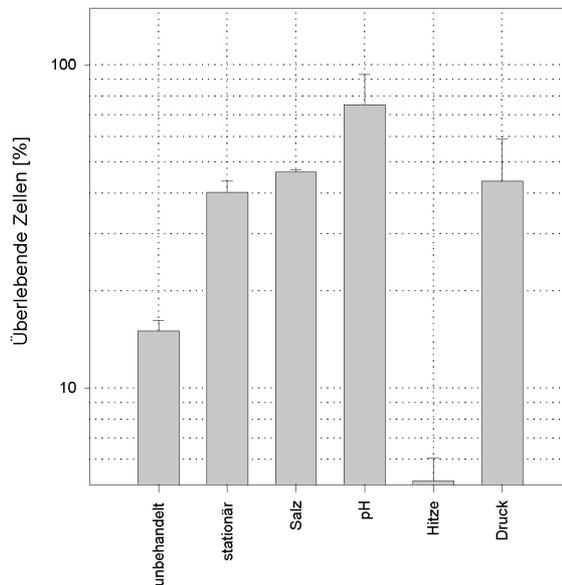


Abbildung 3.8: Überlebensquote von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 bei 300 MPa, 30 min. ohne Vorstreß, stationäre Zellen, nach Vorstreßbehandlung von 1 h mit 1,9% (w/v) Kochsalz, einem pH-Wert von 3,7, einer Vorstreßtemperatur von 43 °C und 80 MPa

Um eine Überlagerung der Hochdruckstreßantwort durch stoffwechselbedingte pH-Absenkung und der daraus resultierenden möglichen Säurestreßantwort zu vermeiden, wurde für die weiteren Versuche basierend auf diesen Ergebnissen eine optimale Hochdruckstreßeinwirkung von 80 MPa für 60 min. festgelegt.

Zur Untersuchung möglicher Hochdruckkompensationsmechanismen wurde eine logarithmisch wachsende Kultur von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 vor einer 30-minütigen letalen Druckbehandlung von 300 MPa bei 30 °C für eine Stunde verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen. Dies waren im einzelnen die Behandlung mit 1,9% Kochsalz (w/v), mit angesäuertem Medium (pH 3,7), und einer Temperatur von 43 °C. Diese Werte bewirken bei *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 in etwa eine Reduktion der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit um 90%. Zwischen der letalen Behandlung und der Vorbehandlung wurden die Zellen zur Regeneration für 30 min. in frischem Medium bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und eine Kultur, die sich in der stationären Phase befand. Wie Abbildung 3.8 zeigt, bewirkt eine Vorbehandlung mit stark kochsalzhaltigem Medium im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine Zunahme der Überlebensquote von etwa 15% auf 45%. Diese Resistenzzunahme ist auch bei der sich in der stationären Wachstumsphase befindlichen Kultur zu beobachten, ebenso wie bei der mit Hochdruck vorbehandelten Probe. Die mit angesäuertem Medium vorbehandelte Kultur hingegen zeigt eine Zunahme der Resistenz auf etwa 75%. Die mit hoher Temperatur vorbehandelte Probe hingegen zeigt eine erhöhte Sensitivität, die sich in einer Abnahme der Resistenz auf unter 6% äußert.

3.1.7 Untersuchung der streßinduzierten Proteomantwort

Suboptimale Wachstumsbedingungen wie erhöhte Temperatur, hohe a_w -Werte, Säure etc. bewirken eine Änderung der Genexpression. Dies kann sich in der Repression oder der Induktion verschiedener Proteine äußern, die in Extremfällen nur bei diesen suboptimalen Bedingungen angeschaltet werden, oder deren Expression vollständig unterdrückt wird.

Zur Untersuchung der hochdruckinduzierten Genexpression wurde eine exponentiell wachsende Kultur von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 für eine Stunde bei 30 °C einem Druck von 80 MPa ausgesetzt. Um den Zellen die Möglichkeit zu geben, die induzierten Proteine vollständig zu exprimieren, wurden die Zellen vor dem Aufschluß mit Ultraschall einer Ruhephase von 15 min. ausgesetzt. Die cytoplasmatischen Proteine wurden mittels 2-D-

Elektrophorese im pH-Bereich 4-7 und 5,5-6,7 aufgetrennt (Abbildung 3.9) und die Änderung der Expression verschiedener Proteine mittels computergestützter Bildauswertung ermittelt. Hierbei wurden jeweils zwei Gele zweier unabhängig voneinander durchgeführter Proben gemittelt. Zur Eliminierung unterschiedlicher Proteinauftragungsmengen wurde die Fläche der einzelnen Spots normalisiert. Dies führte bei der Bewertung der Überexpression bzw. Repression einzelner Proteine zu Unterschieden zwischen der visuellen und der computergestützten Auswertung (vgl. Abbildung 3.15 bis Abbildung 3.21).

Zum Vergleich zur hochdruckinduzierten Streßantwort wurden Gele von Proben angefertigt, die jeweils für eine Stunde folgenden Bedingungen unterworfen wurden: pH = 3,7, 1,9% (w/v) Kochsalz, stationäre Zellen, 43 °C. Vor dem Zellaufschluß wurden diese Zellen ebenfalls für 15 min. unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert.

In Abbildung 3.9 bis Abbildung 3.14 und Tabelle 3.1 sind die überexprimierten bzw. reprimierten Proteine angezeigt. Wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich, konnten nach einer Hochdruckeinwirkung von 80 MPa 30 überexprimierte Proteine detektiert werden. Von diesen induzierten Proteinen reagierte nur das Protein 22 hochdruckspezifisch.

Während sich die Expression dieses Proteins bei Osmo-, und Säurestreß sowie bei stationären Zellen nicht signifikant veränderte, wurde es bei Hitzestreß unterdrückt. Für das Protein 16 konnte nur für Hochdruckstreß eine Induktion bestimmt werden. Für die weiteren untersuchten Bedingungen war dieser Spot nicht eindeutig auswertbar.

Von den durch Hochdruck induzierten Proteinen gab es neun, die nur bei einer anderen Streßart ebenfalls induziert wurden, wobei dies im Einzelnen bei pH-Streß (Spot 27), Kochsalzstreß (Spot 11, 15, 17 und 24) und bei stationären Zellen (Spot 14, 21, 26 und 29) war. Interessant ist hierbei insbesondere das durch Hochdruckeinfluß und bei stationären Zellen induzierte Protein 14, da es bei pH- und Hitzestreß sogar reprimiert wird. Ebenso zeigt das Protein 24 bei Hochdruck- und Kochsalzstreß eine Induktion und bei Hitzestreß eine Repression.

Elf der hochdruckinduzierten Proteine wurden bei zwei anderen Streßarten ebenfalls induziert. Von diesen Proteinen wurden bei Säurestreß fünf induziert (Spot 5, 8, 18, 23, 25) und eines reprimiert (Spot 2). Bei Osmostreß waren von diesen Proteinen die Spots 1, 2, 5, 8, 10, 13, 18, 20, 23, 25 und 28 induziert, bei stationären Zellen die Spots 1, 2, 10, 13 und 20. Die Proteine 18 und 25 wurden bei stationären Zellen hingegen reprimiert. Hitze bewirkt aus

dieser Proteingruppe nur eine Induktion des Proteins 28, sowie eine Repression des Proteins 5.

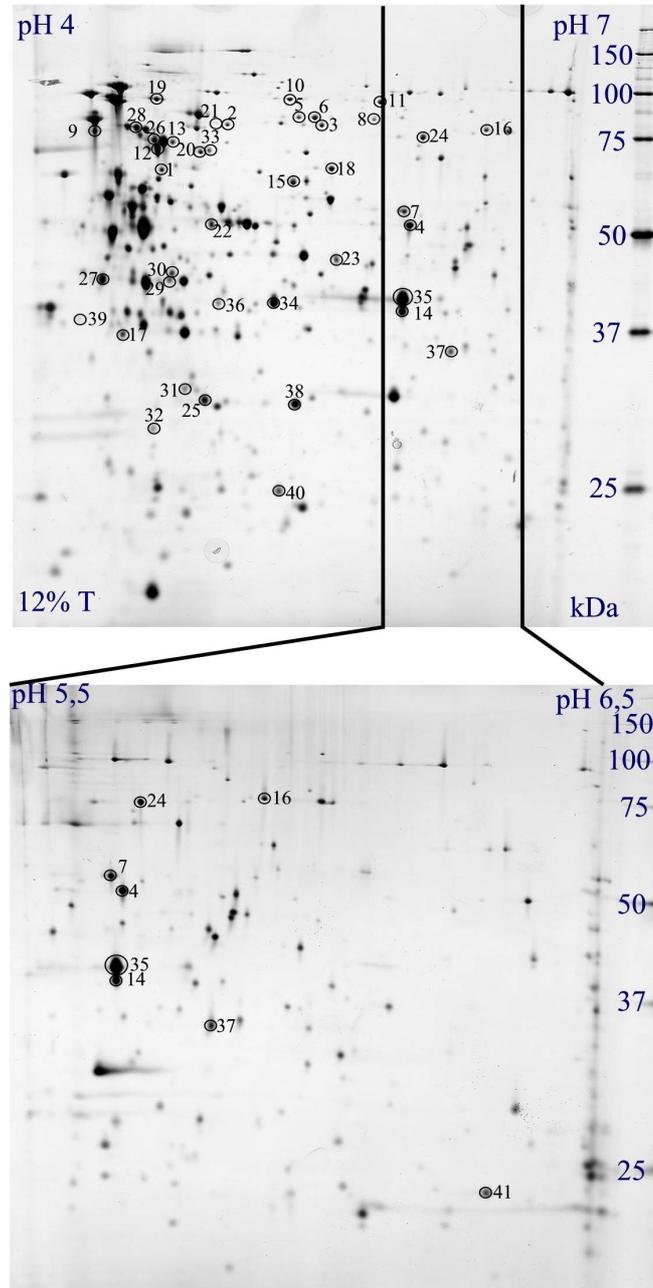


Abbildung 3.9: 2-D-Gele cytoplasmatischer Proteine von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 nach einer Hochdruckbehandlung von 80 MPa für 60 min., silbergefärbt. Die nummerierten Spots sind identisch mit den in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Nummern; angezeigt sind alle durch Hochdruck-, Hitze-, Osmo- und Säurestress sowie bei stationären Zellen unterschiedlich exprimierte Proteine

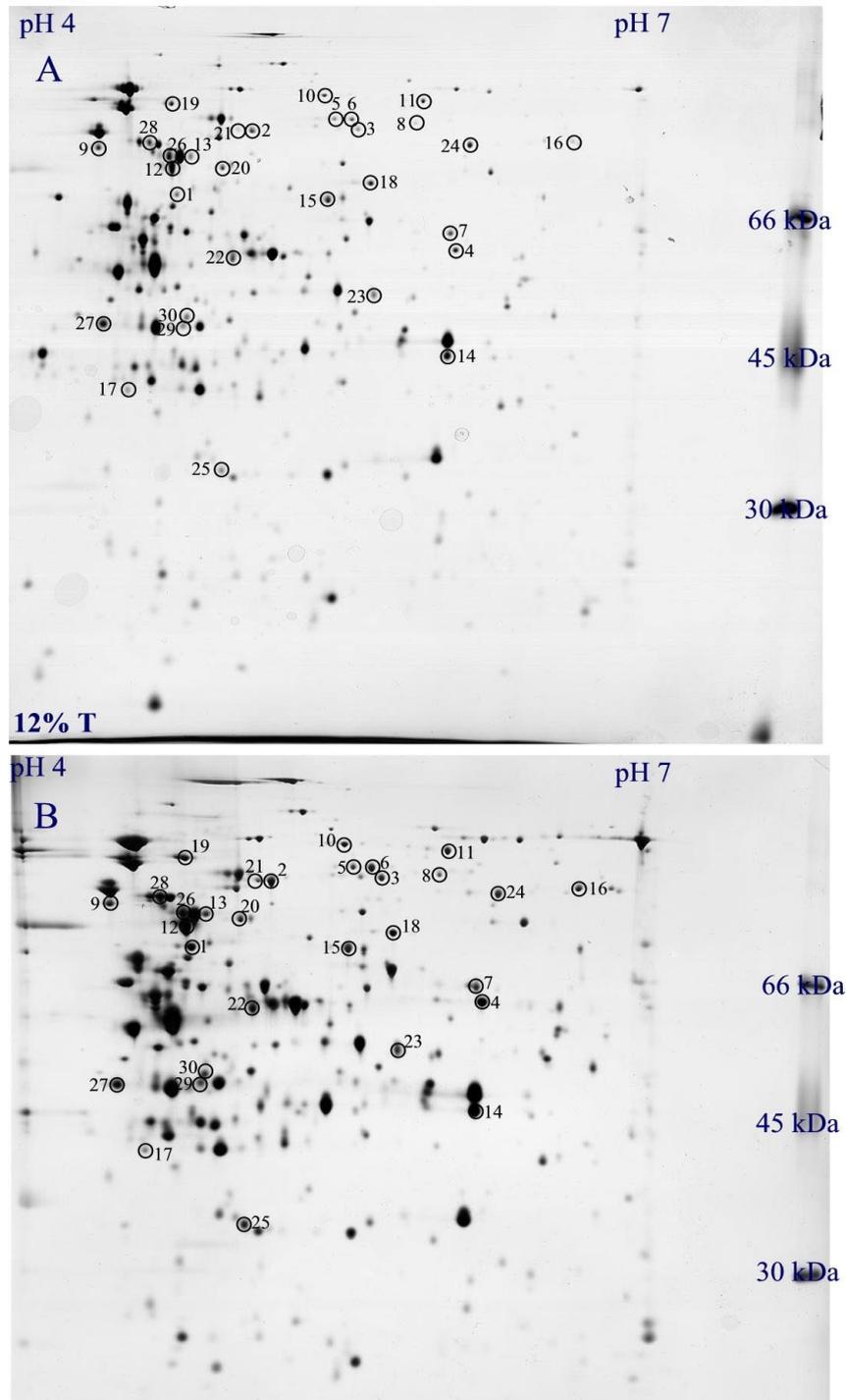


Abbildung 3.10: 2-D-Gele cytoplasmatischer Proteine von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ohne Streßbehandlung (A) und nach einer Hochdruckbehandlung von 80 MPa für 60 min. (B), silbergefärbt. Die überexprimierten nummerierten Spots sind identisch mit den in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Nummern.

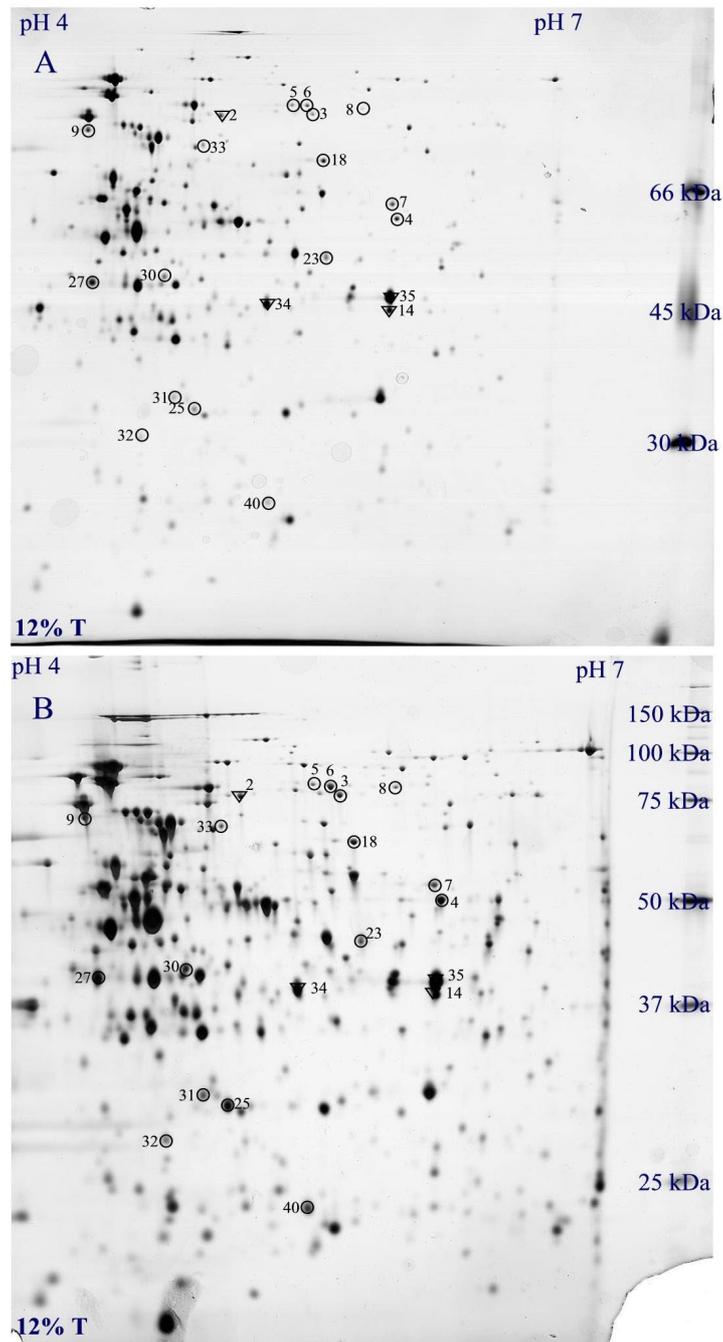


Abbildung 3.11: 2-D-Gele cytoplasmatischer Proteine von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ohne Streßbehandlung (A) und nach einer Säurestreßbehandlung mit pH 3,7 für 60 min. (B), silbergefärbt. Die überexprimierten (○) bzw. reprimierten (▽) nummerierten Spots sind identisch mit den in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Nummern.

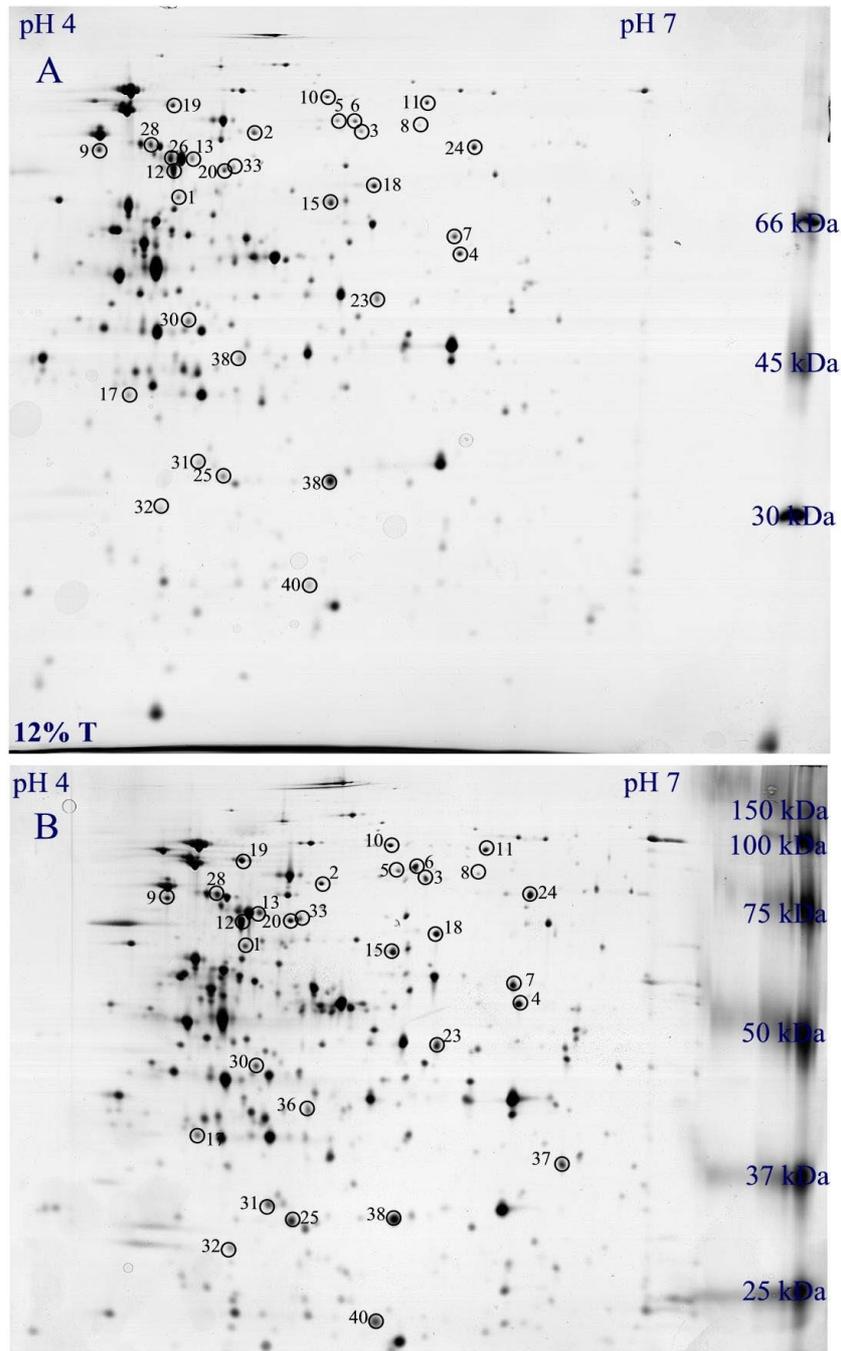


Abbildung 3.12: 2-D-Gele cytoplasmatischer Proteine von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ohne Streßbehandlung (A) und nach einer Osmostreßbehandlung mit 1,9% NaCl für 60 min. (B), silbergefärbt. Die überexprimierten nummerierten Spots sind identisch mit den in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Nummern.

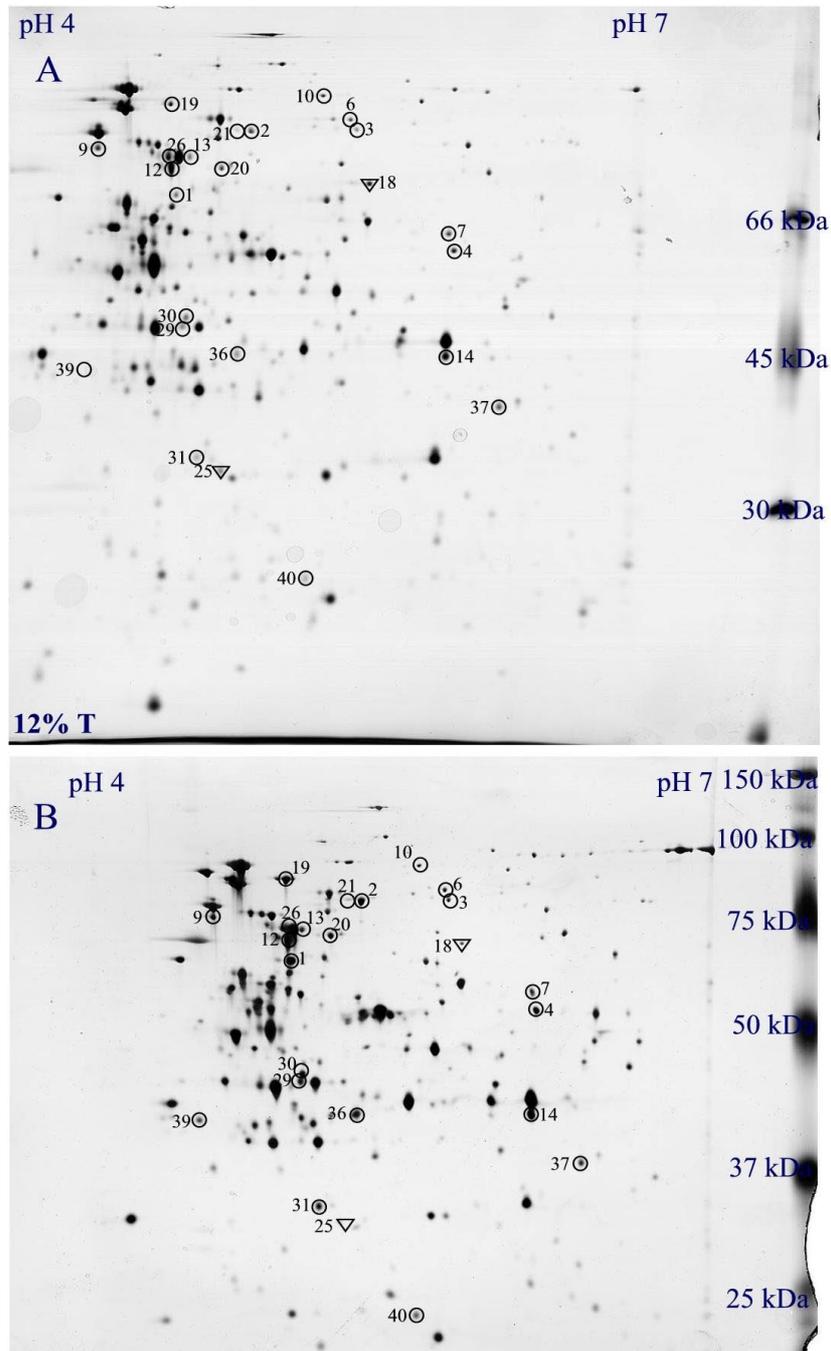


Abbildung 3.13: 2-D-Gele cytoplasmatischer Proteine von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ohne Streßbehandlung (A) und Zellen der stationären Wachstumsphase (B), silbergefärbt. Die überexprimierten (○) bzw. reprimierten (▽) nummerierten Spots sind identisch mit den in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Nummern.

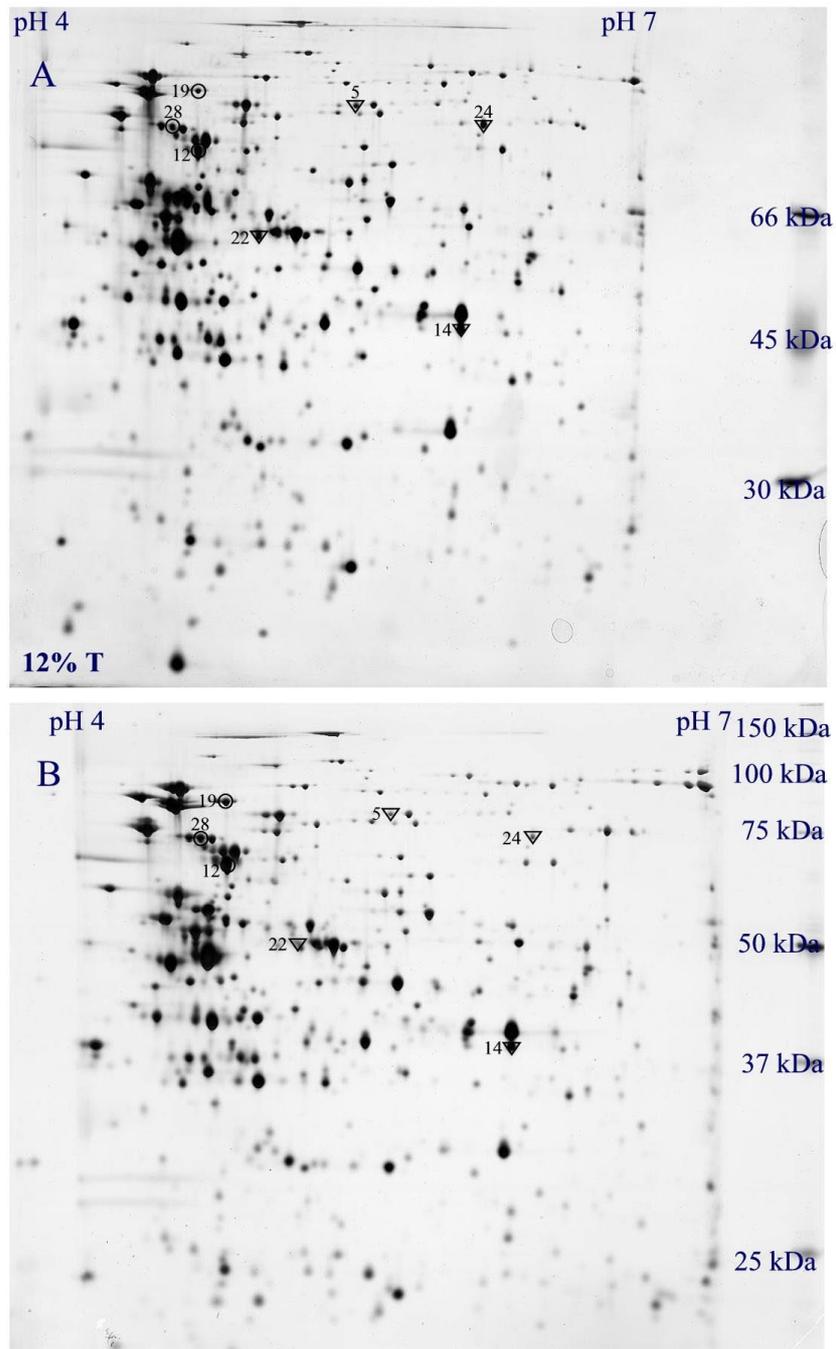


Abbildung 3.14: 2-D-Gele cytoplasmatischer Proteine von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ohne Streßbehandlung (A) und nach einer Temperaturstreßbehandlung mit 43 °C für 60 min. (B), silbergefärbt. Die überexprimierten (○) bzw. reprimierten (▽) nummerierten Spots sind identisch mit den in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Nummern.

Acht der hochdruckinduzierten Proteine wurden bei drei anderen Streßarten gleichfalls induziert. Von diesen Proteinen wurden bei Säurestreß sechs (Spot 3, 4, 6, 7, 9 und 30), bei Osmostreß acht (Spot 3, 4, 6, 7, 9, 12, 19 und 30), bei stationären Zellen acht (Spot 3, 4, 6, 7, 9, 12, 19 und 30) und bei Hitzestreß zwei (Spot 12 und 19) Proteine induziert. Keines dieser Proteine wird reprimiert.

Es war in dem untersuchten pH-Bereich von 4-7 kein Protein zu detektieren, für das generell bei allen Streßarten eine Induktion eindeutig zu bestimmen war.

Tabelle 3.1: Eigenschaften verschiedener durch Hochdruck-, Säure-, Kochsalz-, und Temperaturstreß sowie durch die stationäre Wachstumsphase induzierter oder reprimierter Proteine. Die Analyse wurde mittels der Computersoftware ImageMaster II durchgeführt. Je zwei Gele zweier unabhängig durchgeführter Proben wurden gemittelt.

<i>Spot</i>	<i>pI</i>	<i>MW [kDa]</i>	<i>Induktions-/ Repressionsfaktor*</i>				
			<i>HP</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>stationär</i>	<i>T</i>
1	4,8	77,9	9,4	-	4,0	6,2	-
2	5,2	90,5	9,0	0,5	2,9	10,4	-
3	5,7	90,5	8,3	2,4	5,9	4,7	-
4	6,1	64,8	7,4	3,1	7,4	5,0	n.a.
5	5,5	92,8	7,3	3,3	4,7	-	0,5
6	5,6	92,6	6,5	4,2	8,4	4,0	-
7	6,1	67,8	4,8	2,4	4,7	2,2	n.a.
8	5,9	91,7	4,7	3,1	3,2	n.a.	n.a.
9	4,4	88,8	4,5	2,1	3,4	6,7	-
10	5,5	98,3	4,3	-	7,4	2,5	-
11	6,0	97,2	4,3	-	5,1	-	n.a.
12	4,7	89,4	4,0	-	2,6	4,1	3,0
13	4,9	85,2	3,8	-	3,9	6,0	-
14	6,1	49,0	3,7	0,4	-	3,1	0,1
15	5,5	74,6	3,7	-	3,0	-	-
16	6,5	76,5	3,6	n.a.	n.a.	n.a.	-
17	4,8	46,1	3,4	-	2,3	-	n.a.
18	5,7	78,6	3,0	6,3	4,9	0,5	-
19	4,8	97,9	3,0	-	6,9	10,1	3,0

Tabelle 3.1: Fortsetzung

<i>Spot</i>	<i>pI</i>	<i>MW [kDa]</i>	<i>Induktions-/ Repressionsfaktor*</i>				
			<i>HP</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>stationär</i>	<i>T</i>
20	5,0	82,7	2,8	-	5,2	6,1	-
21	5,1	79,4	2,7	n.a.	-	2,6	-
22	5,1	64,8	2,6	-	-	-	0,4
23	5,7	58,6	2,3	2,6	3,8	-	-
24	6,2	86,2	2,3	-	4,7	n.a.	0,1
25	5,0	37,1	2,2	3,0	5,3	0,4	-
26	4,8	85,6	2,2	-	-	2,2	n.a.
27	4,4	55,3	2,1	2,4	-	-	n.a.
28	4,8	82,9	2,1	-	2,8	-	2,6
29	4,8	54,9	2,1	-	-	6,5	-
30	4,8	54,2	2,0	2,0	2,0	5,9	-
31	4,9	38,5	-	5,1	3,7	7,4	n.a.
32	4,7	34,3	-	3,1	2,9	-	n.a.
33	5,1	83,1	-	2,1	3,5	-	-
34	5,4	50,9	-	0,4	-	-	n.a.
35	6,1	50,9	-	0,3	-	-	-
36	5,1	50,6	-	-	2,4	8,2	-
37	6,3	43,4	-	-	3,0	2,2	n.a.
38	5,5	36,1	-	-	3,0	-	-
39	4,3	34,5	-	n.a.	-	12,1	-
40	5,4	27,5	n.a.	6,1	7,0	3,1	n.a.
41	6,6	22	+ ^{a)}	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

*: durch Mittelung zweier Gele von unabhängig voneinander behandelten Proben; Werte größer als 2 und kleiner als 0,5 wurden als Überexpression bzw. Repression festgelegt; normierte Gele behandelter und unbehandelter Zellen wurden in Relation gesetzt

-: keine Regulation

n.a.: nicht eindeutig auswertbar

^{a)}: Spot wurde visuell als überexprimiert bestimmt

Zusätzlich wurden noch für zehn Proteine, die keine hochdruckinduzierte Repression oder Induktion zeigten, eine durch andere Streßarten hervorgerufene Veränderung der Expression bestimmt. Dies waren im Einzelnen für Säurestreß eine Induktion von vier (Spot 31, 32, 33 und 40) und eine Repression von zwei Proteinen (Spot 34 und 35). Für die Kochsalz-induzierte Streßantwort konnte im Vergleich zur Hochdruckbehandlung eine zusätzliche Induktion von sieben Proteinen (31, 32, 33, 36, 37, 38 und 40) bestimmt werden.

Stationäre Zellen zeigten bei zusätzlich fünf Proteinen eine Induktion der Expression (Spot 31, 36, 37, 39 und 40). Bei Hitzestreß konnten keine zusätzlich überexprimierten oder reprimierten Proteine detektiert werden.

Die isoelektrischen Punkte, Molekulargewichte und Induktions- bzw. Repressionsfaktoren sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

3.1.8 Identifizierung einzelner Proteine

Zur Identifizierung einzelner durch Hochdruck überexprimierter Proteine wurden Peptidsequenzen mittels N-terminaler Sequenzierung bestimmt. Hierbei zeigt die für den Proteinspot 1 (vgl. Abbildung 3.15) bestimmte Peptidsequenz *GANQAIAAA(R)* eine Ähnlichkeit zu dem Protein RbsK, einer Ribokinase von *Rhizobium loti*, *Bacillus sp.* und *Lactobacillus sakei*, wobei diese Ribokinasen wesentlich kleiner sind (31-37 kDa) als das hier vorliegende Protein (78 kDa).

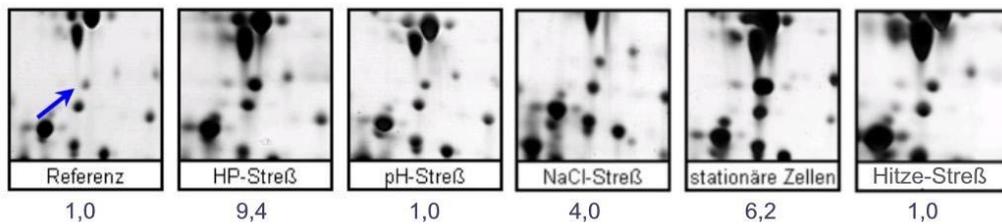


Abbildung 3.15: Expression von Spot 1 (Pfeil) bei verschiedenen Bedingungen. Deutlich ist bei stationären Zellen und Hochdruckstreß eine Überexpression zu sehen; Zahlen unter den Ausschnitten geben den Induktionsfaktor an.

Für den Proteinspot 2 (Abbildung 3.16) konnte mittels der bestimmten Peptidsequenz *GEISVIGATTQDEYR* eine Homologie zu ClpL, einer ATP-abhängigen Protease bestimmt werden. Für den Proteinspot 4 (Abbildung 3.17) konnte trotz zwei ermittelter Peptidsequenzen (*DAFKLPFETY(A)* und *DIVIKSGK(K)AE*) keine große Ähnlichkeit zu einem bereits in der Protein-Datenbank befindlichen Protein bestimmt werden. Ebenso verhält es sich mit dem Proteinspot 41 (Abbildung 3.21; Peptidsequenz (PS): *(K)LIEELY(K)*). Für die durch Hochdruck induzierten Proteine 7 (Abbildung 3.17; PS: *DEISQLKRNKETP* und *RR(D)LIV(K)*), 14 (Abbildung 3.19: PS: *FANNRAAAVNTIPHSSGAAK*) und 12 (Abbildung 3.18: PS: *AAVEEGFVPGGGTAFINILK*) konnte mittels Datenbankrecherche eine große Ähnlichkeit bzw. Homologie zu Seryl-tRNS-Synthetase, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GapDH) bzw. GroEL (HSP60) bestimmt werden. Das durch

Säurestreß reprimierte Protein 34 (Abbildung 3.20) zeigt anhand der Peptidsequenzen (K)YCVTGNETLCRNV(K) und (K)TVLDGIK große Ähnlichkeit zu einer Alkoholdehydrogenase AdhE von *Streptococcus pyogenes*. Dieses Protein zeigte bei einem Hochdruckstreß von nur 45 min. bei 80 MPa bei visueller Auswertung eine starke Überexpression.

Tabelle 3.2: Durch N-terminale Sequenzierung ermittelte Peptidsequenzen

Spot	Sequenzen	Ähnlichkeit	Funktion
1	GANQAIAAA(R)	<i>Rhizobium loti</i> 0.021 <i>Bacillus subtilis</i> 0.055 <i>Bacillus halodurans</i> 0.055 <i>Lactobacillus sakei</i> 0.11	evtl. RbsK (Ribokinase), MW zu klein
2	GEISVIGATTQDEYR	<i>Staphylococcus aureus</i> $2.4 \cdot 10^{-07}$ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> $3.6 \cdot 10^{-07}$ <i>Streptococcus pneumoniae</i> $8.7 \cdot 10^{-07}$ <i>Lactococcus lactis</i> $1.3 \cdot 10^{-05}$	ClpL, ATP-abhängige Protease
4	DAFKLPFETY(A) DIVIKSGK(K)AE	<i>Pyrococcus abyssi</i> 0.92 <i>Clostridium acetobutylicum</i> 0.9999	D-Aminoacylase Aminopeptidase
7	DEISQLKRNKETP RR(D)LIV(K)	<i>Lactococcus lactis</i> 0.32 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 0.63 <i>Streptococcus salivarius</i> 0.97	Seryl-tRNS-Synthetase
12	AAVEEGFVPGGGTAFINILK	<i>Clostridium perfringens</i> $1.0 \cdot 10^{-07}$ <i>Bacillus halodurans</i> $1.5 \cdot 10^{-06}$ <i>Clostridium acetobutylicum</i> $2.1 \cdot 10^{-06}$ <i>Lactobacillus johnsonii</i> $1.6 \cdot 10^{-05}$ <i>Lactobacillus zeae</i> $3.2 \cdot 10^{-05}$	GroEL, HSP60
14	FANNRAAAVNTIPHSSGAAK	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> $6.3 \cdot 10^{-06}$ <i>Brachyspira murdochii</i> $3.3 \cdot 10^{-05}$ <i>Escherichia coli K12</i> 0.00029 <i>Clostridium acetobutylicum</i> 0.00040	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GapDH)
34	(K)YCVTGNETLCRNV(K) (K)TVLDGIK	<i>Streptococcus pyogenes</i> $1.5 \cdot 10^{-07}$ <i>Zymomonas mobilis</i> $1.4 \cdot 10^{-07}$ <i>Salmonella typhimurium</i> $1.9 \cdot 10^{-07}$ <i>Streptococcus pneumoniae</i> $4.1 \cdot 10^{-06}$ <i>Escherichia coli K12</i> $9.4 \cdot 10^{-05}$	AdhE (Alkoholdehydrogenase)
41	(K)LIEELY(K)	<i>Streptococcus thermophilus</i> 0.9997 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 0.9999	EPSK Methyltransferase

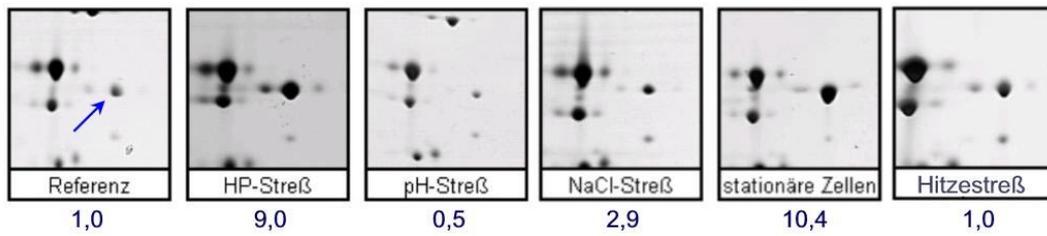


Abbildung 3.16: Expression von Spot 2 (Pfeil) bei verschiedenen Bedingungen. Deutlich ist bei stationären Zellen und Hochdruckstreß eine starke, bei Kochsalzstreß eine schwache Überexpression, sowie bei pH-Streß eine geringe Repression zu sehen; Zahlen unter den Ausschnitten geben den Induktionsfaktor bzw. Repressionsfaktor an.

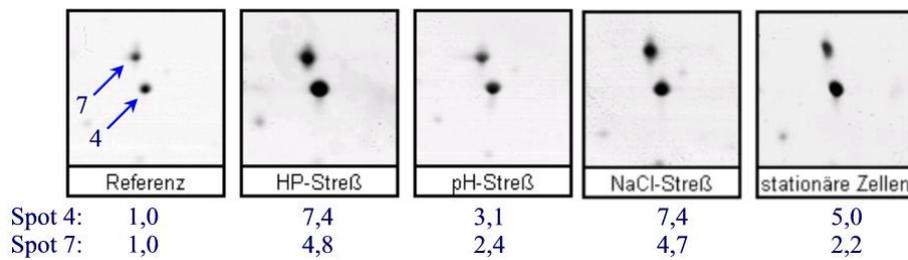


Abbildung 3.17: Expression der Spots 4 und 7 (Pfeil) bei verschiedenen Bedingungen. Deutlich ist bei diesen beiden Spots im Vergleich zu unbehandelten Zellen generell eine deutliche Überexpression zu beobachten. ; Zahlen unter den Ausschnitten geben den Induktionsfaktor an.

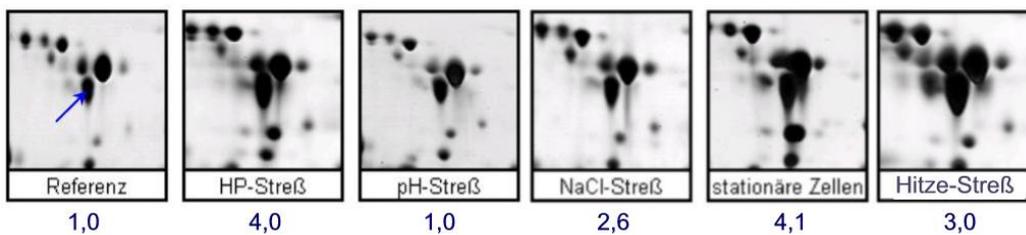


Abbildung 3.18: Expression von Spot 12 (Pfeil) bei verschiedenen Bedingungen. Deutlich ist bei stationären, hochdruckbehandelten und hitzebehandelten Zellen eine starke, bei Kochsalzstreß eine schwache Überexpression zu sehen; Zahlen unter den Ausschnitten geben den Induktionsfaktor an.

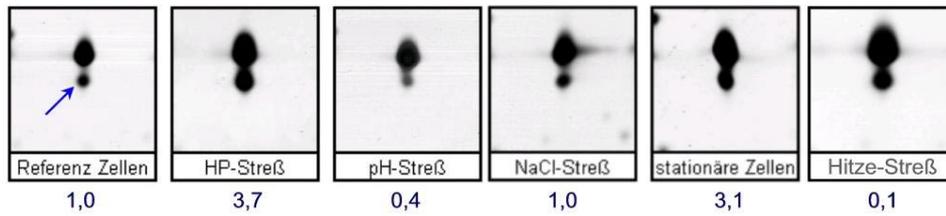


Abbildung 3.19: Expression von Spot 14 (Pfeil) bei verschiedenen Bedingungen. Deutlich ist bei stationären Zellen und Hochdruckstreß eine starke Überexpression, bei pH-Streß und Hitzestreß nach erfolgter Normalisierung eine Repression zu sehen; Zahlen unter den Ausschnitten geben den Induktionsfaktor bzw. Repressionsfaktor an.

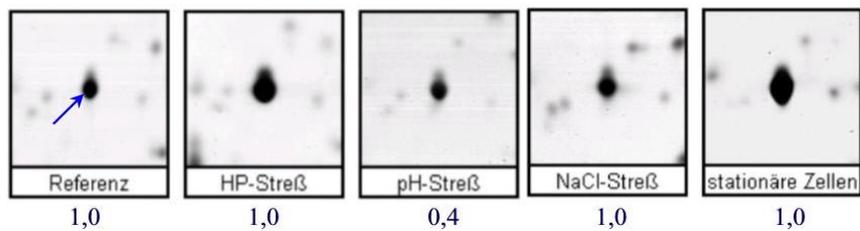


Abbildung 3.20: Expression von Spot 34 (Pfeil) bei verschiedenen Bedingungen. Deutlich ist bei pH-Streß eine Repression zu sehen. Für hochdruckbehandelte Zellen ergab sich nach 45 min. eine Überexpression, die nach 60 min. nicht mehr zu beobachten war; Zahlen unter den Ausschnitten geben den Induktionsfaktor bzw. Repressionsfaktor an.

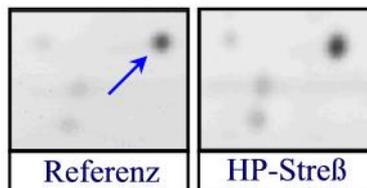


Abbildung 3.21: Expression von Spot 41 (Pfeil) bei unbehandelten und hochdruckbehandelten Zellen.

3.1.9 Gensequenz einzelner überexprimierter Proteine

Zur genaueren Charakterisierung der ansequenzierten Proteine wurden anhand der ermittelten Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Proteinen, die in Tabelle 2.4 aufgeführten degenerierten Primer abgeleitet. Mit diesen wurde für die Proteine AdhE, ClpL, GroEL und RbsK je eine

partielle Nukleotidsequenz bestimmt. Die Partialsequenzen, die Homologie zu anderen Mikroorganismen und die daraus jeweils abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abbildung 3.22 bis Abbildung 3.25 dargestellt. Die in 3.1.7 bestimmten Peptidsequenzen sind hervorgehoben und mit einem Überstrich markiert.

Die Partialsequenz des Gens *rbsK* zeigt große Ähnlichkeit zu *Lb. sakei* 23K (Abbildung 3.22: Gensequenz: $1,0 \cdot 10^{-42}$, abgeleitete Proteinsequenz: $2,8 \cdot 10^{-43}$). Bei der abgeleiteten Peptidsequenz läßt sich auch eines der Peptide wiederfinden, das von DREWS *et al.* (2002) aus dem selben Protein sequenziert wurde. Die Partialnukleotidsequenz der ATP-abhängigen Proteinase ClpL zeigt große Homologie zu *Lc. lactis ssp. lactis* CNRZ270 (Gensequenz: $2,4 \cdot 10^{-82}$, abgeleitete Proteinsequenz: $1,3 \cdot 10^{-102}$ zu ClpL von *Lb. rhamnosus* RW-9595M), wobei sie dort Plasmid-codiert auftritt. Mittels der aus dem Proteinspot 28 abgeleiteten Primer läßt sich eine Nukleotidpartialsequenz amplifizieren, die große Ähnlichkeit zu dem Hitzeschockgen *groEL* aus *Lb. helveticus* LH212 zeigt (Gensequenz: $7,9 \cdot 10^{-101}$, abgeleitete Proteinsequenz: $1,3 \cdot 10^{-96}$). Das sequenzierte Peptid ist stark konservativ und läßt sich weitgehend auch in *Lb. helveticus* LH212 wiederfinden. Die mittels den beiden Primern adhv und adhr gewonnene Nukleotidpartialsequenz zeigt eine Ähnlichkeit zu einer Alkoholdehydrogenase aus *Neisseria meningitidis* MD58 (Gensequenz: $1,7 \cdot 10^{-15}$). Hier läßt sich jedoch das Ausgangspeptid nicht wiederfinden, da die Sequenzierungssignale des Amplifikats stets von starkem Grundrauschen überdeckt waren, und sich somit auch keine eindeutige Peptidsequenz ableiten läßt.

```
a:      1 TCGTTCTGGAGCAGACACTACATTTATTACTAAACTAGGTAATGATGAAGATGCGAAAAAT 60
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
b:    4596 TCGTTCAGGTGCCCAAACAGCTTTCATTAGTAAGGTTGGTAAAGAAGGTGCCGCTGATTT 4655
      -----
       R S G A D T T F (L) T K L G N D E D A K M

a:      61 GATGGTTAAGGGTTTTAAAGCAGACGGAATGAATATTGACGATGTGA--T-TACAACCAC 117
      ||| | | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
b:    4656 CATGATCGACACGTTCAAAAAGACGGGATGAACGTTGATCACGTGCGCTGTTTCAGAAAC 4715
      -----
      M V K G F K A D G M N I D D V I T T T

a:     118 CGATCAAGAAACCGGAAAAGCTTACATCACTGTTGATAAATCA-GGTCAAAAATTCGATTT 176
      | | || | || | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
b:    4716 AGCTGG-GACA--GGCCAAGCTTATATCATGGTTGATGC-TCACGGCCAAAATAGTATTT 4771
      -----
      D Q E T G K A Y I T V D K S G Q N S I
```



```
a: 555 TATTGCAGATTCAGTAGAACGTTTAACTGGAATTCCAGTATCACAAATGAGTACTGACGA 614
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1474 TGTGGCACAATCGGTTGAACGTTTAACTGGTATAACCAGTTTCTGATATGGGCGCTAATGA 1533
-----
      I A D S V E R L T G I P V S Q M S T D D

a: 615 TATGGAACGTTTGAAGAGTATGGACAGTCGTTTGAATCACACATCATCGGTCAAGATGA 674
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1534 TATTGAGCACTTGAAAAATCTTGATAAGCGTCTGAAAGTAATGGTAATCGGTGAAGATGA 1593
-----
      M E R L K S M D S R L K S H I I G Q D E

a: 675 AGCTGTTGACGCTGTAGTTGATGCCATTTCGTCGTAACCGTGCTGG-TTTTGATGACGGTA 733
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1594 AGCGGTTAAAATGGTAGCAAAGCAATTTCGGCGTAACCGTGCGGGCTTTTCA-GAGGGTG 1652
-----
      A V D A V V D A I R R N R A G F D D G

a: 734 ACCGGCCAATCGGTTTCATTCTTATTCGTTGGACCTACTGGTGTGGTAAAACCTGAA-TTA 792
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1653 ATCAGCCGAAAGGTAGTTTTCTGTTTGTGGGCCCAACTGGCGTAGGAAAAGACTGAACTTA 1712
-----
      N R P I G S F L F V G P T G V G K T E L

a: 793 GTTAAACAATTAGCAAAAAGACATGTTTAAACGATGAAGATTCAATTATCCGTCTT-GATAT 851
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1713 GTCAGGCA-TTAGCCTTAGATATGTTTGGAAATGAAAATGCG-TTATTCGGCATAGATAT 1770
-----
      V K Q L A K D M F N D E D S I I R L D M

a: 852 GTCAGAATACCAAGATGAAACTGCTGTTTCAAAGATGATTGGTGCTACTGCTGGTTACGT 911
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1771 GAGTGAATATGCTGATCGTACAGCTGTGTGCGAAATTAATTGGTACCTCGGCTGGATACGT 1830
-----
      S E Y Q D E T A V S K M I G A T A G Y V

a: 912 TGGTTACAACGATAACGGTAATACCCTTACTGAACGTGTAAGAAGAAATCCCTTACTCA 968
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
c: 1831 AGGCTATGAAGATAATGCTAATACTCTAACTGAACGGGTTTCGGCGTAATCCATATTC 1887
-----
      G Y N D N G N T L T E R V R R N P Y S
```

Abbildung 3.23: Partialnukleotidsequenz von *clpL* aus *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (a), die Ähnlichkeit zu *Lc. lactis ssp. lactis* CNRZ270 (c) und die abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Aminosäuren des sequenzierten Peptids sind mit einem Überstrich gekennzeichnet.

```

a: 486 GGAAGAGCAACGGCAACTAAA-GTACCATTTGGTTCTAAGGCG-TTAACGGCATTAGTA- 430
      ||  ||  |  |  |||||  |  |  ||  ||  |  |  ||  ||  |||||  |||
e: 7786 GGCAGCCCGATGGCAACCACACGT-CCGCCCGCG-CGGACGCAATTCACGGCAG-AGTTG 7842

a: 429 AATGCTTGAGCACTAACGGCGGTTACGATTGAATCGTGAACCCACCA-TTAGTTCCTTT 371
      |||||  ||||  |||||  |||||  ||  ||  ||||  ||  ||  |||||  |||
e: 7843 AATGCGGCAGCAGATACGGCGGTTACGACCGCAGCGTGTGCGCCGCCGGTTTTTTTCTCTGA 7902

a: 370 TATAACTTGTTTCAGTTGCGTCAGCATCATGACGG--TTAACAACTAAATCAGCACCATTT 313
      ||  ||||  ||  ||  |||||  |  |  ||  ||  ||  ||||  |||||  ||||  ||  ||
e: 7903 -ATCACTTTGGCAG-- -CGTCTTCTT- -TGGCGGCGTTGACAACCAAATCCGCGCCGGTT 7956

a: 312 TCTTTAGCAGCTTCAAGCTTCTTAG-GATCACCATCAGTAACAACACTACTTTAGCNCGNNA 254
      |||||  |||  |  ||  ||  |  |  |  ||  |  |  |  ||  |  |  |  ||  |  |
e: 7957 TCTTTGGCAAACGCCAGTTTGTGTCGTTGATG-TCGATGGCGACAACGTGCGCGCCGAA 8015

a: 253 CANGTTGTGACAGAATTG-ATCACAAGGATTACNTGAGACCGCCGGCTCCTGACGGTATT 195
      |  ||  |  |  ||||  |  |  |  ||  |  |  |||||  ||  ||  |  |  ||  ||
e: 8016 TACTTTTTTTCGCGTATTGGACCCCAAG-TTGCCCAA-ACCGCCCGCGCCGTA--G-ATG 8070

a: 194 G-AGTCCATTTCGCCAGGCTCAGGNNCNCCANNNNTTAGAGCGCGGTAAGNAGTGANNNCG 136
      |  |  ||||  |  |  ||  |  |  |  |  |  ||  |  |  ||||  ||  ||  ||  ||
e: 8071 GCAATCCACTGTCCCGGACGAACGCCGGAAACTTTAATGGCTTTATAAGTGTTACACCG 8130

a: 135 GCCCAAGTTAATTA-GGNNGNNNCNACNGGGCCGAGTCCNTNNGNNACTTNANNAGCGTA 77
      ||  |||||  ||  ||  ||  |  |  ||  |  |  ||  |  |  ||||  |||||  ||||
e: 8131 GCACAAGT-AATGCTGGAAGCTTGCAGGATCCAAACCTTCAGGGACTTTGACCGCGTA 8189

a: 76 TTCGGCATCNACNATGCATTTCAGCANCCANGGCACCANCAACAGTGTNCCNNGCG 22
      |||||  ||  ||  ||  |  |  ||  |  |  ||  |  |  ||||  ||  ||  ||
e: 8190 ATCGGCACTCACGATACAGTGGGTCGCCATACCGCCGTCGGCGGTGTAGCCCGCG 8244

```

Abbildung 3.25: Partialnukleotidsequenz einer Alkoholdehydrogenase aus *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 (a) und ihre Ähnlichkeit zu *Neisseria meningitidis* MD58 (e).

3.2 Untersuchung der Hochdruckstreßantwort gramnegative Bakterien am Beispiel *Escherichia coli*

3.2.1 Einfluß des Drucks auf das Wachstum von *Escherichia coli* JM109(DE3)

Zur Bestimmung der optimalen Druckintensität zur Induktion der Hochdruckstreßantwort wurde eine logarithmisch wachsende Kultur von *Escherichia coli* JM109(DE3) für 15 min. bei 30 °C verschiedenen Drücken ausgesetzt. Vor und nach der Druckbehandlung wurde die Keimzahl bestimmt. Abbildung 3.26 zeigt den Anteil der überlebenden Zellen, aufgetragen in Prozent, in Abhängigkeit von der Druckhöhe. Als Referenzstreß diente die im Manual zur Durchführung der Detektion der Hitzeschockantwort mittels DNS Micro-Array (vgl. 2.27) vorgeschriebene Streßintensität von 7 min. bei 50 °C. Bei einer Hochdruckbehandlung von

60 MPa für 15 min. nimmt die Zellzahl auf 88% ab. Diese Behandlung zeigt ungefähr die gleiche prozentuale Abnahme der lebenden Zellen, wie der Referenzhitzeschock. Bei Drücken von 80 bzw. 100 MPa nimmt der Anteil der überlebenden Zellen auf 40 bzw. 32% ab. Bei höheren Drücken ist die Keimzahl um mehr als eine Zehnerpotenz dezimiert.

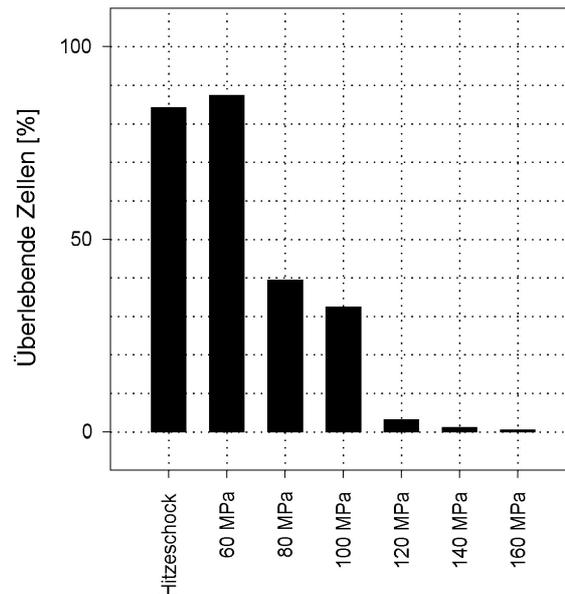


Abbildung 3.26: Einfluß verschiedener Drückhöhen bei 15 minütiger Inkubation auf die Anzahl der überlebenden Zellen von *Escherichia coli* JM109(DE3); Kontrollprobe wurde für sieben Minuten einem Streß von 50 °C ausgesetzt. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen

3.2.2 Untersuchung der Hochdruckstreßantwort von *Escherichia coli* JM109(DE3) mittels DNS-Micro-Array

Zur Untersuchung der Hochdruckschockantwort von *Escherichia coli* JM109(DE3) wurde eine logarithmisch wachsende Kultur für 15 min. einem Druck von 60 MPa ausgesetzt. Zur Vermeidung starker Temperaturschwankungen und etwaigen damit induzierten Hitze- oder Kälteschockantworten wurde der Druck mit 30 MPa pro sek. auf- und abgebaut. Unmittelbar nach der Streßbehandlung wurde die Gesamt-RNS aus den hochdruckbehandelten Zellen isoliert. Als Kontrolle diente die RNS ungestreßter Zellen. Zum Vergleich mit der durch Hitze

induzierten Antwort diente RNS aus einer *E. coli* Kultur, die für sieben Minuten einer Temperatur von 50 °C ausgesetzt wurde. Die Änderung der Transkription von 33 verschiedenen Genen wurde mittels DNS-Micro-Array (MWG Biotech AG, Ebersberg) untersucht. Von den untersuchten 33 Genen waren nur 27 eindeutig auswertbar. Eine Zunahme der Intensität um den Faktor 1,5 oder mehr wurde als Überexpression, bei einer Abnahme um 0,5 oder kleiner als Repression angenommen.

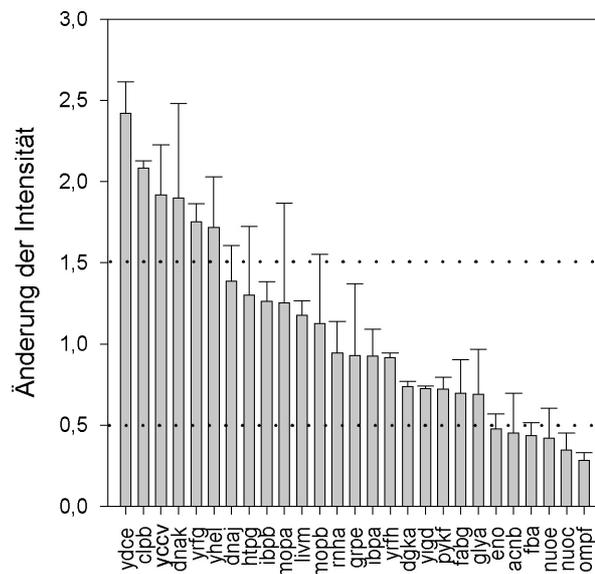


Abbildung 3.27: Mengenänderung verschiedener Gentranskripte von *Escherichia coli* JM109(DE3) nach einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung von 15 min. bei 60 MPa

Wie in Abbildung 3.27 und Tabelle 3.3 dargestellt, wurden sechs der 27 auswertbaren Gene durch eine Hochdruckbehandlung eindeutig induziert, sechs Gene reprimiert und 15 Gene nicht reguliert oder nicht signifikant induziert bzw. reprimiert. Bei den induzierten Genen handelte es sich um Gene, die zum Teil auch klassischerweise bei Hitzeschock induziert werden und als Chaperone oder Proteinase fungieren (*dnak*, *clpb*). Als Chaperone bezeichnet man Proteine, die für den Aufbau oder die richtige Faltung anderer Proteine benötigt werden, aber selbst kein Bestandteil des jeweiligen Proteinkomplexes sind. Im Einzelfall besitzen Chaperone auch proteolytische Aktivität und bauen falsch gefaltete Proteine ab.

Weiterhin wurden Gene induziert, die im Hitzeschockreferenzversuch nicht reguliert (*yccv*, *yhel*, *yrfg*) oder reprimiert (*ydce*) waren. Die Funktion der letztgenannten Gene ist hierbei nicht oder noch nicht eindeutig geklärt. Bei den reprimierten Genen handelte es sich

vorwiegend um Gene, die auch durch Hitzeschock reprimiert wurden (*eno*, *fba*, *nuoc*, *nuoe*) und allesamt eine Funktion im Energiestoffwechsel haben. Außerdem wurde die Translation der Gene *acnb* und *ompf* unterdrückt, die im Hitzeschock-Kontrollexperiment nicht weiter reguliert wurden. Sie codieren für Aconitathydrase B (*acnb*) und das Membranprotein OmpF. Von den unter Hochdruck nicht regulierten Proteinen werden ebenfalls fünf im Hitzeschockreferenzansatz nicht reguliert (*glya*, *grpe*, *htpg*, *livm*, *yrfh*) fünf jedoch induziert (*dnaj*, *ibpa*, *ibpb*, *mopa*, *mopb*) und fünf reprimiert (*dgka*, *fabg*, *rnha*, *pykf*, *yigd*).

Tabelle 3.3: Vergleich der Änderung der Menge verschiedener Gentranskripte von *Escherichia coli* JM109(DE3) nach einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung von 15 min. bei 60 MPa bzw. Hitzebehandlung von 7 min. bei 50 °C

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Expression nach Hochdruckschock</i>		<i>Expression nach Hitzeschock</i>	
			<i>Faktor</i>		<i>Faktor</i>
<u>Induziert</u>					
<i>clpb</i>	Hitzeschockprotein	+	2,08	+	9,06
<i>dnak</i>	Chaperone Hsp70; DNS Biosynthese; autoreguliertes Hitzeschockprotein	+	1,90	+	5,22
<i>yccv</i>	ORF, hypothetisches Protein	+	1,92	+/-	1,06
<i>yhel</i>	ORF; hypothetisches Protein	+	1,72	+/-	0,56
<i>yrfg</i>	vermeintliche Phosphatase	+	1,75	+/-	1,09
<i>ydce</i>	ORF; hypothetisches Protein	+	2,42	-	0,34
<u>Nicht reguliert</u>					
<i>mopa</i>	GroEL, Chaperone Hsp60; peptidabhängige ATPase; Hitzeschockprotein	+/-	1,25	+	4,74
<i>mopb</i>	GroES, 10 kDa Chaperone	+/-	1,12	+	5,18
<i>dnaj</i>	Chaperone mit DnaK; Hitzeschockprotein	+/-	1,39	+	2,85
<i>ibpa</i>	Hitzeschockprotein	+/-	0,92	+	7,89
<i>ibpb</i>	Hitzeschockprotein	+/-	1,26	+	3,70
<i>glya</i>	Serinhydroxymethyltransferase	+/-	0,69	+/-	0,60

Tabelle 3.3: Fortsetzung

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Expression nach Hochdruckschock</i>		<i>Expression nach Hitzeschock</i>	
			<i>Faktor</i>		<i>Faktor</i>
<u>Nicht reguliert</u>					
<i>grpe</i>	Hitzeschockprotein; Proteinreparation	+/-	0,93	+/-	1,36
<i>htpg</i>	Chaperone Hsp90; Hitzeschockprotein C62,5	+/-	1,30	+/-	1,20
<i>livm</i>	hochaffinitativer Aminosäuretransporter	+/-	1,17	+/-	0,72
<i>yrfh</i>	ORF, hypothetisches Protein; ähnlich zu Hitzeschockprotein 15	+/-	0,91	+/-	1,01
<i>dgka</i>	Diacylglycerolkinase	+/-	0,74	-	0,29
<i>fabg</i>	3-Oxoacyl-[Acyl-Transport-Protein]-Reduktase	+/-	0,69	-	0,15
<i>rnha</i>	RNase HI, beteiligt an DNS-Replikation	+/-	0,94	-	0,15
<i>pykf</i>	Pyruvatkinase I, Fructosestimuliert	+/-	0,72	-	0,27
<i>yigd</i>	ORF; hypothetisches Protein	+/-	0,73	-	0,45
<u>Reprimiert</u>					
<i>eno</i>	Enolase	-	0,48	-	0,27
<i>fba</i>	Fructose-Biphosphat-Aldolase. Klasse II	-	0,43	-	0,12
<i>nuoc</i>	NADH-Dehydrogenase I; Kette C, D	-	0,35	-	0,15
<i>nuoe</i>	NADH-Dehydrogenase I; Kette E	-	0,42	-	0,10
<i>acnb</i>	Aconitathydrase B	-	0,45	+/-	0,61
<i>ompf</i>	äußeres Membranprotein 1a	-	0,28	+/-	0,62

3.3 Untersuchung zur Eignung von GFP als Markerprotein zur Detektion hochdruckinduzierter Streßantworten

GFP aus der pazifischen Tiefseequalle *Aequorea victoria* rief in den letzten Jahren in Bereichen der Biochemie, Zellbiologie und Molekularbiologie ein großes Interesse hervor. Insbesondere in der Molekularbiologie wird es mittlerweile wegen seiner fluoreszierender

Eigenschaften gerne als Markerprotein für die Genexpression oder subzelluläre Lokalisation verwendet [MISTELI und SPECTOR, 1997]. GFP wurde schon in einer Vielzahl von Mikroorganismen und unter verschiedensten Bedingungen exprimiert. Die Eignung als Markerprotein für die Detektion hochdruckinduzierter Streßantworten wurde bislang jedoch nicht untersucht. Hierfür ist es notwendig, die Druckstabilität des (gereinigten) Proteins und die Expression unter Hochdruck mit der anschließenden Faltung und der Ausbildung des Chromophors zu untersuchen. Im Einzelnen wurden diese Versuche mit wtGFP und den Mutanten rsGFP (=AFP), GFP_{mut1} (=EGFP) und GFP_{mut2} durchgeführt. Weiterhin wurde die Eignung des rotfluoreszierende Protein DsRed aus der Koralle *Discosoma sp.* als Markerprotein untersucht.

3.3.1 Reinigung von GFP

Zur Reinigung von GFP wurden die bereits bestehenden Protokolle von YAKHNIN *et al.* (1998) und DESCHAMPS *et al.* (1995) modifiziert, um bei geringerem Zeitaufwand eine größere Ausbeute zu erreichen. Zur Reinigung wurden die hydrophoben Eigenschaften von GFP ausgenutzt. Abbildung 3.28 zeigt das Chromatogramm der Reinigung von GFP mittels einer Phenylsepharosesäule. Etwaige noch vorhandene Verunreinigungen wurden mittels Größenausschlußchromatographie entfernt (Abbildung 3.29). Die einzelnen Reinigungsschritte und ihre Ausbeute sind in Tabelle 3.4 bzw. Abbildung 3.30 dargestellt.

Tabelle 3.4: Reinigung von GFP mittels Ammoniumsulfatfällung, Hydrophobizitäts- (HIC) und Größenausschlußchromatographie (GAC)

<i>Reinigungsschritt</i>	<i>Proteingehalt [mg]</i>	<i>Relative Fluoreszenz [RFU]</i>	<i>Reinigungs- Verbesserung</i>	<i>Ausbeute [%]</i>
Lysat	281	1040	1,0	100
50% (NH₄)₂SO₄	134	748	1,5	72
80% (NH₄)₂SO₄	78	192	0,7	18
HIC	11	107	2,6	10
GAC	10	99	2,7	10

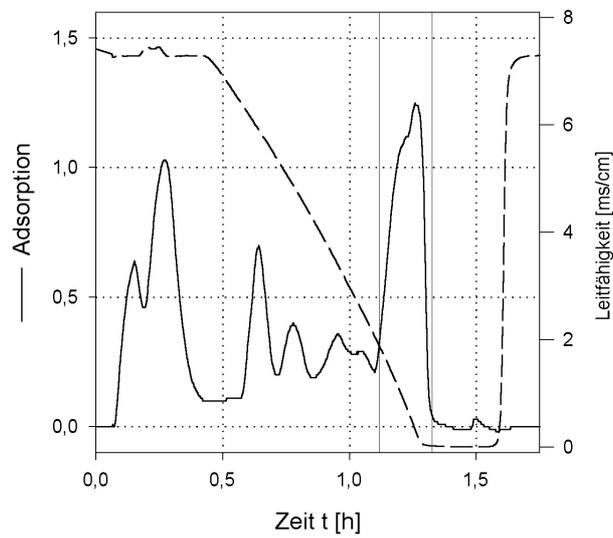


Abbildung 3.28: Chromatogramm der Reinigung von GFP mittels Phenylsepharose. Die gestrichelte Linie gibt die Änderung der Leitfähigkeit an, die durchgezogene die Änderung der Adsorption. GFP wird nach ca. 1,2 h eluiert. Der für die weitere Reinigung verwendete Peak ist durch zwei begrenzende Linien angezeigt.

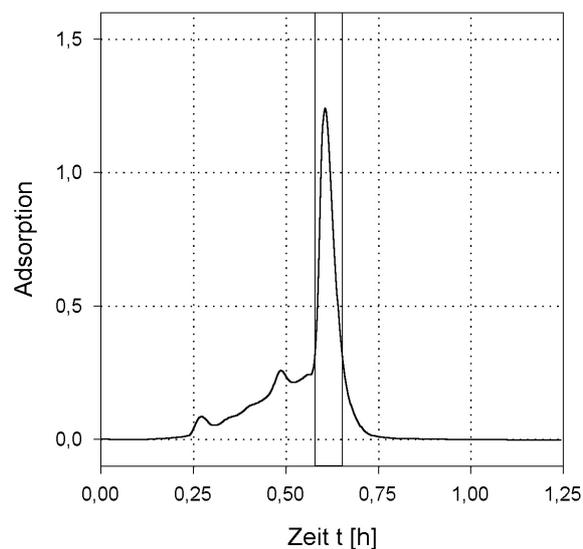


Abbildung 3.29: Chromatogramm der Reinigung von GFP mittels Gelfiltration. GFP wird nach ca. 0,6 h eluiert. Der für die weitere Untersuchungen verwendete Peak ist durch zwei begrenzende Linien angezeigt.

Die Ausfällung mit 80% Ammoniumsulfat verringert zwar die Ausbeute, ist jedoch für die weitere Reinigung vorteilhaft, da wesentlich geringere Volumina in der Säulenchromatographie eingesetzt werden können. Während die Hydrophobizitätsinteraktionschromatographie (HIC) eine Verbesserung der Ausbeute um den Faktor 2,6 bewirkt, ist die Größenausschlußchromatographie (GAC) von untergeordneter Bedeutung, da sie kaum eine Änderung bei der Ausbeute bewirkt.

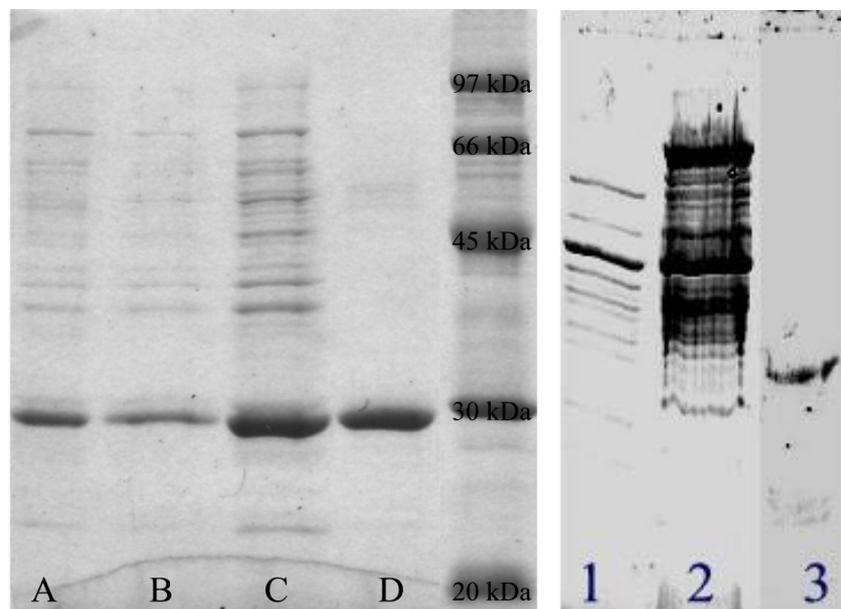


Abbildung 3.30: SDS-PAGE zur Reinigung von rsGFP (links) und DsRed (rechts). (A) Rohextrakt, (B) nach 50% Ammoniumsulfatfällung, (C) nach 80% Ammoniumsulfatfällung, (D) nach HIC, (1) Molekulargewichtsmarker, (2) Rohextrakt, (3) nach Elution mit 500 mM Imidazol

Zur Reinigung von DsRed wurde dieses Protein mit einem 6×Histidinrest versehen. Hierzu wurde der Vektor *pET3a* (mod.) durch die Enzyme *NdeI* und *BamH* geschnitten. Die Gensequenz von DsRed wurde durch die Primer 5'-TCG CCA CAT ATG AGG TCT AAG AAT G-3' und 5'-ATA TAG GAT CCA GGA ACA GAT GGT GGC G-3' amplifiziert und ebenfalls mittels *NdeI* und *BamH* behandelt. Vektor und Amplifikat wurden ligiert, kloniert und anschließend DsRed über Nickelchelatchromatographie nach den Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) in Anlehnung an bestehende Protokolle [GROSS *et al.*, 2000; FRADKOV *et al.*, 2000; MATZ *et al.*, 1999] gereinigt. Abbildung 3.30 zeigt die SDS-PAGE zur Reinigung von DsRed. Dieses Protein wurde für weitere

Untersuchungen jedoch nicht berücksichtigt, da es bis zum Auftreten der ersten Fluoreszenz mehr als 24 h dauert. Es ist deshalb als Markerprotein für die Online-Messung der Genexpression denkbar ungeeignet.

3.3.2 Verhalten von GFP in Abhängigkeit des pH-Werts

Die Aktivität von Enzymen und Proteinen ist stark von den Milieubedingungen abhängig. Wie in Abbildung 3.31 dargestellt, ist die Fluoreszenz von wtGFP und den Mutanten rsGFP, GFP_{mut1} und GFP_{mut2} insbesondere stark vom pH-Wert abhängig. Der Verlauf der drei Mutanten ist sehr ähnlich und unterscheidet sich deutlich von der pH-Abhängigkeit von wtGFP. Bei einem pH-Wert unter 4,5 zeigt keines der vier Proteine eine meßbare Fluoreszenz. Im Bereich zwischen pH 5 und pH 7 nimmt die Intensität der Fluoreszenz bei allen vier untersuchten Proteinen stark zu, mit einem anschließenden Plateau im Bereich pH 7 bis 10. Mit Ausnahme von wtGFP nimmt danach die Fluoreszenz wieder ab. Bei wtGFP steigt die relative Fluoreszenz bei pH-Werten größer als 10 stark an und erreicht bei einem pH 12 ein Maximum. Insgesamt liegt die absolute Fluoreszenzintensität von GFP_{mut1} und wtGFP am niedrigsten, was jedoch evtl. auch auf unterschiedlich eingesetzte Proteinmengen zurückzuführen ist.

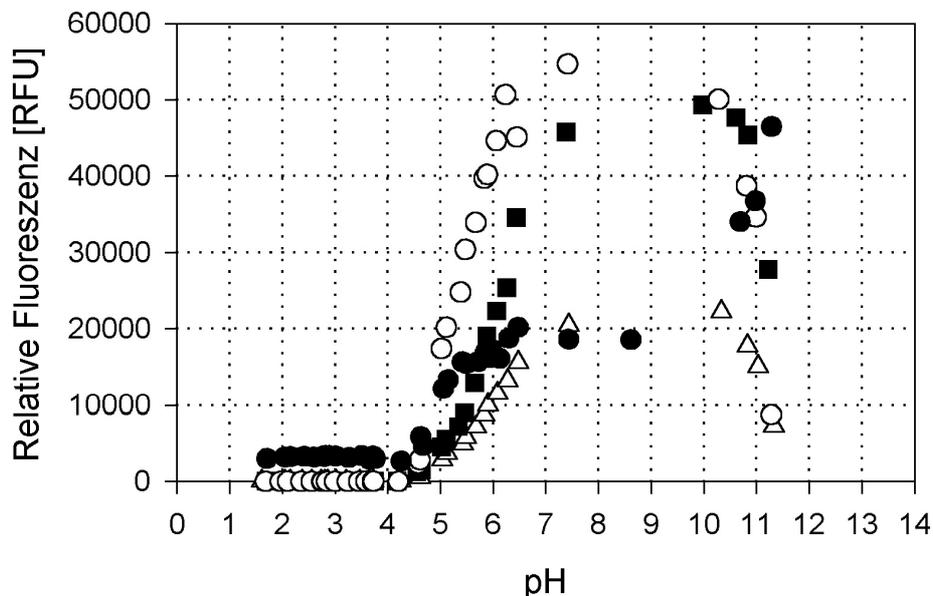


Abbildung 3.31: Relative Fluoreszenz von reinem AFP (rsGFP) (○), EGFP (GFP_{mut1}) (△), GFP_{mut2} (■) und wtGFP (●)

3.3.3 Verhalten von Rohextrakten und gereinigtem GFP in Abhängigkeit von Temperatur und Druck

Für die Expression bei Atmosphärendruck (0,1 MPa) wurde wtGFP und verschiedene Mutanten (rsGFP, EGFP, GFP_{mut2}) in den Wirtstamm *Escherichia coli* JM109 kloniert. Die gemessene Fluoreszenz war unterschiedlich und die Intensitätsreihenfolge war absteigend wie folgt: rsGFP > GFP_{mut2} > EGFP > wtGFP, was wahrscheinlich auf unterschiedlich starke Expression zurückzuführen ist. Dies resultiert aus unterschiedlichen Vektoren (vgl. 2.1) und verschiedene Promotoren (lac: wtGFP, EGFP, GFP_{mut2}; T7: rsGFP).

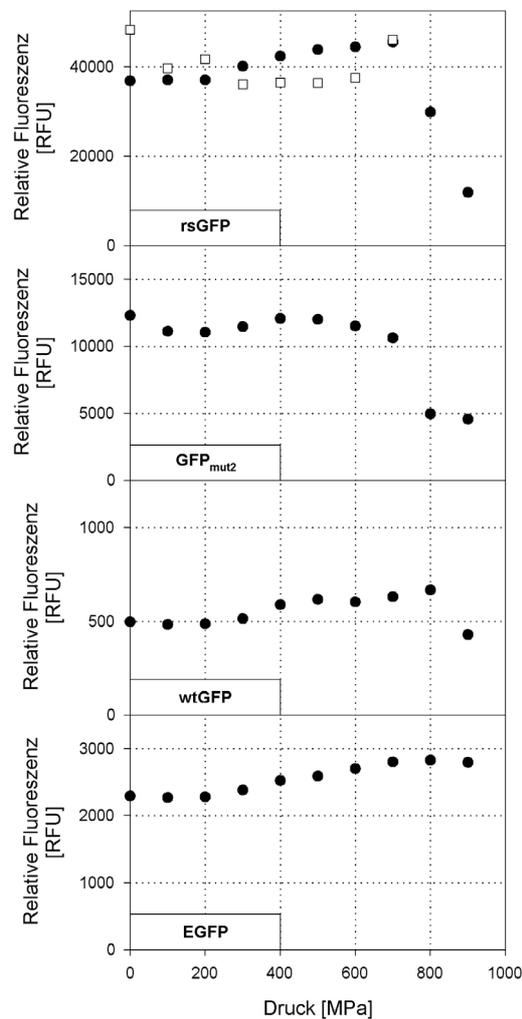


Abbildung 3.32: Hochdruckeffekte auf die Fluoreszenz von Rohextrakten mit wtGFP und drei verschiedenen Mutanten als Funktion des Drucks (●). Zusätzlich ist die Fluoreszenz von rsGFP in intakten *Escherichia coli* Zellen aufgezeigt (□). Die Proben wurden für 5 min. bei 25 °C mit Hochdruck behandelt.

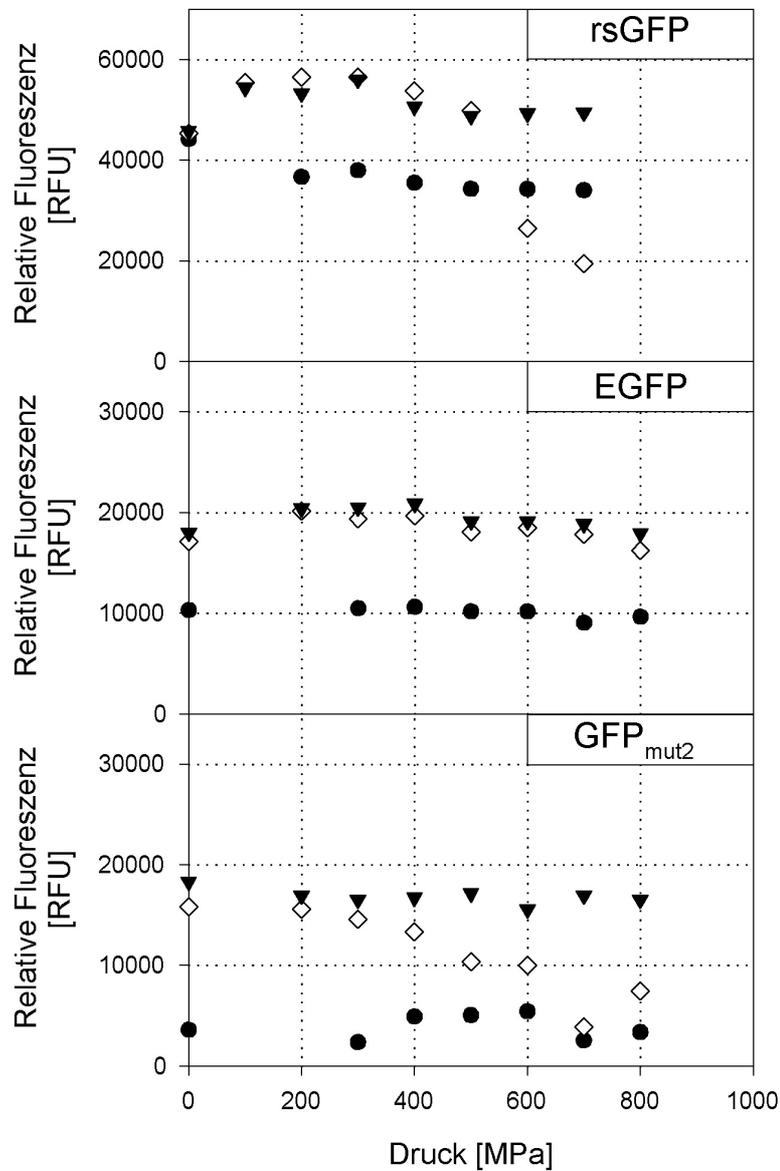


Abbildung 3.33: Einfluß des pH-Werts auf die Fluoreszenz verschiedener gereinigter GFPs. Die Proben wurden mit 20 mmol l⁻¹ Citratpuffer pH 3,7 (●), Succinatpuffer pH 5,6 (□) oder Tris*HCl-Puffer pH 8,0 (▼) verdünnt und für 5 min. bei 25 °C mit Hochdruck behandelt.

Rohextrakte mit GFP wurden für 5 min. verschiedenen Drücken von 100 MPa bis 900 MPa bei einer Druckaufbau- und Abbaurate von 200 MPa/ min. ausgesetzt. Wie Abbildung 3.32 zeigt, ist mit Ausnahme von EGFP bei allen untersuchten GFPs ein mehr oder minder stark ausgeprägter Abfall der Fluoreszenz meßbar, beginnend bei einem Druck von 600 MPa. Der stärkste Abfall der Fluoreszenz ist bei der Mutante rsGFP zu verfolgen, deren Fluoreszenz bei

900 MPa auf ein Zehntel der Ausgangsfluoreszenz abnimmt. Weiterhin ist ein leichter Anstieg der Fluoreszenz im Bereich 100 bis 600 MPa zu verzeichnen. Die Fluoreszenz von rsGFP in intakten Zellen zeigt einen leichten Abfall bis 500 MPa und eine Zunahme bei 700 MPa.

Zur Untersuchung des pH-Einflusses auf die Hochdruckstabilität wurden die GFP-Mutanten bis zur Homogenität gereinigt. Unabhängig von der verwendeten Druckintensität war bei einem sauren pH-Wert von 3,7 die Fluoreszenz stets niedriger als bei physiologischen oder alkalischen Bedingungen (Abbildung 3.33). Während die Druckbehandlung bei pH 3,7 und 8,0 keine signifikante Veränderung zeigte, war bei pH 5,6 bei GFP_{mut2} und rsGFP ein starker Abfall der Fluoreszenz zu beobachten, der bei 400 MPa einsetzte. Bei EGFP war die Abnahme der Fluoreszenz weniger stark ausgeprägt.

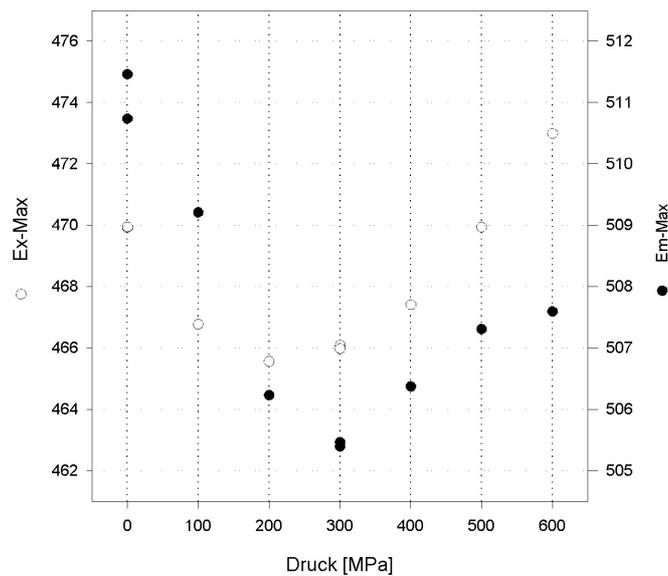


Abbildung 3.34: Änderung des Extinktions- und Emissionsmaximums von AFP unter Hochdruck bei pH 5,8 und einer Temperatur von 25 °C

Zur Untersuchung des Einflusses von Hochdruck auf das Extinktions- und Emissionsmaximum von GFP wurde gereinigtes rsGFP in 20 mM Tris*HCl gelöst, und das Extinktions- und Emissionsspektrum in Abhängigkeit des Drucks aufgenommen. Das Maximum bei der jeweiligen Druckstufe wurde mittels Anpassung einer Gaußschen Kurve bestimmt. Das Emissionsmaximum wird bis zu einem Druck von 200 MPa von etwa 470 nm auf 466 nm verschoben. Bei höheren Drücken wandert das Emissionsmaximum wieder zurück auf seinen Ausgangswert und sogar weiter zu längeren Wellenlängen. Das

Emissionsmaximum wird bis zu einem Druck von 300 MPa von 510 auf 505 nm verschoben. Bei höheren Drücken geht das Emissionsmaximum wieder zu längeren Wellenlängen zurück. Dieser Vorgang ist reversibel und läßt sich mehrere Male wiederholen.

3.3.4 FTIR-spektroskopische Untersuchungen von GFP

Um den Grund für die Veränderung der Fluoreszenz durch Hochdruck zu bestimmen, wurde der Einfluß von Druck auf die Sekundärstruktur mittels Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden von wtGFP und den drei verschiedenen Mutanten rsGFP, GFP_{mut1} und GFP_{mut2} zunächst die Infrarotspektren der AmidI Bande (1600-1700 cm⁻¹) in Betracht gezogen. Abbildung 3.35 zeigt die AmidI Region von wtGFP und den Mutanten AFP, GFP_{mut1}, GFP_{mut2} im nativen Zustand. Es können fünf verschiedene Banden bei ungefähr 1624, 1638, 1651, 1666 und 1685 cm⁻¹ beobachtet werden.

Die untersuchten Mutanten von GFP zeichnen sich allesamt durch die Anwesenheit der selben fünf Banden aus, obgleich es nicht signifikante Unterschiede (<5 cm⁻¹) bei der Lage des Maximums gibt. Dennoch gibt es zwischen den einzelnen GFPs leichte Unterschiede in der Intensität der Anteile der Banden. Im Fall von wtGFP und GFP_{mut2} sind im Vergleich zu AFP und GFP_{mut2} die Banden bei 1638 und 1651 cm⁻¹ wesentlich ausgeprägter (vgl. Abbildung 3.35). Dies deutet darauf hin, daß die eingefügten Mutationen geringe Konformationsänderungen der Proteine bewirken. Die FTIR-Spektroskopie ist jedoch nicht sensitiv genug, um diese räumliche Informationen zu bestimmen.

Abbildung 3.36 zeigt die temperaturinduzierten Änderungen der AmidI Region von AFP. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Intensität der Bande bei 1625 cm⁻¹ zu und bei 1638 cm⁻¹ ab. Die Bande bei 1651 cm⁻¹ nimmt hingegen zu. Die Bande bei 1651 cm⁻¹ wird α -Helixstrukturen im nativen Zustand zugeordnet, während die Bande die von ungeordneten Strukturen herrührt, sich normalerweise bei einer Wellenzahl von 1645 cm⁻¹ befindet [JACKSON und MANTSCH, 1995; BYLER und SUSI, 1986; PANICK *et al.*, 1998]. Bedingt durch den geringen Abstand dieser beiden Banden ist es nicht oder nur schwer möglich zwischen ihnen zu unterscheiden [SUREWICZ *et al.*, 1993]. Die Zunahme der Bande bei 1651 cm⁻¹ mit steigender Temperatur wird jedoch einer Zunahme des Anteils ungeordneter Strukturen zugeordnet.

Parallel zu diesen Änderungen lassen sich zwei neue Banden bei 1618 cm⁻¹ und bei 1683 cm⁻¹ beobachten, die charakteristisch sind für intermolekulare antiparallele β -Faltblattstruktur-

aggregation [DONG *et al.*, 2000; DAMASCHUN *et al.*, 2000]. wtGFP (vgl. Abbildung 3.36 B) und GFP_{mut1} zeigen ähnliche Veränderungen, obgleich eine signifikante Veränderung der Bandenintensität bei 1651 cm⁻¹ nicht beobachtet werden kann.

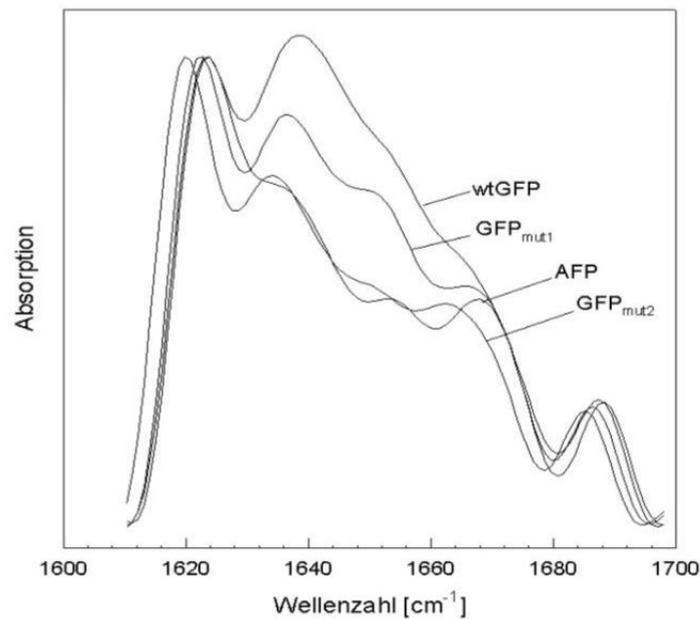


Abbildung 3.35: Die „Fourier-selbstentfaltete“ AmidI Bande von wtGFP und Mutanten bei 25 °C und 0,1 MPa

Der Graph der Intensität bei 1636 cm⁻¹ für AFP und GFP_{mut1} oder, am Beispiel von GFP_{mut2} bei 1652 cm⁻¹ in Abhängigkeit von der Temperatur zeigt einen zweistufigen Übergang (Abbildung 3.37). Die jeweiligen Übergangsmittelpunkte $T_{1/2}$ für GFP_{mut1}, GFP_{mut2} und AFP befinden sich bei 79,5, 77,5 und 82,7 °C.

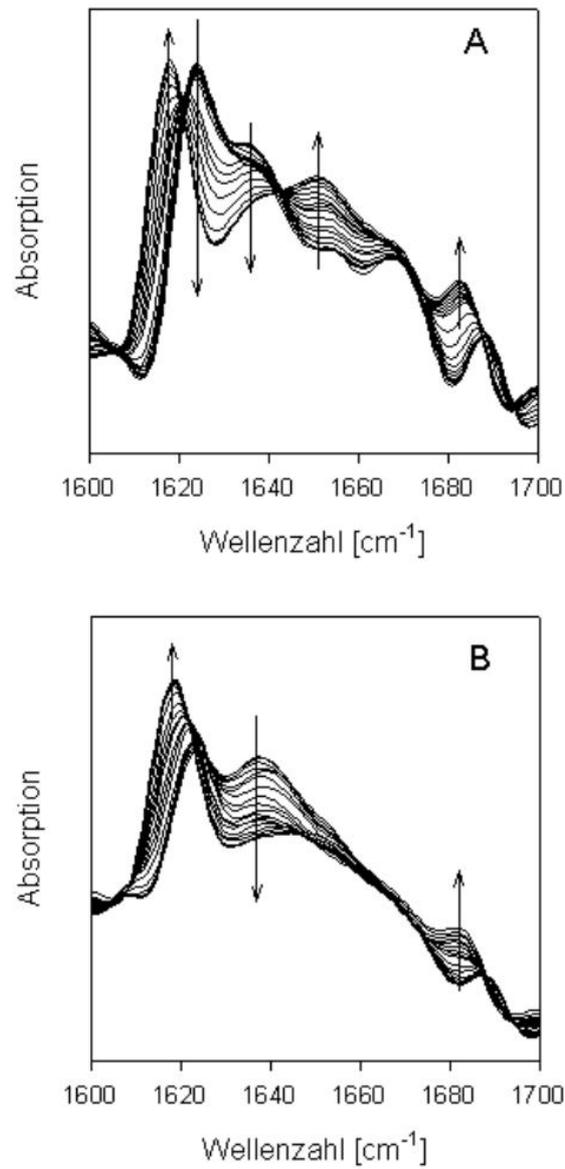


Abbildung 3.36: Temperaturinduzierte Veränderungen der AmidI Region (1600-1700 cm⁻¹). Die Pfeile zeigen für AFP(A) und wtGFP (B) die Änderung mit zunehmender Temperatur (25→95 °C)

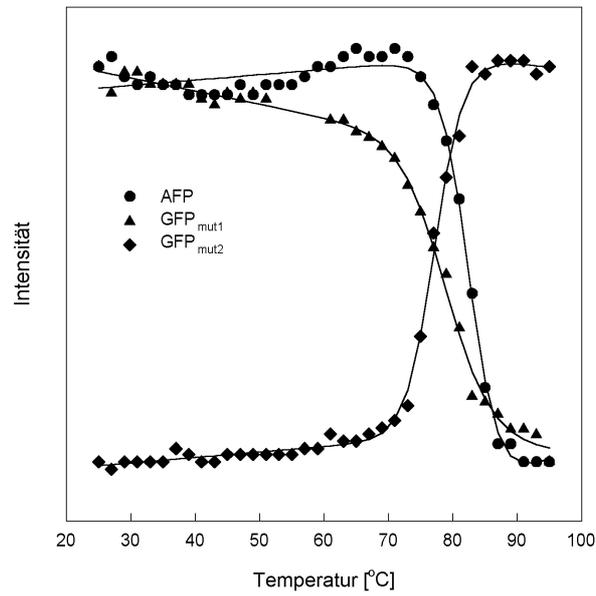


Abbildung 3.37: Die Intensität bei 1636 cm^{-1} (β -Faltblatt-Struktur) für AFP (●) und GFP_{mut1} (▲) und bei 1652 cm^{-1} (α -Helix-Struktur) für GFP_{mut2} in Abhängigkeit von der Temperatur

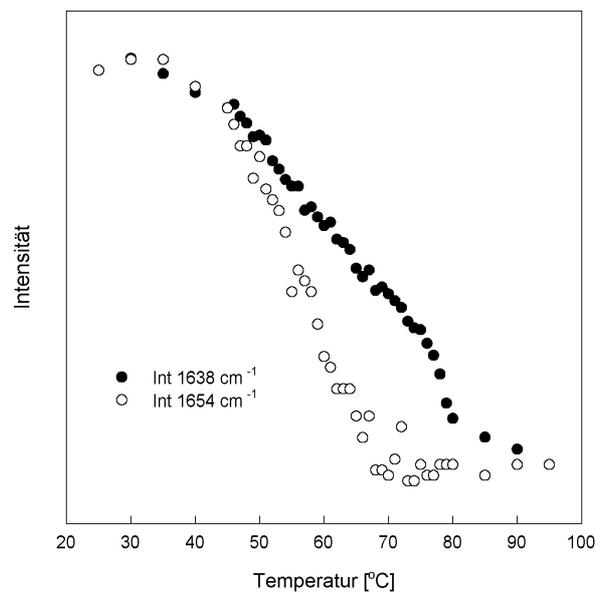


Abbildung 3.38: Die Intensität für wtGFP bei 1638 cm^{-1} (β -Faltblatt-Struktur) (●) und bei 1654 cm^{-1} (α -Helix-Struktur) (○) in Abhängigkeit von der Temperatur

Für wtGFP kann anhand der Bandenintensitätsänderung bei 1638 cm^{-1} einen dreistufigen Auffaltungsmechanismus mit Mittelpunkten bei 54 und 78 °C beobachtet werden (Abbildung 3.38). Die Auftragung der α -Helixbande bei 1654 cm^{-1} (Abbildung 3.38) zeigt, daß die Abnahme der Intensität bei ungefähr 70 °C abgeschlossen ist. Dies legt nahe, daß in dem Temperaturbereich zwischen 45 und 65 °C eine Strukturänderung eintritt, die in der Bildung eines Zwischenprodukts bei ca. 70 °C resultiert. Das durch Sekundärstrukturänderungen, die im Bereich zwischen 45 °C und 65 °C einsetzen, hervorgerufene Intermediat zeichnet sich durch einen reduzierten β -Faltblattstrukturanteil und den Verlust der α -Helices aus. Oberhalb von 70 °C denaturiert das Protein vollständig und resultiert in einer Aggregation.

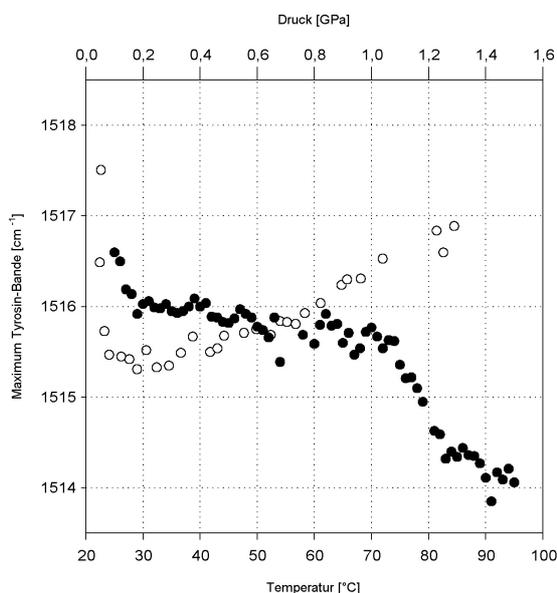


Abbildung 3.39: Änderung der Position von Tyrosin von GFP_{mut1} in Abhängigkeit von der Temperatur (●) und dem Druck (○). $T_{1/2}$ ist identisch zu der in Abbildung 3.37 bestimmten $T_{1/2}$. Die Verschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen mit zunehmender Temperatur ist ein Indikator für eine einsetzende Aggregation

Anhand der Tyrosinbande bei 1516 cm^{-1} können weitere Informationen über die temperaturinduzierten Veränderungen von Proteinen erhalten werden [RAHMELOW *et al.*, 1998]. Wenn ein Protein sich entfaltet und seine Tyrosinreste dem Lösungsmittel ausgesetzt werden, wird ihre Absorption zu höheren Wellenzahlen verschoben [FABIAN *et al.*, 1998].

GFP besitzt acht Tyrosinreste die gleichmäßig über die β -Faltblattstrukturen verteilt sind. Abbildung 3.39 zeigt die Änderung der Tyrosinposition von GFP_{mut1} in Abhängigkeit von der Temperatur. Die $T_{1/2}$ (76 °C) entspricht der $T_{1/2}$ aus Abbildung 3.37. Die Verschiebung zu längeren Wellenzahlen zeigt an, daß sich die Umgebung der Tyrosinreste ändert, die auch auf eine Aggregation hindeutet. Ein ähnliches Bild ist auch für die anderen GFP-Mutanten zu beobachten. In allen Fällen ist die Denaturierung irreversibel und auf die Aggregation zurückzuführen, die in der Bildung eines makroskopisch sichtbaren Gels am Ende des Temperaturverlaufs resultiert.

Abbildung 3.40A zeigt den Druckeffekt auf das Spektrum von wtGFP. Es kann nur eine geringe Verschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen, zurückzuführen auf die Kompression der Wasserstoffbrückenbindungen [SANDROFF *et al.*, 1984] und dem Wasserstoff-Deuterium-Austausch, und eine Verbreiterung der Banden beobachtet werden. Die einzelnen bei einem Druck von 0,1 MPa beobachtbaren Banden sind ohne eine Änderung der Intensität auch bei einem Druck von 1,3 GPa noch zu beobachten. Dies zeigt an, daß die Sekundärstruktur von wtGFP nicht durch einen Druck von bis zu 1,3 GPa zu beeinflussen ist. Ein äquivalentes Bild ist auch für GFP_{mut1} und GFP_{mut2} bis zu einem Druck von 1,4 GPa zu beobachten.

Wie Abbildung 3.39 zeigt, verschiebt sich die Bande der Tyrosinseitenkette linear zu höheren Wellenzahlen ($dv/dp = 1,2 \text{ v/MPa}$). Dies kann durch den Effekt der Kompression auf die Schwingung des Tyrosinrings erklärt werden [ZAKIN und HERBACH, 1986]. Das Fehlen jeglicher Strukturänderungen, die mit der Verschiebung der Tyrosinbande einhergeht, ist ein weiteres Indiz für die strukturelle Integrität von GFP bei hohen Drücken.

Bei der Mutante AFP hingegen beginnt bereits bei einem Druck von 1,0 GPa der Auffaltungsprozeß, der ein Plateau bei 1,3 GPa erreicht (Abbildung 3.40A). Das Auffalten resultiert in der Bildung einer breiten Bande mit einem Maximum bei 1641 cm^{-1} , die charakteristisch ist für ungeordnete Strukturen [BYLER und SUSI, 1986]. Dies wird in Abbildung 3.40B gezeigt.

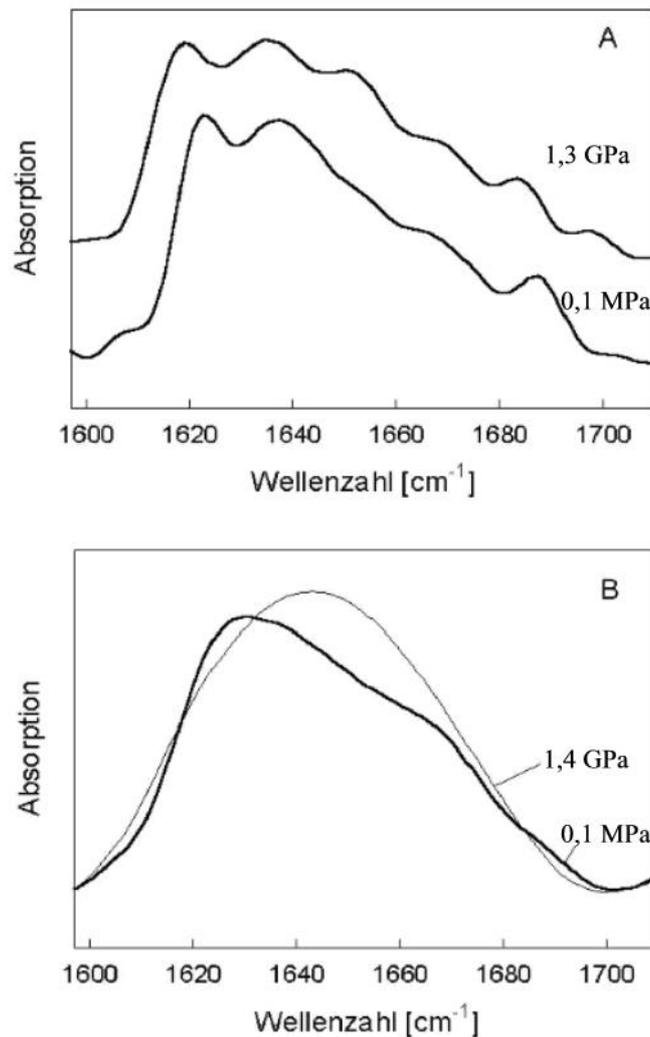


Abbildung 3.40: (A) Das Fourier-self-deconvolution-Spektrum der AmidI Region (1600-1700 cm⁻¹) von wtGFP bei 0,1 MPa und 1,3 GPa. Es kann nur eine Verschiebung der geordneten Strukturen beobachtet werden. (B) Druckinduzierte Änderung von AFP (nicht-deconvoluted Spektrum bei 0,1 MPa und 1,4 GPa). Die breite Bande mit einem Maximum bei ca. 1641 cm⁻¹ ist typisch für den aufgefalteten Zustand

Der Einfluß des pH-Werts auf die Druckstabilität von AFP wird in Abbildung 3.41A anhand der Position des Maximums der AmidI Bande beschrieben. Die Stabilität des Proteins nimmt mit Abnahme des pH-Werts signifikant ab. Wider Erwarten ist AFP bei pH 5,6 weniger stabil als bei pH 3,5. Bei pH 5,6 ist der Übergang breiter und beginnt ungefähr bei 700 MPa. Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, ist dies vermutlich auf die Aggregation des Proteins

zurückzuführen, die bei diesem Druck einsetzt. Diese Aggregation kann nicht durch typische Infrarotbanden der temperaturinduzierten Aggregation charakterisiert werden. In allen Fällen läßt sich eine breite Bande beobachten, die wie oben beschrieben typisch ist für den aufgefalteten Status (Abbildung 3.40B). Dies legt die Vermutung nahe, daß die Art der Aggregation sich von der temperaturinduzierten unterscheidet.

Abbildung 3.41B zeigt die Position des Maximums der AmidI Bande in Abhängigkeit vom Druck bei 25, 35 und 45 °C bei pH 5,6. Die Stabilität von AFP ist bei einer Temperatur von 35 und 40 °C höher als bei 25 °C, wohingegen die Druckstabilität bei diesen Temperaturen und einem pH 8,0 nicht beeinflußt wird.

Der Effekt von Hochdruck auf das Protein AFP in einer Pufferlösung von pH 5,6 wurde durch Quantifizierung des Verlusts an nativen AFP nach einer fünfminütigen Druckbehandlung bei 800 MPa mittels Gelfiltration bestimmt. Hierbei konnte durch Peakquantifizierung ein Verlust von 50% ermittelt werden.

Durch Beobachtung des Probenmaterials in der Diamantamboßzelle unter einem Lichtmikroskop konnte eine Zunahme der Trübung beobachtet werden, die bei ca. 700 MPa einsetzt (Abbildung 3.42). Die Trübung kann jedoch nicht in den IR-Spektren beobachtet werden, da im Bereich der AmidI Bande keine IR-Bande vorhanden ist, die typisch ist für die antiparallele β -Faltblattstrukturaggregation. Dies zeigt an, daß die pH-induzierte Aggregation sich von der temperaturinduzierten unterscheidet. Nach der langsamen Entspannung auf Atmosphärendruck war die Trübung noch immer vorhanden, was vermuten läßt, daß die Aggregation irreversibel ist. Bei einem pH von 3,5 waren Aggregate vom Beginn an zu beobachten. Im Gegensatz hierzu war in einem Tris-Puffer von pH 8,0 unabhängig vom Druck keine Änderung in der Trübung zu beobachten.

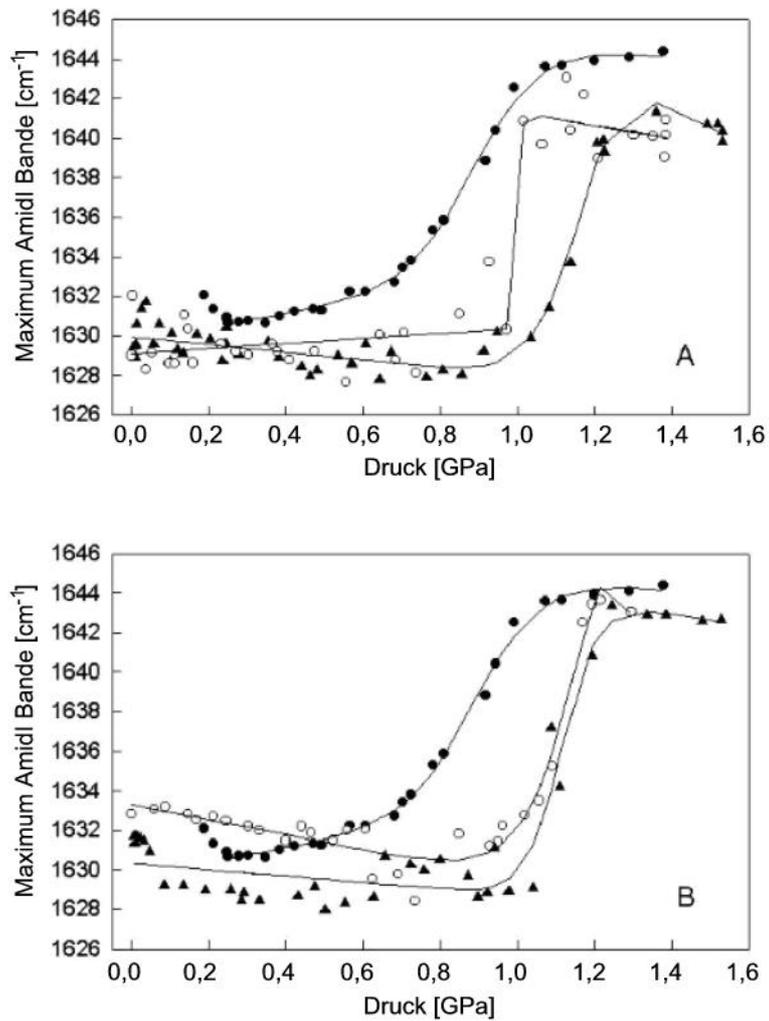


Abbildung 3.41: Die Position des Maximums der Amid I Bande in Abhängigkeit vom Druck zeigt (A) die Druckstabilität von AFP bei 25 °C und pH 3,5 (○), 5,6 (●) und 8,0 (▲), (B) den Einfluß der Temperatur auf die Druckstabilität von AFP bei pH 5,8 und 25 °C (●), 35 °C (○), 40 °C (▲). Die eingezeichneten Linien dienen nur als Orientierungshilfe

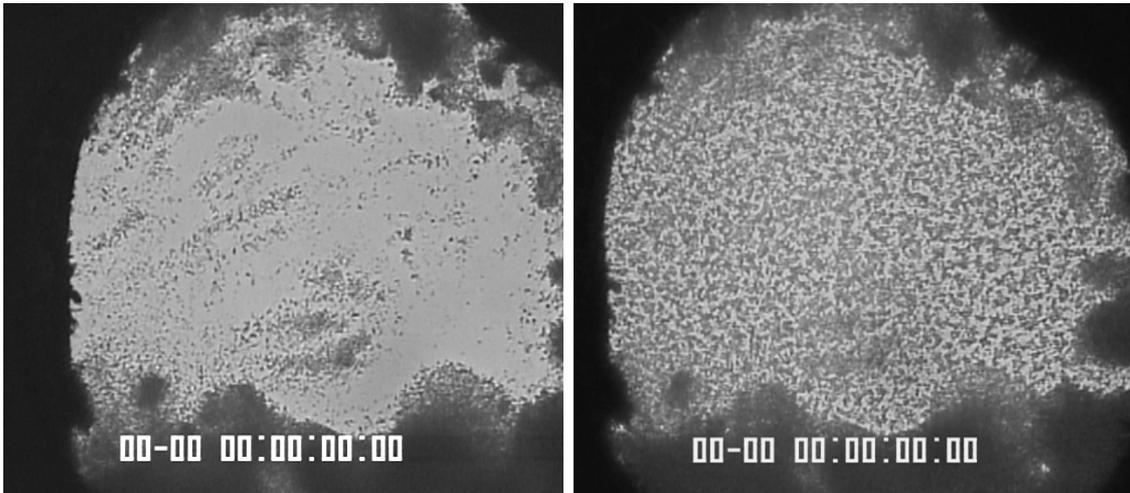


Abbildung 3.42: Lichtmikroskopische Aufnahmen von AFP in Acetatpuffer (pH = 5,6) in einer Diamantamboßzelle bei 0,1 MPa (links) und bei 900 MPa (rechts). Bei 900 MPa hat die Aggregation deutlich eingesetzt.

3.3.5 Expression von GFP unter subletalen Hochdruck

3.3.5.1 Expression von GFP in *Escherichia coli*

Zur Untersuchung der Expression von GFP unter Hochdruck wurde zunächst das Plasmid pQBI63 verwendet, in dem das für das rsGFP codierende Gen abwärts von einem T7 - Promotor sitzt. Das Plasmid wurde in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert, in dem die T7-RNS-Polymerase unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren lacU5 Promotors synthetisiert wird. In nicht induzierten Zellen nahm die Fluoreszenz unter einem Druck von 70 MPa im Vergleich zu Atmosphärendruck innerhalb von zwei Stunden um den Faktor drei bis vier zu (vgl. Abbildung 3.43). Die Induktion mit IPTG zeigt unter einem Druck von 50 MPa und 70 MPa im Vergleich zu induzierten Zellen unter Normalbedingungen eine starke Zunahme der Fluoreszenz (sieben- bis achtfach).

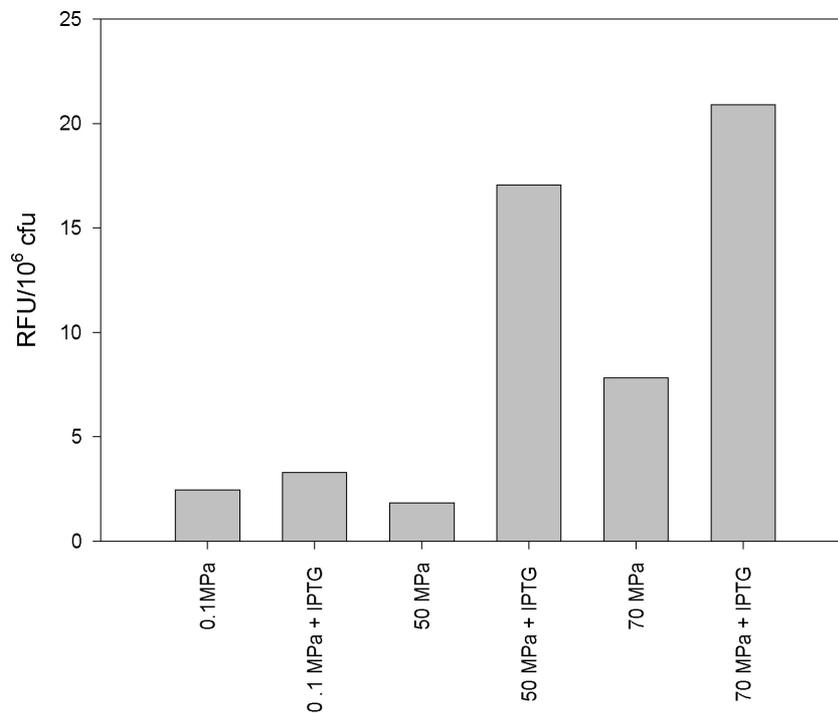


Abbildung 3.43: Expression von rsGFP in *Escherichia coli* bei 0,1 MPa, 50 MPa und 70 MPa. Es wurden mit IPTG induzierte und nichtinduzierte Zellen verwendet. Proben wurden für 2 h bei 30 °C unter Hochdruckbedingungen inkubiert. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Zur weiteren Untersuchung der hochdruckinduzierten Genexpression wurden analog zu der Untersuchung der Streßantwort in ruhenden Zellen [CHA *et al.*, 1999] in dem Plasmid pQBI63 der T7 Promotor durch die Promotoren von *clpB*, *dnaK*, *rpoH* und *groE* ersetzt. Hierfür wurden die in Kapitel 2.25.5 beschriebenen Primer verwendet. Die Promotorbereiche wurden amplifiziert und über die Schnittstellen *NheI* und *SphI* mit dem Reporter gen fusioniert. Abbildung 3.44 gibt eine schematische Darstellung der Konstruktion der rekombinaten Plasmide *pclpB*, *pdnaK*, *prpoH* und *pgroE* und deren Größe wieder.

Zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Konstrukte wurde jeweils eine ÜN-Kultur für 1 h einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurde mittels GFP-spezifischer Antikörper die Bildung von GFP überprüft.

Wie Abbildung 3.45 zeigt, wurde in *Escherichia coli* durch eine Hitzebehandlung von 42 °C für 60 min. die Expression von GFP induziert, wobei sowohl lösliches (A) als auch

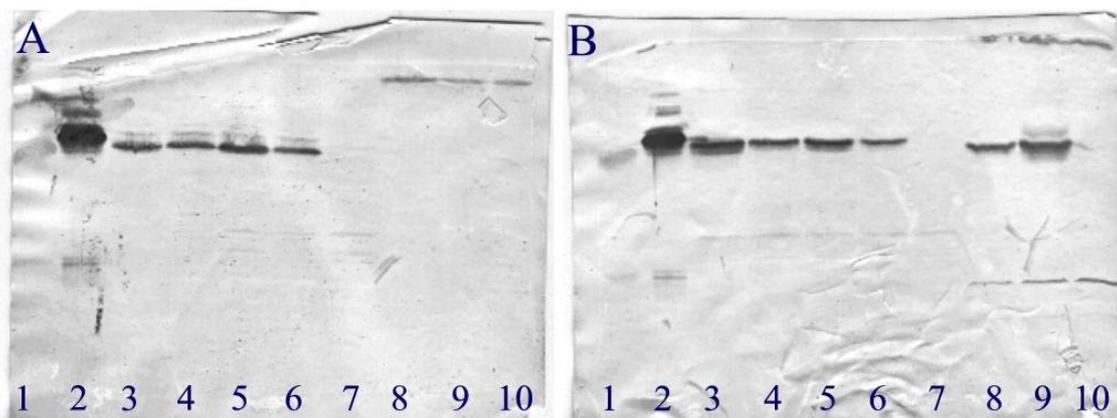


Abbildung 3.45: Nachweis der Expression von GFP in *E. coli* XL1 nach einer Hitzeschockbehandlung von 42 °C für 60 min. (A) TE-lösliche Proteine, (B) Proteine die mit 8 M Harnstofflösung extrahiert wurden. (1) Größenstandard für SDS-PAGE; (2) gereinigtes rsGFP (3)-(6): GFP unter der Kontrolle der Promotoren *clpB*, *groE*, *dnaK*, *rpoH* in *E. coli* XL1; (7) Negativkontrolle *E. coli* XL1; (8) und (9): GFP unter der Kontrolle eines Maltosepermeasepromotors in *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53; (10) Negativkontrolle *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53

3.3.6 Streßinduzierte Expression von GFP unter der Kontrolle der Streßpromotoren von *clpB*, *dnaK* und *groE*

Zunächst wurde versucht die Expression online unter Hochdruck bei 60 MPa bzw. unter Hitzestreßbedingungen bei 43 °C bzw. 50 °C zu messen. Hierbei ergab sich jedoch keine Änderung des Fluoreszenzsignals. Im weiteren wurden deshalb zur Untersuchung der hochdruckinduzierten Genexpression *E. coli* Kulturen, die mit den oben beschriebenen Plasmiden versehen waren analog zur Untersuchung mittels DNS-Microarray (3.2.2) für 15 min. einem Druck von 60 MPa ausgesetzt, und die anschließende Streßantwort bei Atmosphärendruck und 37 °C gemessen. Als Kontrolle dienten ungestreßte Zellen und Zellen, die für 7 min. einem Hitzeschock von 50 °C ausgesetzt wurden.

Wie die Abbildungen 3.35 bis 3.37 zeigen, ist es möglich durch Hitzeeinwirkung die Expression von GFP unter der Kontrolle der Hitzeschockpromotoren *clpB*, *groE* und *dnaK* zu induzieren und die Expression auch ca. 90 min. nach der Hitzebehandlung zu messen. Dies ist

gerade die Zeit, die GFP benötigt, um sich vollständig zu falten und in einem autokatalytischen Prozeß das Chromophor auszubilden [CHA *et al.*, 1999]. Nach einer Hochdruckeinwirkung läßt sich jedoch bei dem Fusionspromotorkonstrukt *groE*-rsGFP keine Induktion erkennen.

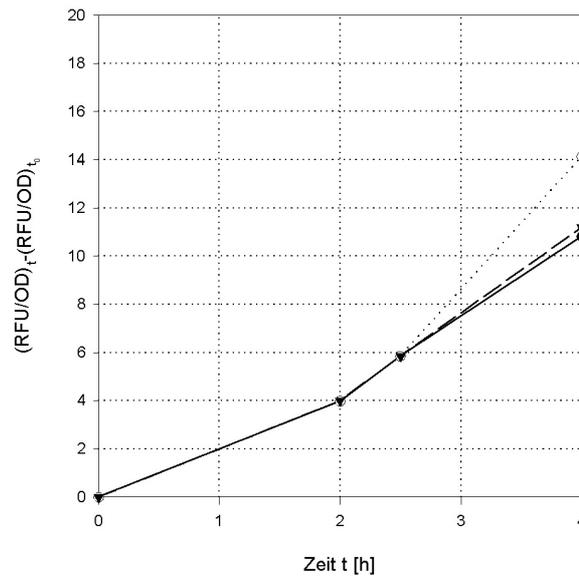


Abbildung 3.46: Induktion der Expression von rsGFP unter der Kontrolle des Promotors *groE* durch Hitze (7min., 50 °C, ○), Hochdruck (15 min., 60 MPa, ▼). Die Kontrolle (●) wurde bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Streß erfolgte zum Zeitpunkt t = 1 h.

Das Konstrukt *clpB*-rsGFP läßt sich hingegen durch Hochdruck induzieren. Das Signal bewegt sich jedoch nur wenig oberhalb des Signals der unbehandelten Probe, weshalb eine eindeutige Aussage über die Induzierbarkeit anhand der gemessenen Fluoreszenz pro optischer Dichte nicht möglich ist. Zieht man die Ergebnisse der Untersuchung mittels DNS-Microarray heran, so wäre eine stärkere Induktion des Fluoreszenzsignals zu erwarten gewesen, i.B. da *clpB* bei diesen Untersuchungen von den betrachteten Genen am stärksten induziert wurde.

Lediglich das Konstrukt *dnaK*-rsGFP zeigt eine geringe Aktivierung dieses Promotors durch Hochdruck an (Abbildung 3.48). Stets sind die Signale der Konstrukte unter optimalen Bedingungen und bei hochdruckinduzierter Expression niedriger als die der hitzebehandelten Proben. Der Unterschied beträgt hierbei bis zu 30%.

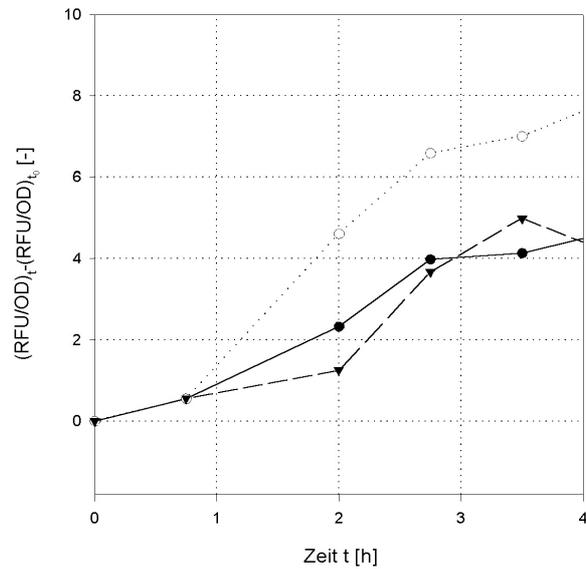


Abbildung 3.47: Induktion der Expression von rsGFP unter der Kontrolle des Promotors *clpB* durch Hitze (7min., 50 °C, ○), Hochdruck (15 min., 60 MPa, ▼). Die Kontrolle (●) wurde bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Streß erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$.

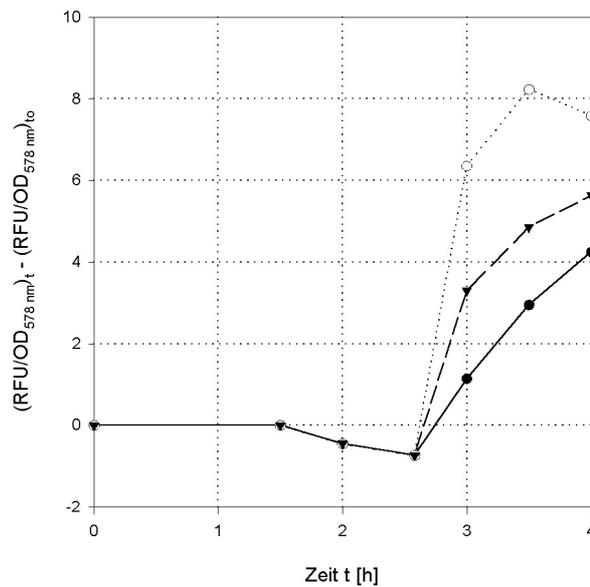


Abbildung 3.48: Induktion der Expression von rsGFP unter der Kontrolle des Promotors *dnaK* durch Hitze (7min., 50 °C, ○), Hochdruck (15 min., 60 MPa, ▼). Die Kontrolle (●) wurde bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Streß erfolgte zum Zeitpunkt $t = 1,5$ h.

4 Diskussion

4.1 Die Hochdruckstreßantwort von *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.53

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erlauben eine Charakterisierung der Hochdruckstreßantwort bei *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.53 sowohl auf physiologischer Ebene, als auch auf Proteomebene. Zunächst wurden die optimalen Bedingungen zur Induktion der Hochdruckstreßantwort und der Referenzstreßarten Säure-, Hitze-, und Osmostreß untersucht. Als Vergleichsorganismus, über den viele Untersuchungen zur Klärung der Streßkompensationsmechanismen durchgeführt wurden diente *Lactococcus lactis* MG1363.

Analog zu den von anderen Arbeitsgruppen erzielten Ergebnissen [DALY, 1983; HOLT, 1989] ist *Lactococcus lactis* MG1363 in der Lage bis zu einer Temperatur von über 40 °C zu wachsen, mit einem Optimum bei ca. 30 °C. Bei dieser Gattung ist es möglich durch eine Temperaturerhöhung von 30 auf 37 bis 42 °C und einer Inkubationsdauer von 10 bis 60 min. [ARNAU *et al.*, 1996; VANASSELDONK *et al.*, 1993; FREES und INGMER, 1999; DUWAT *et al.*, 1995; HARTKE *et al.*, 1997] die Induktion von 12-17 Proteinen und die Repression der meisten anderen Proteine zu initiieren [WHITAKER und BATT, 1991], wobei insbesondere GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, HrcA und ClpP überexprimiert werden. Die bisher untersuchte maximale Temperaturerhöhung auf 42 °C reduziert die Wachstumsrate μ auf ein Zehntel der maximal möglichen, und die Änderung der optischen Dichte auf 0,1 Einheiten oder weniger.

Analog zu bekannten Untersuchungen von GÄNZLE *et al.* (1998), BÖCKER *et al.* (1995) und SPICHER (1982) konnte für *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 ein Temperaturoptimum von ungefähr 30 °C und eine Wachstumsinhibierung bei einer Temperatur von ungefähr 45 °C bestimmt werden.

Die hitzeinduzierte Expression der meisten der oben genannten Hitzestreßproteine wurde bereits auch für grampositive Organismen aus zahlreichen anderen Gattungen beschrieben, wobei sich die Anzahl und die Intensität der induzierten Proteine nach untersuchtem Organismus, Temperaturdifferenz und Inkubationsdauer unterscheiden. Durchschnittlich werden insgesamt mehr als 15 verschiedene Proteine während der Hitzeschockantwort

induziert. Bei *Lb. acidophilus* wurden 24 Proteine, bei *Lb. casei* 15 und bei *Lb. helveticus* 18 Proteine detektiert [BROADBENT *et al.*, 1997; BRAODBENT und LIN, 1999]. Über 5 Proteine wurden bei *Lb. pontis* [STEUDEL, 2001], über 16 bei *Lc. lactis* nach einem Hitzeschock vermehrt oder neu synthetisiert [AUFFRAY *et al.*, 1992]. Hierbei wurde stets die Bedingung gewählt, bei der das Wachstum nicht vollständig inhibiert, sondern die maximale Wachstumsrate auf 50 bis 10% reduziert war.

Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, besitzt *Lc. lactis* zwischen pH 6,0 und 7,0 ein Optimum und zeigt bis zu einem pH-Wert von 4,0 Wachstum [RALLU *et al.*, 1996; HARTKE *et al.*, 1996]. Bei dieser Gattung ist es möglich durch Verschiebung des pH-Werts auf 5,5 bis 4,2 und einer bis zu mehreren Stunden dauernden Inkubation [HARTKE *et al.*, 1996; HARTKE *et al.*, 1997; FREES und INGMER, 1999; SANDERS *et al.*, 1998; ISRAELSEN *et al.*, 1995] die Überexpression von bis zu 33 Proteinen auszulösen. Die Synthese der meisten Proteine wird jedoch bei pH 5,5 und einer Inkubationsdauer von 30 min. reprimiert [HARTKE *et al.*, 1996]. Bei den untersuchten Bedingungen, bei denen die maximale Wachstumsrate μ_{\max} um bis zu 90% reduziert wurde, waren insbesondere die Bildung der Chaperonbestandteile GroEL, DnaK und der Proteinase ClpP zu beobachten.

KLINE und SUGHIHARA (1971), sowie GÄNZLE *et al.* (1998) konnten für *Lb. sanfranciscensis* analog zu den vorliegenden Ergebnissen ein pH-Optimum von ca. 5,5 und eine Inhibierung des Wachstums ab einem pH-Wert kleiner 3,8 beobachten. Die Inkubation von *Lb. sanfranciscensis* CB1 für 60 min. in MRS-Medium, dessen pH-Wert mit Milchsäure auf einen Wert von 5,0 eingestellt wurde, initiierte die Überexpression von 8 bis 11 Proteinen. Die Induktion der klassischen Hitzestressproteine DnaK, DnaJ und GroES konnte nicht gezeigt werden. Das Hitzeschockprotein GrpE zeigt hingegen eine um den Faktor 3,5 bis 4,0 erhöhte Synthesequote [DEANGELIS *et al.*, 2001].

Lactococcus lactis zeigt bei einem Kochsalzgehalt von 0-0,5% ein Wachstumsoptimum. Bei einem Salzgehalt von 3,8% ist das Wachstum weitestgehend inhibiert. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von KILSTRUP *et al.*, (1997) und SANDERS *et al.*, (1998). Wird die Wachstumsrate durch Erhöhung des Salzgehaltes auf 50 bis 10% der maximalen Wachstumsrate reduziert, so werden bei dieser Gattung bis zu 33 Proteine induziert, die Mehrzahl jedoch reprimiert. Bei einem Kochsalzgehalt von 2,5% werden bei einer

Inkubationsdauer von 10 bis 40 min. 27 Proteine induziert, von denen in zeitlicher Abfolge unter anderem die Hitzeschockproteine DnaK (10 min. Inkubation) sowie GroEL und GroES (15 min. Inkubation) überexprimiert wurden [KILSTRUP *et al.*, 1997].

Für *Lb. sanfranciscensis* konnte von GÄNZLE *et al.* (1998) in guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen ein Salzoptimum von 0,5 und 1,0% gezeigt werden. Während bei dieser Untersuchung *Lb. sanfranciscensis* in der Lage ist bis zu einem Kochsalzgehalt von 4% zu wachsen, ist in der vorliegenden Untersuchung bereits bei einem Salzgehalt von 2% kein Wachstum mehr zu beobachten. Grund hierfür ist die unterschiedlich eingesetzte Menge an Maltose, Fructose, Natriumacetat und Diammoniumcitrat. Diese Substanzen beeinflussen zum einen die Ionenstärke, zum anderen die Wasseraktivität a_w des Mediums. Der a_w -Wert wird definiert als das Verhältnis des Wasserdampfdrucks über dem Medium (p) zum Wasserdampfdruck des reinen Wassers (p_0) bei gleicher Temperatur. Jeder Zusatz einer wasserbindenden Substanz bewirkt, daß $p < p_0$ und damit die Wasseraktivität kleiner 1 wird [KRÄMER, 1992]. Da bei der vorliegenden Untersuchung bis zur vierfachen Menge an Maltose und Fructose eingesetzt wurde, reduziert sich der a_w -Wert des Ausgangsmediums signifikant, und es ist zur Inhibierung des Wachstums eine wesentlich geringere Kochsalzkonzentration von 2,0% (w/v) notwendig.

Während die Wirkung von hohen Temperaturen, niedriger pH-Werte und hoher osmotischer Drücke auf das Wachstum und die Proteinbiosynthese von Bakterien recht gut untersucht ist, ist über den Einfluß von hydrostatischem Hochdruck nur sehr wenig bekannt. Die wenigen vorliegenden Ergebnisse zur hochdruckinduzierten Genexpression decken sich jedoch mit bekannten Untersuchungen zur hochdruckinduzierten Abtötung von Mikroorganismen. So ist bekannt, daß die Lebensfähigkeit von Bakterien bereits bei Drücken von 100 MPa in gramnegativen und oberhalb von 250 bis 350 MPa in grampositiven Bakterien abnimmt [CASAL and GOMEZ, 1999; ARROYO *et al.*, 1999]. Dies deckt sich auch mit Untersuchungen von KORAKLI *et al.*, (2002), die für *Lb. sanfranciscensis* bei 100 MPa keine Änderung der Keimzahl zeigt, jedoch einen stark reduzierten Stoffwechselumsatz. Die signifikante Abnahme der Stoffwechsellistung geht einher mit der in den vorliegenden Untersuchungen gezeigten Abnahme des Wachstums, respektive der Änderung der optischen Dichte.

Nach einer subletalen Streßbehandlung reagieren Zellen auf einen letalen Streß gleicher oder anderer Art mit erhöhter Resistenz, die als Kreuzresistenz bezeichnet wird. Während diese

Resistenzzunahme nach einer Vorbehandlung mit subletalen pH-Werten oder nach Hitzevorbehandlung für Milchsäurebakterien bereits recht gut dokumentiert sind [RALLU *et al.*, 1996; HARTKE *et al.*, 1996; PAGÁN *et al.*, 1997; O'SULLIVAN und CONDON, 1997; BOUTIBONNES *et al.*, 1991] ist über Kreuzresistenzen im Zusammenhang mit Hochdruck nur wenig bekannt. Es konnte für *Saccharomyces cerevisiae* analog zu den vorliegenden Ergebnissen eine wachstumsabhängige Barotoleranz beobachtet werden. So sind Zellen, die sich in der stationären Phase befinden um das Acht- bis Zehnfache resistenter als Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Ähnliche Beobachtungen konnten für diese Hefe auch für die Zunahme der Thermotoleranz und der Resistenzzunahme gegenüber Sauerstoffeinfluß beobachtet werden, wobei die Barotoleranz stets signifikant geringer war als die Thermo- und Sauerstofftoleranz [IWAHASHI *et al.*, 1993].

Bei stark zucker- oder salzhaltigen Medien konnte eine Zunahme der Barotoleranz festgestellt werden [OXEN und KNORR, 1993; OGAWA *et al.*, 1990; OGAWA *et al.*, 1992]. Analog hierzu tritt bei *Lb. sanfranciscensis* bereits eine Barotoleranz auf, wenn die Zellen vor der Druckbehandlung kurzzeitig in salzhaltigem Medium inkubiert werden. Dies konnte auch für *Micrococcus roseus*, einem halophilen Bakterium beobachtet werden [TANAKA *et al.*, 2001]. Generell nimmt der Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran ab, wenn Bakterien in Medien mit einem größeren osmotischen Druck inkubiert werden [BROEKMAN und STEENBAKKERS, 1973; MILLER, 1986; ALLAKHVERDIEV *et al.*, 1999; CHATTERJEE *et al.*, 2000]. Demnach ist es möglich, daß die Membran von *Lb. sanfranciscensis* durch die Inkubation in kochsalzhaltigem Medium stabiler wird, da der Anteil an ungesättigten Fettsäuren entscheidend ist für Fluidität der Membran und der damit einhergehenden Hochdrucksensitivität von Bakterien [ALLEN *et al.*, 1999; ALLEN *et al.*, 2000; DELONG und YAYANOS, 1985]. Gleichzeitig führt eine Erhöhung der Salz- und Zuckerkonzentration im Medium zu einer Anreicherung dieser Komponenten in der Zelle. Während jedoch die Zugabe von Zuckern biologische Systeme vor einer Veränderung des physikalischen Status der Membranlipide oder sensitiver Proteine während physikalischer Streßeinwirkung schützt, hat die Anwesenheit monovalenter Kationen keinen Schutzeffekt auf biologische Membranen [GÄNZLE, persönliche Mitteilung].

WOUTERS *et al.* (1998b) konnten für *Lb. plantarum* zeigen, daß Zellen die bei pH 5,0 inkubiert wurden druckresistenter sind als Zellen, die bei pH 7,0 gehalten wurden. Parallel hierzu konnte gezeigt werden, daß die intrazelluläre ATP-Konzentration sowohl durch

Hochdruckbehandlung als auch durch Inkubation in saurem Medium signifikant zunahm. Diese Zunahme beruht darauf, daß durch Hochdruckbehandlung die membrangebundene F_0F_1 *ATPase* nicht mehr in der Lage ist, ATP zu verwerten, das System zur Produktion von ATP jedoch noch intakt ist. Demnach ist die *ATPase* drucksensitiver als die Glykolyse, die erst durch mehrmalige oder intensivere Druckbehandlung beeinflusst werden kann [WOUTERS *et al.*, 1998b]

Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß eine für 30 min. durchgeführte Hitzevorbehandlung mit 43 °C bei anschließender Hochdruckbehandlung mit 150 MPa für 60 min. eine Resistenzzunahme um den Faktor 100 bewirkt [IWAHASHI *et al.*, 1991]. Andererseits ist die Induktion der Barotoleranz im Vergleich zur Induktion der Thermotoleranz und der induzierten Resistenz gegenüber Sauerstoff um den Faktor 10 geringer [Iwahashi *et al.* 1993]. Der Unterschied zu der vorliegenden Sensibilisierung gegenüber Hochdruck von *Lb. sanfranciscensis* nach einer Hitzevorbehandlung kann zum einen in der zu geringen Induktion von Hitzeschockproteinen begründet liegen. Hierfür spricht auch das kaum veränderte Proteinmuster von *Lb. sanfranciscensis* nach einer Hitzebehandlung mit 43 °C (vgl. 3.1.7). Demnach wäre weder die Dauer noch die Intensität ausreichend, um eine generelle und spezifische hitzeinduzierte Antwort zu erzielen. Des weiteren wird analog zur Inkubation in salzhaltigen Medien auch durch erhöhte Temperatur der Gehalt ungesättigter Fettsäuren erniedrigt, wodurch wiederum eine erhöhte Druckresistenz auftreten müßte [RUSSELL *et al.*, 1995]. Andererseits konnten TAMURA *et al.* (1998) im umgekehrten Ansatz nach einer Hochdruckvorbehandlung von 30 min. bei Drücken zwischen 25 und 125 MPa nur eine geringe Zunahme der Thermoresistenz zeigen. Eine Hochdruckvorbehandlung von 50 MPa induziert hingegen eine deutliche Hochdruckresistenz [TAMURA *et al.*, 1998]. Auch unterscheidet sich bei Hochdruck- und Hitzestress die Akkumulation von Trehalose. Während durch Hitzeschock eine Akkumulation von Trehalose bewirkt wird, ist diese Zuckeranreicherung nach einer Hochdruckbehandlung nicht nachweisbar [TAMURA *et al.*, 1998]. Demnach beruht die durch Hitze hervorgerufene Druckresistenz auf einem anderen Mechanismus, als die durch Druck hervorgerufene Hochdruck- und Thermoresistenz.

Wird *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 für 60 min. einem Druck von 80 MPa ausgesetzt, so wird eine unterschiedlich starke Induktion von ca. 30 Proteinen beobachtet (Tabelle 3.1). Von

acht untersuchten Proteinen konnten zwei als die Hitzeschockproteine ClpL und GroEL identifiziert werden. ClpL ist eine ATP-abhängige Protease [HUANG *et al.*, 1993], die zu der Gruppe der Clp-Proteine gehört und große Ähnlichkeit zu der Gruppe der ClpA-Proteine zeigt [INGMER *et al.*, 1999; WOUTERS *et al.*, 1998a]. Bakterien besitzen mehrere Proteine der Clp-Familie, die verschiedene Funktionen besitzen, häufig als Chaperone auftreten und oft im Zusammenhang mit einer Streßadaptation auftreten. Diese auch als Hsp100 bezeichneten Proteine werden in der Regel durch Hitzeschock und Salzstreß überexprimiert [BERNHARDT *et al.*, 1997; INGMER *et al.*, 1999] und besitzen spezifische proteolytische Aktivität. Während die Induktion bei verschiedenen Streßarten für ClpL bislang nicht beobachtet werden konnte, wurden bei *Escherichia coli* sowohl ClpB als auch ClpP durch Hochdruck induziert [WELCH *et al.*, 1993]. Ebenso konnten TAMURA *et al.* (1998) bei *Saccharomyces cerevisiae* die hochdruckinduzierte Überexpression eines Hitzeschockproteins mit der Größe 104 kDa nachweisen. Dieses Protein ist vermutlich homolog zu einem Protein aus der Clp-Familie.

GroEL gehört zu der Gruppe der Hitzeschockproteine und bildet zusammen mit GroES ein Chaperone und wird auf niedrigem Level konstitutiv exprimiert [GETHING und SAMBROOK, 1992; BROADBENT *et al.*, 1998]. Durch Hitze-, Salz-, Säure-, Hungerstreß und UV-Strahlung werden diese Proteine bei grampositiven Bakterien induziert [ARNAU *et al.*, 1996; HARTKE *et al.*, 1997; KILSTRUP *et al.*, 1997; SCHAFFER *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2000]. Untersuchungen an *E. coli* zeigten überdies bereits eine hochdruckinduzierte Überexpression von GroEL [WELCH *et al.*, 1993] und GroES [WELCH *et al.*, 1993; GROSS *et al.*, 1994], wobei die Expression erst zeitverzögert auftrat.

Durch Hochdruck werden bei *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 des weiteren Proteine induziert, die große Homologie zu den Proteinen RbsK, GapDH und AdhE aufweisen. Diese Proteine sind alle in dem Zuckermetabolismus von heterofermentativen Milchsäurebakterien involviert (vgl. Abbildung 4.1). Obwohl *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 nicht in der Lage ist Ribose als Kohlenstoffquelle zu nutzen [STOLZ, 1995], wird ein Enzym durch Hochdruck überexprimiert, dessen Partialsequenz große Ähnlichkeit zu einer Ribokinase hat. Das Molekulargewicht ist jedoch rund doppelt so groß wie das der bereits bekannten Ribokinasen. Dies konnte auch von DREWS *et al.* (2002) für den selben Stamm gezeigt werden. STEUDEL (2001) konnte hingegen für *Lb. sanfranciscensis* TMW1.855 eine Umsetzung der Ribose beobachten. Für *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, daß die Enzyme, die zum Transport und zur Phosphorylierung der Ribose notwendig sind, in der spätexponentiellen Wachstumsphase

induziert werden [WOODSON und DEVINE, 1994]. Der Transporter zeigt hierbei die Charakteristik eines ABC-Transporters und steht unter der Kontrolle eines σ^A -Promotors.

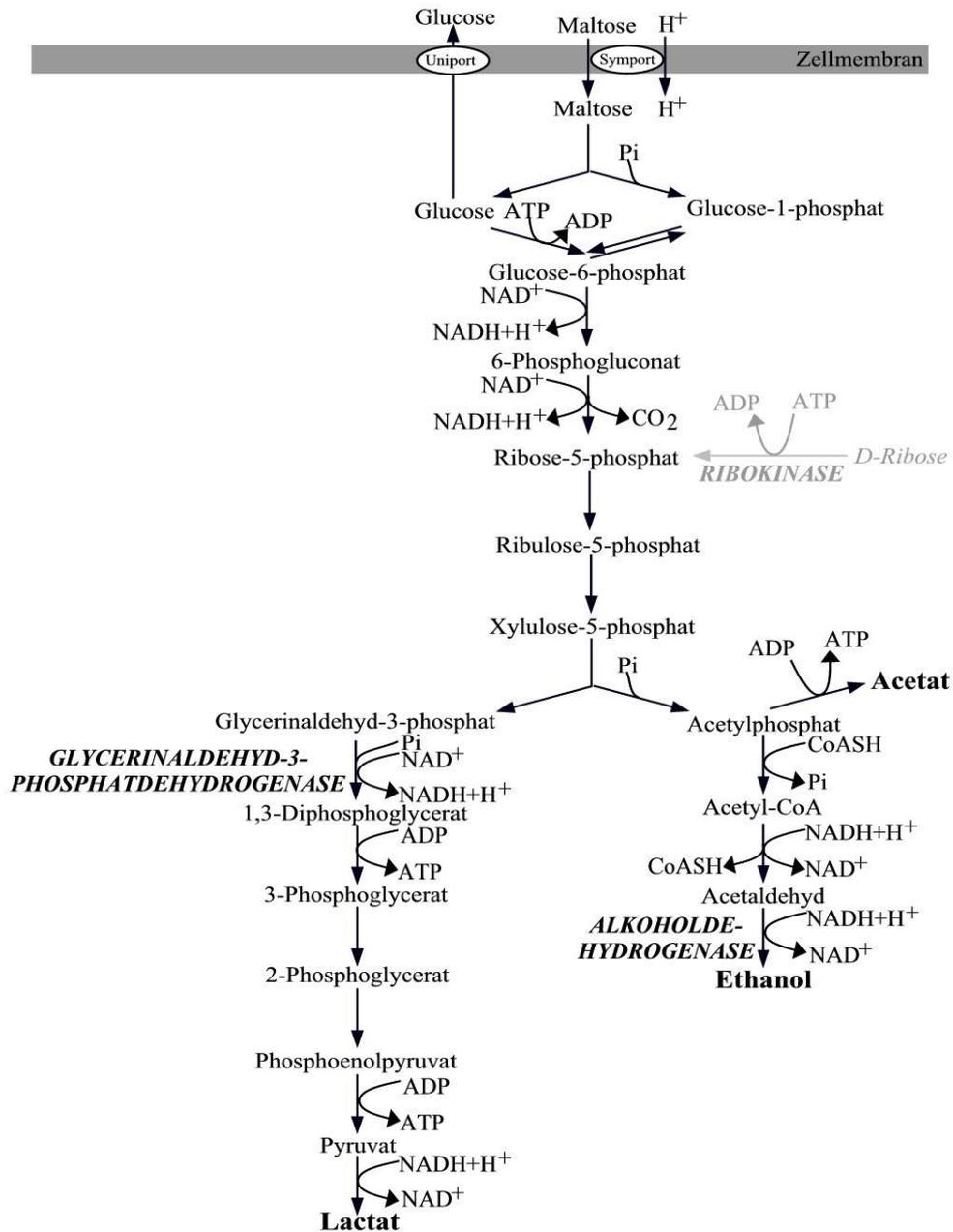


Abbildung 4.1: Überblick über den Maltosemetabolismus von *Lb. sanfranciscensis* [STOLZ *et al.*, 1995; VOGEL *et al.*, 1999, (mod.)]. Produkte sind fett, überexprimierte Proteine in Großbuchstaben und fett, bislang nicht bekannter Weg der Riboseverwertung grau gedruckt.

Lb. sakei dessen Ribokinasesequenz die größte Ähnlichkeit zu den Partialsequenzen von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 aufwies, zeigt hierfür jedoch ein Transportersystem, das Ähnlichkeit zu GltA, dem Glucosetransporter aus *Staphylococcus xylosus* aufweist [STENZ und ZAGOREC, 1999]. Für *Lb. sanfranciscensis* ist der genaue Transportmechanismus jedoch noch nicht bekannt. Weiterhin konnte bislang außer für Hochdruck [DREWS *et al.*, 2002] noch keine streßinduzierte Überexpression der Ribokinase gezeigt werden.

GapDH und AdhE werden in der spätexponentiellen Phase von *Clostridium acetobutylicum* bzw. *E. coli* überexprimiert [SCHAFFER *et al.*, 2002; ARNAU *et al.*, 1998; LEONARDO *et al.*, 1993]. *Bacillus subtilis* hingegen zeigt in dieser Wachstumsphase eine Abnahme der GapDH [SCHMID *et al.*, 1997]. Für *Lactococcus lactis* und *E. coli* konnte eine Regulation der AdhE-Expression durch a) den zur Verfügung stehenden Zuckern, b) die NADH und c) den Sauerstoffbedingungen beobachtet werden [ARNAU *et al.*, 1998; LEONARDO *et al.*, 1993]. Während GapDH bei der Bildung von Lactat aus Maltose eine entscheidende Rolle spielt, ist die Alkoholdehydrogenase eines der Schlüsselenzyme bei der Bildung von Ethanol im Maltosemetabolismus von *Lb. sanfranciscensis*. KORAKLI *et al.* (2002) konnten zeigen, daß gerade die Konzentration der Endprodukte Lactat und Ethanol sich bei einem Druck von 80 MPa und einer Inkubationsdauer von 3 h signifikant reduziert, wohingegen die Konzentration der gebildeten Essigsäure bei diesem Druck trotz reduzierter Stoffwechselaktivität weitestgehend unberührt bleibt. So verändert sich das molare Verhältnis von Lactat zu Acetat bei Normaldruck gegenüber Hochdruck von 1,8 zu 1. Demnach beeinflußt hydrostatischer Hochdruck entweder das chemische Gleichgewicht entscheidender Schlüsselreaktionen der Maltoseverwertung von *Lb. sanfranciscensis*, oder es liegt, analog wie auch bereits für die Bildung der Alkoholdehydrogenase in *E. coli* postuliert [LEONARDO *et al.*, 1993], eine Regulation der Expressionsrate durch das Angebot an reduzierter NADH vor. Hierfür spricht auch, daß von WOUTERS *et al.* (1998b) eine hochdruckinduzierte Konzentrationsverschiebung des ATP-Pools gezeigt werden konnte. In Abhängigkeit der Druckintensität und der Druckdauer tritt bei *Lb. plantarum* zunächst eine Zunahme des intrazellulären ATP-Pools, bei längerer Inkubationsdauer eine Abnahme desselbigen auf.

Hydrostatischer Hochdruck bewirkt bei *Lb. sanfranciscensis* weiterhin die Expressionsinduktion der Seryl-tRNS-Synthetase. Dieses Protein wird auch bei *Clostridium acetobutylicum* in der spätexponentiellen Phase induziert. Es ist dort zusammen mit drei weiteren Genen in folgender Reihenfolge angeordnet: *serC* (Serinaminotransferase), *serA* (3-

Phosphoglyceratdehydrogenase), *serX* (unbekannte Funktion) und *serS* (Seryl-tRNS-Synthetase). Die Gene stehen unter der Kontrolle eines σ^A -abhängigen Promotors. Mittels Northern-Blot konnte gezeigt werden, daß diese Gene zur selben Zeit wie die Alkoholdehydrogenase *adhE* exprimiert werden [SCHAFFER *et al.*, 2002]. Weiterhin konnte für *E. coli* gezeigt werden, daß die Expression der Aminoacyl-tRNS-Synthetase *lysS* durch Hitze, Anaerobiose und Änderungen des externen pH-Werts induziert wird, während das Gen *lysSU*, das für das Isoenzym codiert konstitutiv exprimiert wird [PUTZER *et al.*, 1995]. Weder bei *E. coli* noch bei *Cl. acetobutylicum* konnte ein Hinweis auf die Notwendigkeit der Induktion der Seryl-tRNS-Synthetase in der spätexponentiellen Wachstumsphase postuliert werden. Vielmehr ist die physiologische Bedeutung dieser Beobachtungen unbekannt.

Ein Vergleich der in der vorliegenden Arbeit induzierten Proteine mit denen der Arbeitsgruppe DREWS *et al.* (2002) zeigt, daß deren beobachtete überexprimierte Proteine entweder außerhalb des bei der vorliegenden Arbeit untersuchten pI-Bereichs lagen (drei der dreizehn Proteine), oder die Überexpression erst bei höheren Drücken auftrat (vier der dreizehn Proteine). In beiden Ansätzen wurde eine Überexpression der Ribokinase festgestellt. Lediglich die Repression eines Proteins und die Überexpression zweier Proteine konnte nicht festgestellt werden. Dies kann zum einen auf die unterschiedlichen Druckaufbau- und -abbauzeiten zurückzuführen sein. Zum anderen wurde in dieser Arbeit nach der Streßbehandlung den Zellen vor dem Zellaufschluß eine Regenerations- und Ruhephase zur vollständigen Expression der Streßproteine gewährt. Dies kann auch dazu führen, daß einige der überexprimierten Proteine bereits wieder abgebaut wurden.

Der Vergleich der Reaktion auf unterschiedliche Streßarten zeigt, daß im Gegensatz zu den Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* [IWAHASHI *et al.*, 1993] die hochdruckinduzierte Streßantwort von *Lb. sanfranciscensis* wenig Ähnlichkeit und sogar teilweise Gegensätze zu der durch Hitzestreß induzierten Antwort hat. Vielmehr zeigen stationären Zellen bzw. säure- oder NaCl-gestreßten Zellen Ähnlichkeit zur hochdruckinduzierten Streßantwort. Dies wird durch die Kreuzresistenzuntersuchungen unterstrichen (vgl. Abbildung 3.8). Die Ähnlichkeit dieser Muster kann darauf zurückgeführt werden, daß durch Druck der pH-Wert beeinflusst wird. Bei einem Druck von 500 MPa erniedrigt sich beispielsweise der pH-Wert eines reinen Phosphatpuffers um zwei Einheiten

[NEUMANN *et al.*, 1973]. Für ein komplexes System wie es ein Nährmedium darstellt, kann diese Verschiebung noch wesentlich größer sein. Die genauen Werte für das in dieser Arbeit verwendete Medium sind nicht bekannt. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, daß durch Hochdruck gleichzeitig eine Absenkung des pH-Werts erfolgt, die in Kombination mit dem Druck eine Streßantwort hervorruft.

Weiterhin bewirkt Druck eine Angleichung des inneren pH-Werts pH_{in} an den extrazellulären pH-Wert pH_{ex} [MOLINA-GUTIERREZ *et al.*, 2002]. Da der innere pH-Wert in der Regel höher liegt als der äußere, bewirkt eine Angleichung eine Absenkung des inneren pH-Werts und somit eine mögliche druckinduzierte Säurestreßantwort.

Die Ähnlichkeit zu der Kochsalzinduzierten Streßantwort kann darin begründet liegen, daß die Membran und die darin enthaltenen Transporter nachhaltig durch Druck beeinflusst werden. Hochdruck bewirkt bei *Escherichia coli* die Repression der osmoregulierten Membranproteine OmpF, OmpC und LamB [NAKASHIMA *et al.*, 1995]. OmpF und OmpC bilden unspezifische Porine, welche die Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen über die äußere Bakterienmembran zulassen [BENZ und BAUER, 1988; BUEHLER *et al.*, 1991]. Durch die Repression dieser Porinkanäle wird der Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung beeinflusst. Somit kann eine Verschiebung der osmotischen Zustände entstehen, die eine Streßantwort bewirken können.

Gleichzeit bewirkt Hochdruck eine Verringerung des Volumens bzw. eine Kompression der flüssigen Milieus und daraus resultierend eine Erhöhung der Konzentration der Solute. Diese Anreicherung reicht womöglich aus, um einen Zustand hervorzurufen, der einem osmotischen Streßzustand ähnelt.

4.2 Die Hochdruckstreßantwort von *Escherichia coli* JM109 (DE3)

Wird *E. coli* JM109(DE3) für 15 min. einem Druck von 60 MPa ausgesetzt, so reduziert sich die Lebendkeimzahl um 13%. Bei einem Druck von 80 bzw. 100 MPa nimmt die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten auf 39% bzw. 32% der Ausgangskeimzahl ab. Dies deckt sich mit Untersuchungen von WELCH *et al.* (1993), die bei einem Druck von 53,5 MPa das Stagnieren des Wachstums beobachten konnten. SONOIKE *et al.* (1992) hingegen konnten erst bei höheren Temperaturen bzw. höheren Drücken eine signifikante Abnahme der Lebendkeimzahl beobachten, wobei bei dieser Untersuchung stationäre Zellen verwendet wurden. Bei *Lb. sanfranciscensis* zeigten in den vorliegenden Untersuchungen stationäre

Zellen ebenfalls eine höhere Hochdrucktoleranz als logarithmisch wachsende Zellen. Eine höhere Streßtoleranz stationärer Zellen wurde auch für Säurestreßbehandlungen bei *Lactococcus lactis* beschrieben [ALEMAYEHU *et al.*, 2000].

Eine Druckbehandlung von 15 min. bei 60 MPa bewirkt bei *E. coli* im Vergleich zu unbehandelten Zellen die Induktion von sechs von 27 untersuchten Genen. Unter den induzierten Genen befinden sich zwei klassische Hitzestreßgene (*clpB*, *dnaK*). Dieses Ergebnis spiegelt die Untersuchungen von WELCH *et al.* (1993) wieder, in der nach einer Druckbehandlung von einer Stunde 55 Proteine induziert waren, darunter auch ClpB und DnaK. GROSS *et al.* (1994) konnten hingegen bei einem Druck von 40 MPa nur die Induktion von 4 verschiedenen Proteinen beobachten, darunter das klassische Hitzestreßprotein GroES (Gen: *mopB*). Eine Überexpression von ClpB und DnaK war hierbei jedoch nicht zu beobachten.

Die hochdruckinduzierte Expression von DnaK konnte auch bei Eukaryonten bereits beobachtet werden [TAKAHASHI *et al.*, 1996; KAARNIRANTA *et al.*, 2000; IWAHASI *et al.*, 2002], die Expression der Proteinase *clpB* jedoch nur bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [IWAHASHI *et al.*, 2002; ODANI *et al.*, 2002].

Weiterhin werden die Gene *yccv*, *yhel*, *yrfg* und *ydce* überexprimiert. Während die Funktion der Gene *yccv* und *yhel* noch unbekannt ist, vermutet man, daß es sich bei dem Gen *yrfg* möglicherweise um eine Phosphatase handelt. Bislang wurde eine Induktion dieser Gene lediglich für Hitzeschock beschrieben [DUGGAN *et al.*, 1999]. Die physiologische Notwendigkeit für eine Überexpression ist jedoch bislang noch nicht bekannt.

Das Gen *ydce* wurde als 4-Oxalocronat-Tautomerase identifiziert. Dieses Enzym katalysiert die Ketonierung von Dienolen, die im weiteren Verlauf als Intermediat in den Citratzyklus eingeschleust werden [SOARES *et al.*, 1999]. Die Besonderheit dieses Enzyms ist ein Prolin am N-terminalen Ende des Proteins. Im Vergleich zu anderen Basen die eine Keto-Enolautomerie katalysieren weist das durch das Gen *ydce* codierte Protein einen ungewöhnlich niedrigen pK_A auf. Der Grund oder die physiologische Notwendigkeit für eine hochdruckinduzierte Überexpression sind bislang jedoch noch nicht bekannt.

Während WELCH *et al.* (1993) bei *E. coli* eine hochdruckinduzierte Expression der Proteine GroEL, GroES und GrpE beobachten konnten, war dies bei der vorliegenden Untersuchung nicht der Fall. Als Grund hierfür kann die unterschiedlich lange Inkubationszeit bzw. die

höhere Druckintensität angeführt werden. So wurde bei den Untersuchungen von WELCH *et al.* (1993) für 30 bis 210 min. ein Druck von 53,5 MPa ausgeübt, während bei der vorliegenden Untersuchung für 15 min. ein Druck von 60 MPa ausgeübt wurde. WELCH *et al.* (1993) konnten bei längerer Inkubation eine erhöhte Expression der Streßproteine beobachten. Demnach würden die Gene *mopa* und *mopb* (GroEL, GroES) erst bei längerer Inkubation unter Hochdruck induziert. Dies würde sich auch mit der beobachteten Expression von GroEL bei *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 nach einer einstündigen Inkubation decken.

Die kurzzeitige Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck bewirkt gleichzeitig die Repression von mindestens sechs Proteinen. Dies ist zum einen das Gen *eno*, das für eine Enolase codiert. Die Enolase stellt ein Schlüsselenzym in der Glykolyse dar und katalysiert die Dehydratisierung des 2-Phosphoenolglycerats, wodurch ein Phosphoenolpyruvat entsteht [STRYER, 1994]. Neben diesem Schlüsselgen der Glykolyse wird auch das Gen *fba* reprimiert, das für eine Fructosebiphosphat-Aldolase codiert. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Fructose-1,6-biphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Es handelt sich somit um ein weiteres Schlüsselenzym der Glykolyse.

Weiterhin werden die Gene *nuoc* und *nuoe* reprimiert, die für das Enzym NADH-Dehydrogenase codieren. Über dieses Enzym treten die Elektronen des NADH in die Atmungskette ein. Durch die Repression entsteht eine Verschiebung des NADH-Pools. Dies deckt sich auch mit der Vermutung, daß die Induktion der Alkoholdehydrogenase bei *Lb. sanfranciscensis* durch die Verschiebung des NADH-Pools initiiert wird. Gleichzeitig mit der Regeneration von NADH an der Cytoplasmamembran der Bakterien tritt ein Protonenausstoß auf [SCHLEGEL, 1992]. Dies würde auch die Barotoleranz von *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 nach einem Säurevorstoß erklären. Ebenso konnte von WOUTERS *et al.* (1998b) auch gezeigt werden, daß eine *Lb. plantarum*-Kultur, die bei einem pH-Wert von 5,0 inkubiert wurde, wesentlich druckresistenter ist als eine Kultur, die bei einem pH-Wert von 7,0 einem Druck ausgesetzt wurde.

Neben den bereits beschriebenen Enzymen der Glykolyse und der Atmungskette wird das Gen *acnB*, das für die Aconitathydrase B codiert reprimiert. Dieses Protein, das auch als Aconitase bezeichnet wird, katalysiert die Dehydratisierung und anschließende Hydratisierung von Citrat, wodurch im Citratzyklus ein Isocitrat entsteht. Die Aconitase stellt somit ein Schlüsselenzym dar.

Hochdruck bewirkt weiterhin die Repression des Gens *ompf*. *Ompf* codiert für ein äußeres Membranprotein, das unspezifisch kleine hydrophile Moleküle in das Zellinnere schleust. Die Repression dieses Proteins wurde bereits für *E. coli* [NAKASHIMA *et al.*, 1995] beobachtet. Bei dem Tiefseebakterium *Photobacterium profundum* SS9 wurde die Repression des Proteins OmpL beobachtet [CHI und BARTLETT, 1993; WELCH und BARTLETT, 1996]. Beide Proteine bilden osmoregulierte Porinkanäle. Neben Hochdruck bewirkt auch eine Erhöhung des osmotischen Drucks und eine Erniedrigung des pH-Werts eine reduzierte Expression des Proteins OmpF [PRATT *et al.*, 1996]. Untersuchungen an dem Membranprotein OmpC, das unter Druck ebenfalls reprimiert wird und strukturelle Ähnlichkeit zu OmpF aufweist, haben gezeigt, daß hydrostatischer Hochdruck von 30 bis 90 MPa eine Öffnung des Porinkanals induziert [MACDONALD und MARTINAC, 1999]. Der Grad der Öffnung konnte bei dieser Untersuchung jedoch nicht bestimmt werden. Auch ist nicht bekannt, inwieweit die Öffnung des Kanals einen erhöhten Stoffaustausch mit der Umgebung bewirkt.

Über die Bedeutung der reprimierten Gene *eno*, *fba*, *nuoc*, *nuoe*, *acnb* und *ompf* ist bislang nur wenig bekannt. Diese Gene werden jedoch auch alle nach einer Hitzebehandlung reprimiert [DUGGAN *et al.*, 1999].

Ein Vergleich der hochdruckinduzierten Streßantwort von *E. coli* mit der durch Hitzeschock gleicher Intensität veränderten Genexpression zeigt signifikante Unterschiede. Es werden sowohl bei Hochdruck als auch bei Hitzestreß bei der vorliegenden Untersuchung nur zwei Gene induziert, fünf nicht reguliert und vier reprimiert. Sechzehn Gene hingegen werden unterschiedlich reguliert (vgl. Tabelle 4.1). Zieht man die Untersuchung von DUGGAN *et al.* (1999) heran, so werden fünf Gene induziert (*clpb*, *dnak*, *yccv*, *yhel*, *yrfg*), drei nicht reguliert (*livm*, *dgka*, *rnha*), sechs reprimiert (*eno*, *fba*, *nuoc*, *nuoe*, *acnb*, *ompf*) und dreizehn unterschiedlich exprimiert (*ydce*, *mopa*, *mopb*, *dnaj*, *ibpa*, *ibpb*, *glya*, *grpe*, *htpg*, *yrfh*, *fabg*, *pykf*, *yigd*). Die Unterschiede bei der Hitzeschockantwort sind vermutlich auf geringe Temperaturunterschiede zurückzuführen.

Generell läßt sich beobachten, daß sich die Intensität der Streßantwort stark unterscheidet. So ist bei gleicher Streßintensität nach einem Hitzeschock die Menge einzelner Gentranskripte um bis zu fünf Mal so hoch als bei der durch Hochdruck induzierten Antwort (vgl. Tabelle 4.1). Zum anderen unterscheiden sich die Antworten signifikant voneinander. Dies widerspricht jedoch der Annahme von IWAHASHI *et al.* (1993), die vermuten, daß

Hochdruckstreß in der Zelle den selben Schaden und somit die gleiche Streßantwort hervorruft wie Hitzeschock.

Tabelle 4.1: Vergleich der Änderung der Menge verschiedener Gentranskripte von *Escherichia coli* JM109(DE3) nach einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung von 15 min. bei 60 MPa bzw. Hitzebehandlung von 7 min. bei 50 °C

<i>Name</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Expression nach Hochdruckschock</i>		<i>Expression nach Hitzeschock</i>	
<u>Induziert</u>					
<i>clpb</i>	Hitzeschockprotein	+	2,08	+	9,06
<i>dnak</i>	Chaperone Hsp70; DNS Biosynthese; autoreguliertes Hitzeschockprotein	+	1,90	+	5,22
<u>Nicht reguliert</u>					
<i>glya</i>	Serinhydroxymethyltransferase	+/-	0,69	+/-	0,60
<i>grpe</i>	Hitzeschockprotein; Proteinreparation	+/-	0,93	+/-	1,36
<i>htpg</i>	Chaperone Hsp90; Hitzeschockprotein C62,5	+/-	1,30	+/-	1,20
<i>livm</i>	hochaffinitativer Aminosäuretransporter	+/-	1,17	+/-	0,72
<i>yrfh</i>	ORF, hypothetisches Protein; ähnlich zu Hitzeschockprotein 15	+/-	0,91	+/-	1,01
<u>Repremiert</u>					
<i>eno</i>	Enolase	-	0,48	-	0,27
<i>fba</i>	Fructose-Biphosphat-Aldolase. Klasse II	-	0,43	-	0,12
<i>nuoc</i>	NADH-Dehydrogenase I; Kette C, D	-	0,35	-	0,15
<i>nuoe</i>	NADH-Dehydrogenase I; Kette E	-	0,42	-	0,10
<u>unterschiedliche Expression</u>					
<i>yccv</i>	ORF, hypothetisches Protein	+	1,92	+/-	1,06
<i>yhel</i>	ORF; hypothetisches Protein	+	1,72	+/-	0,56
<i>yrfg</i>	vermeintliche Phosphatase	+	1,75	+/-	1,09

Tabelle 4.1: Fortsetzung

unterschiedliche Expression					
<i>ydce</i>	ORF; hypothetisches Protein	+	2,42	-	0,34
<i>dnaj</i>	Chaperone mit DnaK; Hitzeschockprotein	+/-	1,39	+	2,85
<i>ibpa</i>	Hitzeschockprotein	+/-	0,92	+	7,89
<i>ibpb</i>	Hitzeschockprotein	+/-	1,26	+	3,70
<i>mopa</i>	GroEL, Chaperone Hsp60; peptidabhängige ATPase; Hitzeschockprotein	+/-	1,25	+	4,74
<i>mopb</i>	GroES, 10 kDa Chaperone	+/-	1,12	+	5,18
<i>dgka</i>	Diacylglycerolkinase	+/-	0,74	-	0,29
<i>fabg</i>	3-Oxoacyl-[Acyl-Transport-Protein]-Reduktase	+/-	0,69	-	0,15
<i>rnha</i>	RNase HI, beteiligt an DNA-Replikation	+/-	0,94	-	0,15
<i>pykf</i>	Pyruvatkinase I, Fructosestimuliert	+/-	0,72	-	0,27
<i>yigd</i>	ORF; hypothetisches Protein	+/-	0,73	-	0,45
<i>acnb</i>	Aconitathydrase B	-	0,45	+/-	0,61
<i>ompf</i>	äußeres Membranprotein 1a	-	0,28	+/-	0,62

Der Vergleich der hochdruckinduzierten Genexpression bei grampositiven und gramnegativen Bakterien zeigt, daß zum einen durch eine subletale Hochdruckbehandlung die Expression von klassischen (Hitze-)streßproteinen wie z.B. ClpB, ClpL, DnaK und GroE induziert wird, wobei die Induktion offensichtlich zeitabhängig ist [WELCH *et al.*, 1993]. Weiterhin werden bei beiden diverse Enzyme des Energiestoffwechsels induziert (AdhE, RbsK, GapDH, YdcE). Bei gramnegativen Bakterien werden gleichzeitig einige Gene des Energiestoffwechsels reprimiert (*nuoc*, *nuoe*, *acnb*, *fba*, *eno*). Zusätzlich werden bei beiden Proteine bzw. Gene induziert, deren physiologische Bedeutung zur Kompensation der hochdruckinduzierten Veränderungen nicht bekannt ist (Seryl-t-RNS-Synthetase, *yccv*, *yhel*, *yrfg*). Des weiteren wird bei *E. coli* als Modellorganismus für gramnegativen Bakterien noch zusätzlich das äußere Membranprotein OmpF reprimiert, das unspezifisch kleine hydrophile Moleküle ins Zellinnere schleust.

4.3 Die Eignung von GFP als Reportergen zur Messung hochdruckinduzierter Genexpression

GFP ist gegenüber Hitze, alkalischen pH-Werten, Detergentien, chaotropen Salzen, organischen Lösungsmitteln und den meisten Proteinase stabil. Obwohl GFP ursprünglich von einer bei hohen Drücken lebenden Tiefseequalle exprimiert wird, ist das Verhalten dieses Moleküls unter Hochdruck bislang noch nicht untersucht worden.

Bei dieser Untersuchung zeigten alle untersuchten GFPs bis zu einem Druck von 600 MPa keine Abnahme der Fluoreszenz. Drücke dieser Intensität werden bei biologischen Untersuchungen, die sich mit druckinduzierten Regulationsphänomenen auseinandersetzen, kaum in Betracht gezogen. Die Physiologie und Lebensfähigkeit von Bakterien nimmt bereits bei Drücken von 100 MPa in gramnegativen und oberhalb von 250 bis 350 MPa in grampositiven Bakterien ab [CASAL and GOMEZ, 1999].

Eine verringerte Stabilität von rsGFP in intakten Zellen im Vergleich zu Rohextrakten zeigt einen destabilisierenden Effekt der cytoplasmatischen Bedingungen an. Die Zunahme der Fluoreszenz bei 700 MPa ist vermutlich auf die Schädigung der Membran zurückzuführen, ein Phänomen dessen auftreten bereits für *Escherichia coli* unter Hochdruckbedingungen beschrieben wurde [PAGÁN und MACKEY, 2000].

Der Einfluß extremer pH-Werte auf die Fluoreszenz ist nicht überraschend und wurde bereits des öfteren beschrieben. Bei wtGFP tritt bei sauren pH-Werten mit einem pKa von 4,5 eine Fluoreszenzlöschung auf. Verschiedene der stärker fluoreszierenden Mutanten sind sogar noch sensitiver gegenüber dem Einfluß von Säure als wtGFP. So ist beispielsweise GFP_{mut1} bei sauren pH-Werten zu 50% gequenched [PATTERSON *et al.*, 1997]. Eine mehr oder weniger starke pH-abhängige Verschiebung des Absorptions- und Extinktionsspektrums wurde von GONZÁLEZ *et al.*, (1997) und WARD *et al.* (1982) beschrieben.

In dieser Untersuchung wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität bei festen Anregungs- und Emissionswellenlängen gemessen. Bei diesen Bedingungen ist es nicht möglich zu entscheiden, ob der Verlust der Fluoreszenz auf eine Verschiebung des Anregungs- und Emissionsspektrums, eine veränderte Quantenausbeute oder eine Veränderung des molaren Extinktionskoeffizienten zugrunde liegt. Die gemessenen Verschiebungen des Anregungs- und Emissionsmaximums geht einher mit dem Hineinpressen von Wasser in das GFP-Molekül

(HERBERHOLD, persönliche Mitteilung). Sie ist jedoch zu gering, um alleine für den Verlust der Fluoreszenz verantwortlich zu sein.

Das wenig unterschiedliche Verhalten der durch Mutation entstandenen GFP-Varianten unter Hochdruckbedingungen und pH beruht vermutlich auf den veränderten Aminosäuren. Die Auswechslung von Ser65 in der Chromophorsequenz durch Thr (GFP_{mut1}) oder anderen aliphatischen Resten wie Ala oder Cys (GFP_{mut2} und rsGFP) führt zu einer stärkeren Fluoreszenz bei nur einem Anregungs- und Emissionsmaximums, das starke Ähnlichkeit zu Fluoreszin zeigt [TSIEN, 1998]. Weiterhin ist in Bakterien eine bessere Expression und eine schnellere Oxidation des gereiften Fluorophors zu beobachten, wenn wie bei rsGFP und GFP_{mut1} die Position 64 durch Leu substituiert oder wie bei GFP_{mut2} die Position 72 durch Ala substituiert wird [CORMACK *et al.*, 1996; MICHEL-BEYERLE, 1987; ÖRMÖ *et al.*, 1996]. Der Einfluß dieser Aminoacylsubstitutionen auf die Hochdruckstabilität ist bislang jedoch noch nicht geklärt.

Bisherige physikalische und chemische Studien an GFP haben weiterhin gezeigt, daß dieses Protein nur sehr schwer chemisch und thermisch zu denaturieren ist [WARD, 1981; WARD und BOKMAN, 1982]. YANG *et al.* (1996) vermuten, daß die einzigartige dreidimensionale Struktur von GFP für die Stabilität und andere Eigenschaften verantwortlich ist. Die Anwesenheit der dominierenden β -Faltblattstruktur läßt sich der Bande bei 1685 cm^{-1} zuordnen und deutet auf antiparallele β -Faltblattorientierung hin [JACKSON und MANTSCH, 1995]. Die Banden bei 1624 und 1638 cm^{-1} können der Absorption der β -Faltblattstruktur zugeordnet werden. Die Bande bei 1651 cm^{-1} ist auf vorhandene α -Helices zurückzuführen, während die Bande bei 1666 cm^{-1} zu Schleifenstrukturen gehört [JACKSON und MANTSCH, 1995; BYLER und SUSI, 1986; PANICK *et al.*, 1998]. Diese Aussage deckt sich mit bereits bekannten Röntgenstrukturanalysen von GFP [ORMÖ *et al.*, 1996]. Der Anteil der 3_{10} -Helix überlappt sich vermutlich mit der Bande bei 1666 cm^{-1} [HARIS und CHAPMAN, 1995].

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese hohe Temperaturstabilität. Die Zunahme der Intensität der Bande bei 1625 cm^{-1} und die Abnahme der Bandenintensität bei 1638 cm^{-1} lassen den Schluß zu, daß ein Teil der intramolekularen β -Faltblattstruktur verloren geht. Anstatt jedoch den aufgefalteten Zustand zu erreichen, wird bei hohen Temperaturen ein Aggregat gebildet. Diese Aggregation wird durch die Infrarotbänder charakterisiert, die typisch sind für intermolekulare anti-parallele, durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierte β -Faltblattstrukturen [DONG *et al.*, 2000; DAMASCHUN *et al.*, 2000]. Diese

Aggregation deutet darauf hin, daß Temperatur die Bildung einer zur Aggregation neigenden Konformation bewirkt. Bedingt durch die hohe Proteinkonzentration, die in den Infrarotexperimenten verwendet wird, wird das Spektrum des denaturierten Zustands häufig durch die Kinetik der Aggregation und die des Auffaltungszustands überdeckt.

Bei wtGFP konnte auch die Bildung eines Zwischenprodukts beobachtet werden. Das Auftreten eines solchen Intermediats ist überraschend. Kürzlich ist das Vorhandensein solch eines Intermediats bei der Auffaltungskinetik des menschlichen Fibroblastenwachstumsfaktors bereits beschrieben worden, ein Protein das eine ähnliche Struktur wie GFP aufweist [SAMUEL *et al.*, 2000]. Andererseits ist es bekannt, daß das Fluoreszenzspektrum von wtGFP zwei Anregungsmaximas bei 395 und 475 nm besitzt [TSIEN, 1998]. Diese sind zwei chemisch unterschiedlichen Zuständen von GFP zuzuschreiben, der neutralen und der anionischen Form des Chromophors. Wenn die Temperatur von 15 auf 65 °C erhöht wird, nimmt das Maximum bei 395 nm ab und das bei 475 nm zu [TSIEN, 1998]. Dies deutet auf einen Übergang zwischen diesen beiden Zuständen hin. Da diese Temperaturerhöhung dem in Abbildung 3.38 gezeigten ersten Übergang entspricht, kann nicht ausgeschlossen werden, daß dies der Umwandlung des Chromophors und nicht der Bildung eines Zwischenzustandes entspricht. Dennoch sollte angemerkt werden, daß die Konformationsänderungen nach einem Zustandsübergang eher klein sind [VAN THOR *et al.*, 1998], was hier jedoch nicht der Fall ist.

Im Gegensatz zu der im Detail untersuchten Temperaturstabilität von wtGFP [BOKMAN und WARD, 1982; WARD, 1981] ist weder etwas über die Druckstabilität, noch etwas über den Effekt von Mutationen auf diese Druckstabilität bekannt. Diese Mutationen (Tabelle 1.5) wurden eingeführt, um Faltungseffizienz und die Fluoreszenzintensität zu steigern, und die Neigung zur Dimerisierung zu verringern. WtGFP, GFP_{mut1} und GFP_{mut2} sind bis zu einem Druck von 1,3-1,4 GPa stabil, während die Sekundärstruktur von AFP bis zu 1,0 GPa druckinsensitiv ist. Die meisten Proteine haben einen Auffaltungsübergangsmittelpunkt bei 500-600 MPa. Eine ähnliche Hochdruckstabilität wie von wtGFP und seinen durch Mutation entstandenen Variationen ist nur in wenigen anderen Fällen, wie z.B. bei Insulin [CHAI und JHON, 2000], bei Pankreastrypsinhibitoren von Rindern (BPTI) [GOOSSENS *et al.*, 1996; WROBLOWSKI *et al.*, 1996] und in der Ribonuklease P2 aus *Sulfolobus solfataricus* [FUSI *et al.*, 1997] beobachtet worden. Die jeweiligen Molekulargewichte dieser Proteine sind 5,7 kDa, 6,5 kDa und 7 kDa. GFP ist das erste Protein mit größerem Molekulargewicht (27 kDa), das solch eine Hochdruckstabilität aufweist.

Es ist bekannt, daß sich der Druckeffekt auf Proteine aus zwei Teilen zusammensetzt, einem elastischen und plastischen Effekt [FRAUENFELDER *et al.*, 1990; HEREMANS und SMELLER, 1998]. Im elastischen Bereich verursacht der Druck Änderungen der Bindungsabstände, in der Hydratation und Größe der Hohlräume. Demgegenüber wird im plastischen Bereich eine Konformationsänderung hervorgerufen, die reversibel oder irreversibel sein kann. Die beobachteten Änderungen in der Region der AmidI Bande schließen das Auftreten von plastischen Effekten aus, was vermuten läßt, daß bei GFP bis zu 1,3-1,4 GPa bzw. bei AFP bis zu 1,0 GPa nur elastische Effekte auftreten. Außerdem wird im Allgemeinen angenommen, daß das Eindringen von Wasser in das Protein eine Voraussetzung für die Druckdenaturierung ist [HUMMER *et al.*, 1998]. Computersimulationen des Hochdruckeffekts auf BPTI stützen dieses Modell [WROBLEWSKI *et al.*, 1996]. Bei GFP und seinen durch Mutationen entstandenen Varianten ist es offensichtlich schwierig Wasser durch Druck in das Protein zu pressen. Für diese Eigenschaft wird die einzigartige β -Dosenstruktur von GFP verantwortlich gemacht. Es wäre weiterhin interessant, die Druckstabilität anderer Proteine mit einer β -Dosenstruktur zu untersuchen.

Nur die Mutante AFP, in der drei Aminosäuren (F64L, S65C, I167T) ersetzt wurden, wird erheblich drucksensitiver. AFP unterscheidet sich von den anderen durch Mutation entstandenen Varianten insbesondere durch eine Veränderung in einem β -Faltblatt der strukturgebenden β -Dose (I167L). Alle anderen Veränderungen (in Positionen 64, 65, 68 und 72) befinden sich in der α -Helix, die in der β -Dosenstruktur eingeschlossen ist [YANG *et al.*, 1996]. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß Veränderungen in der strukturgebenden β -Dose zu einem drucksensitiveren Molekül führen.

Mittels der FTIR-Spektroskopie sollte überprüft werden, ob für die offline gemessene Abnahme der Fluoreszenz (Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33) eine Veränderung in der Sekundärstruktur verantwortlich gemacht werden kann. Bei der Untersuchung von GFP-haltigen Rohextrakten konnte zwischen 300 bis 400 MPa eine schwache Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 3.32). Mittels der FTIR-Spektroskopie konnte für das gereinigte Protein gezeigt werden, daß es für die untersuchte Druckregion keine Änderungen in der Sekundärstruktur von GFP gibt, mit der solch eine Zunahme erklärt werden könnte. Der druckinduzierte elastische Effekt könnte jedoch Änderungen in der Dynamik des Proteins hervorrufen. Diese geänderte Dynamik kann zu einer Änderungen in der Position und im Abstand der Aminosäuren führen, welche die Position des Chromophors

fixieren und geringfügige Veränderungen in der Fluoreszenzintensität verursachen. Weiterhin wäre es denkbar, daß sich durch die Veränderung der Bindungsabstände eine Verschiebung der Ladungsdichte insbesondere im Chromophor ergibt, die zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führt.

Bei zunehmendem Druck (≥ 600 MPa) wurde in GFP-haltigen Rohextrakten eine Abnahme der Fluoreszenz von GFP beobachtet. Im Falle von gereinigtem AFP begann bei pH 5,6 die Abnahme bereits bei ungefähr 400 MPa. Mit einem Lichtmikroskop konnten bei diesem Protein *in situ* in Acetatpuffer (pH 5,6) ab 700 MPa das Auftreten unlöslicher Aggregate beobachtet werden. Die offensichtliche Diskrepanz bei der notwendigen Druckintensität kann durch die Tatsache erklärt werden, daß die Aggregation bis zu ihrer Sichtbarkeit bei 700 MPa schon fast vollständig abgelaufen ist, einem Druck bei dem das Fluoreszenzsignal bereits auf fast 10% der Ausgangsfluoreszenz verringert worden ist.

Obgleich bekannt ist, daß Hochdruck in der Lage ist, Proteinaggregate zu trennen [SMELLER *et al.*, 1999; JOHN *et al.*, 1999], wurde bereits auch bei anderen Proteinen eine hochdruckinduzierte Aggregation beobachtet [GOOSSENS *et al.*, 1996; ZIPP und KAUZMANN, 1973]. Diese Aggregation scheint nicht mit Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins zusammenzuhängen. Was kann also diese Aggregation verursachen? Erstens bevorzugt Hochdruck jene Reaktionen, die mit einer Volumenabnahme einhergehen. Im Falle von Pufferlösungen ist die Protonierung solch eine Reaktion, die eine positive oder negative Volumenänderung ΔV hervorruft. Ideal ist ein ΔV das nahezu oder gleich Null ist, da dann der pH-Wert des Puffers druckunabhängig ist. Der pH-Wert des Acetatpuffers, der ein negatives ΔV besitzt, verringert sich bei Zunahme des Drucks um 0,05 bis 0,2 pH Einheiten je 100 MPa [OWEN und BRINKLEY, 1941]. Bei 700 MPa beträgt der pH des Puffers ungefähr 4,75. Zum zweiten ist der isoelektrische Punkt pI des Proteins nicht notwendigerweise druckunabhängig. So kann Druck bewirken, daß der pH-Wert des Lösungsmittels und der pI des Proteins, der 4,6-5,1 bei Atmosphärendruck ist, sich annähern. Wie im Allgemeinen bekannt ist, ist die Löslichkeit eines Proteins an seinem isoelektrischen Punkt am niedrigsten, was vermuten läßt, daß die Aggregation von GFP auf eine unter den gegebenen Bedingungen auftretende Unlöslichkeit zurückzuführen ist. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von KNEEN *et al.* (1998), in der die Änderungen der Fluoreszenz unterhalb von pH 5 einer möglichen verringerten Löslichkeit zugeschrieben wird. Weiterhin haben KENDRICK *et al.* (1998) gezeigt, daß die Aggregation des rekombinanten menschlichen γ -Interferons durch

eine Vielzahl von Bedingungen induziert werden kann, wie z.B. durch Hitze, Absenkung des pH bis 2, niedrigen Konzentrationen von Guanidiniumhydrochlorids, Natriumthiocyanat und das Aussalzen mit Poly(ethylen-)glykol. In allen Fällen außer dem letztgenannten, wurde das Infrarotspektrum der Aggregate durch die Banden bei 1618 und 1683 cm^{-1} dominiert, welche anzeigen, daß eine Konformationsänderung stattgefunden hat. Die Aggregation, die durch Poly(ethylen-)glykol hervorgerufen wurde, verursachte jedoch keine Konformationsänderung. Diese Autoren stellten fest, daß die Aggregation auf eine Verringerung der Löslichkeit beruht. Eine verringerte Löslichkeit könnte auch eine Erklärung für die Abnahme der Fluoreszenz in dem ebenfalls druckempfindlichen Succinatpuffer sein. Obwohl nahe liegt, daß die Konzentrationen, die für die Fluoreszenzmessungen verwendet wurden ($\sim 1\text{mg/ml}$) im Vergleich zu den FTIR Experimenten ($\sim 50\text{mg/ml}$) nicht so leicht zu einer Aggregation führen, gibt es eine deutliche Übereinstimmung der mit diesen beiden Techniken ermittelten Ergebnissen. Außerdem beobachteten ZIPP und KAUZMANN (1973) die druckinduzierte Aggregation von Myoglobin bei einer Proteinkonzentration, die etwa nur halb so groß ist, wie die in dieser Studie verwendete.

Weiterhin ist der pH des Tris*HCl Puffers druckunabhängig [NEUMAN *et al.*, 1973]. Obgleich für BPTI druckinduzierte Proteinaggregation in Tris*HCl Puffer beobachtet werden konnte [GOOSSENS *et al.*, 1996], war dies bei GFP in der Diamantamboßzelle in Übereinstimmung mit den offline Messungen nicht der Fall. Dies ist der wahrscheinlichste Grund, weshalb bei pH 8,0 die Löslichkeit von GFP nicht abnimmt.

Schlußfolgerungen

- 1) GFP ist nicht nur enorm resistent gegenüber Hitze und anderen Formen der Denaturierung, sondern entfaltet sich auch nicht bei Drücken bis zu 1,3-1,4 GPa bzw. bis zu 1,05 GPa im Fall von AFP. Dies ist für ein Protein dieser Größe eher ungewöhnlich. Hierfür ist vermutlich die einzigartige dreidimensionale Struktur von GFP verantwortlich. Diese Hochdruckstabilität macht es unmöglich das Phasendiagramm von wtGFP, GFP_{mut1} und GFP_{mut2} zu bestimmen. Eine ähnliche Schlußfolgerung wurde auch für die Ribonuklease P2 gezogen [FUSI *et al.*, 1997].
- 2) Zwischen 45-65 °C durchläuft wtGFP eine strukturelle Veränderung, die zu der Bildung eines Intermediats führt.
- 3) Die meisten mikrobiologischen Genexpressionsstudien werden in Druckbereichen von 50 bis 400 MPa, pH 5,5 bis pH 7,2 und Temperaturen von 25 bis 40 °C durchgeführt.

Für diese Bedingungen zeigen wtGFP und die untersuchten Mutanten weder eine Veränderung der Sekundärstruktur, noch eine Abnahme der Fluoreszenz.

- 4) Die Zunahme der Fluoreszenz von GFP bei 300 bis 400 MPa beruht vermutlich auf elastischen Effekten des Drucks, was zu einer verbesserten Interaktion des Chromophors mit seiner Umgebung führt. Weiterführende Experimente an GFP sollten Kompressibilitätsmessungen beinhalten, um diese Hypothese zu verifizieren.
- 5) Die Abnahme der Fluoreszenz in Acetatpuffer bei 600-700 MPa beruht auf der Aggregation von GFP. Demnach ist GFP durch seine enorme Stabilität zwar an sich als Reportermolekül für die Untersuchung der hochdruckinduzierten Genexpression zwar geeignet. Da jedoch die Faltung des Proteins stark von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig ist, ist es bei (anaeroben) Milchsäurebakterien und unter Hochdruck nur bedingt als Reportermolekül zur Verfolgung der Genexpression einsetzbar.

4.4 Expression von GFP unter Hochdruck

Die Expression von rsGFP unter subletalen Hochdruck wurde in *E. coli* BL21 untersucht. Dieses System wurde gewählt, da es die strenge Kontrolle der Expression des Gens erlaubt, das sich abwärts der T7 RNS-Polymerasebindungsstelle befindet. In *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wird die Expression der T7 RNS-Polymerase von einem IPTG-induzierbaren lacUV5 Promotor kontrolliert. Dieser gentechnologisch veränderte Promotor ist nahezu genauso stark wie der ursprüngliche *lac* Promotor, ist aber gegenüber katabolischer Repression nicht mehr zugänglich [SCHWARTZ and BECKWITH, 1970]. Die schwache Fluoreszenz von rsGFP in induzierten Zellen bei 0,1 MPa (Atmosphärendruck) war reproduzierbar und beruht vermutlich auf unzureichend richtiger Faltung bzw. Chromophorbildung, die durch Sauerstofflimitierung hervorgerufen wurde.

Die deutliche Druckinduzierbarkeit des lacUV5-Promotors deckt sich mit Beobachtungen von KATO *et al.* (1994), die beschreiben, daß die Genexpression von *lac*- und *tac*-Promotoren in Abwesenheit von IPTG durch Hochdruck bei 30 und 50 MPa initiiert und gegenüber Normaldruck deutlich verstärkt wird [CLOSE und RODRIGUES, 1982; KATO *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995]. Der *lac*-Promotor und seine Derivate *tac* und *lacUV5* werden durch das Anbinden des chemischen Induktors an das Repressorprotein LacI und dessen anschließende Ablösung von der Bindungsstelle auf der DNA induziert [OGATA und GILBERT, 1979]. Da die

Inaktivierung der LacI-Expression ausgeschlossen werden kann, stellten KATO and HORKOSHI (1996) die Hypothese auf, daß Hochdruck zu einer Änderung der Verwindung innerhalb des Plasmides kommt, wodurch eine veränderte Wechselwirkung mit der Bindung von LacI zustande kommt. Eine andere Möglichkeit ist eine strukturelle Änderung des Repressorproteins selbst, wodurch eine reduzierte DNA-Bindungscharakteristik entsteht.

Zur Untersuchung der Eignung von GFP als Reportermolekül zur Messung der hochdruckinduzierten Genexpression wurden *E. coli* Kulturen mit den in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Plasmiden transformiert und analog zur Untersuchung mittels DNA-Microarray (3.2.2) für 15 min. einem Druck von 60 MPa ausgesetzt. Als Kontrolle dienten ungestreßte Zellen und Zellen, die für 7 min. einem Hitzeschock von 50 °C ausgesetzt wurden.

Für alle hitzebehandelten Konstrukte konnte etwa 60 min. nach erfolgter Streßbehandlung ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Diese Verschiebung deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Zeit, die zur vollständigen Faltung des Proteins nach erfolgter Expression notwendig ist [CHA *et al.*, 1999; ALBANO *et al.*, 1996; RANDERS-EICHHORN *et al.*, 1997]. Die Abnahme der Fluoreszenz des *dnaK*-Promotor-GFP-Fusionskonstrukts läßt sich mit der Bildung von Dimeren bzw. unlöslicher Aggregate („inclusion bodies“) bei höheren Konzentrationen erklären, da ein Abbau durch Proteinasen wegen der großen Stabilität von GFP gegenüber diesen auszuschließen ist [WARD, 1981; WARD und BOKMAN, 1982].

Das Promotor-Fusionskonstrukt mit dem *groE*-Promotor läßt sich durch eine fünfzehnminütige Hochdruckbehandlung nicht induzieren. Dies deckt sich mit den Untersuchungen mittels DNS-Microarray und der dort geäußerten Hypothese, daß die Translation und Expression von GroE abhängig ist von der Inkubationsdauer. Dies deckt sich auch mit Untersuchungen von WELCH *et al.* (1993), die bei längerer Inkubationsdauer eine Zunahme der hochdruckinduzierten Proteine beobachten konnten. Das Konstrukt mit *clpB* als Promotor hingegen läßt sich schwach, das mit *dnaK* stark induzieren. Dies deckt sich einerseits mit den Untersuchungen mittels Microarray, da dort ebenfalls beide Gene induziert waren. Andererseits war dort *clpB* um etwa 10% stärker induziert als *dnaK*. Dies läßt sich bei den GFP-Konstrukten jedoch nicht wieder finden. Grund hierfür ist vermutlich die geringe Sensitivität der Konstrukte gegenüber der Arraytechnologie. Als problematisch erweist sich auch, daß sowohl *groE* als auch *dnaK* und *clpB* auf niedrigem Level konstitutiv exprimiert

werden [NEIDHARD und VANBOGELEN, 1987], wobei auch bei ungestreßten Zellen ein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen ist.

Generell läßt sich jedoch beobachten, daß das Signal der hitzebehandelten Zellen stets stärker ist, als das der hochdruckbehandelten Zellen. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen mittels DNS-Microarray. Dort ist das hitzeinduzierte Signal ebenfalls stets bis zu fünf Mal so stark wie das Signal der hochdruckbehandelten Zellen. WELCH *et al.* (1993) konnten gegenüber hitzebehandelten Zellen ebenfalls nur eine schwache Streßantwort beobachten. Weiterhin konnten sie unter Hochdruckbedingungen eine wesentlich langsamere und zeitverzögerte Proteinbiosynthese beobachten, die auch nach Wegnahme des Drucks zunächst noch zu beobachten war. Ein direkter Vergleich zwischen hitzebehandelten und hochdruckbehandelten Zellen ist deshalb nicht möglich. Außerdem ist durch die Bildung von „inclusion bodies“ nur bedingt eine Quantifizierung möglich. Für qualitative Untersuchungen, die sich vorwiegend mit der Frage einer Induktion auseinandersetzen, ist GFP als Reportermolekül jedoch geeignet.

Die Fluoreszenzintensität von GFP und seinen Mutanten wird durch Hochdruckbedingungen *in vitro* nicht beeinflußt, so daß Expressionsstudien in *Escherichia coli* unter subletalen Bedingungen möglich sind. Die Eignung für andere Bakterien muß, wie am Beispiel *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 gezeigt, im Einzelnen untersucht werden. Die beobachtete pH-Sensitivität kann weiterhin auch gut zur Messung intrazellulärer oder organeller pH-Werte verwendet werden. Weitere Untersuchungen an anderen hilfreichen Mutanten wird über die limitierenden Applikationsmöglichkeiten wie z.B. Präzipitationen in Form unlöslicher „inclusion bodies“, verzögerte Faltung und geringe Sensitivität des Fluoreszenzsignals gegenüber enzymatischen Reportermolekülen hinweg helfen.

5 Zusammenfassung

Methoden der nichtthermischen Lebensmittelbehandlung gewinnen in zunehmendem Maße in der Lebensmittelindustrie an Bedeutung. Unter diesen Methoden nimmt insbesondere die Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck eine besondere Rolle ein, da mit ihr nicht nur eine Verbesserung der Haltbarkeit von Lebensmitteln erreicht werden kann, sondern diese Technologie zugleich auch noch das Aroma, die Farbe und wertgebende Inhaltsstoffe sehr gut erhält und zum Teil eine gewünschte Veränderung der Textur hervorruft.

Neben der Verbesserung der Haltbarkeit von Lebensmitteln ist es auch denkbar, daß sich die Biotechnologie zukünftig der durch Hochdruck hervorgerufenen Adaptations- und Kompensationsmechanismen von Mikroorganismen bedient. Hierzu ist jedoch eine genaue Kenntnis der hochdruckinduzierten Genexpression notwendig. Ziel dieser Arbeit war es, die hochdruckinduzierte Streßantwort anhand von *Escherichia coli* für gramnegative und *Lactobacillus sanfranciscensis* für grampositive Bakterien zu untersuchen. Weiterhin sollte die Eignung des Markerproteins Green Fluorescent Protein (GFP) zur *in situ* Messung hochdruckinduzierter Genexpression untersucht werden.

Für grampositive Bakterien ließ sich zeigen, daß eine Vorbehandlung mit subletalen Hochdruck eine Barotoleranz induziert. Eine in der Intensität nahezu identisch ausgeprägte Druckresistenz ließ sich bei Zellen beobachten, die einem Säure- oder Osmostreß ausgesetzt waren. Dies war auch für Zellen in der stationären Wachstumsphase der Fall. Hitzestreß hingegen führte zu einer erhöhten Barosensitivität.

Mittels 2-D-Gelelektrophorese ließ sich zeigen, daß hydrostatischer Hochdruck die Expression von mindestens 30 Proteinen induziert. Von den überexprimierten Proteinen wurden acht durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. Es waren dies im einzelnen zwei generelle Streßproteine (ClpL, GroEL), drei Proteine des Energiestoffwechsels (RbsK, GapDH, AdhE) und eine Seryl-tRNS-synthetase, die bei *Cl. acetobutylicum* in der stationären Wachstumsphase exprimiert wird. Zwei Sequenzen waren in der Datenbank nicht eindeutig einem Protein zuzuordnen. Interessanterweise ist *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 nicht in der

Lage Ribose zu verstoffwechseln, weshalb die Funktion des Proteins RbsK, das große Ähnlichkeit zur Ribokinase aufweist, noch zu klären bleibt.

Ein Vergleich des Proteinmusters von hochdruckbehandelten Zellen mit dem von pH-gestressten, osmogetressten, hitzestressten sowie stationären Zellen zeigte, daß insbesondere stationäre Zellen und Kochsalzgestresste Zellen eine ähnliche Antwort wie die hochdruckbehandelten Zellen zeigen. Das Proteinmuster hitzebehandelter Zellen zeigte die geringste Ähnlichkeit.

Mittels DNS-Microarray konnte für *Escherichia coli* gezeigt werden, daß durch Hochdruck ebenso wie bei grampositiven Bakterien das Hitzeschockgen *clpB*, das Homologien zu *clpL* aufweist, induziert wird. Daneben wird auch die Expression des Hitzeschockgens *dnaK* initiiert. Die Expression des Chaperonbestandteils *groEL* konnte hierbei im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien jedoch nicht beobachtet werden. Weiterhin wurden die Gene *yccv*, *yrfg* und *yhel* induziert, deren Funktion nicht bekannt ist. Außerdem wird das Gen *ydce* verstärkt exprimiert, das für 4-Oxalocronat-Tautomerase codiert, einem Enzym des Energiestoffwechsels.

Hochdruck bewirkt bei gramnegativen Bakterien außerdem bei 27 untersuchten Genen die Repression von sechs Genen, von denen eines in der Glykolyse (*eno*), zwei im Citratzyklus (*acnb*, *fba*), zwei in der Atmungskette (*nuoc*, *nuoe*) und eines als Porinkanal in der äußeren Membran (*ompf*) vorkommen.

Ein Vergleich mit der durch Hitze gleicher Streßintensität hervorgerufenen Genexpression zeigt bei den induzierten Genen stets eine um bis zu fünfmal so starke Induktion. Zum anderen werden von den untersuchten Genen nur etwa 50% identisch reguliert.

Generell läßt sich anhand der erzielten Ergebnisse keine nur auf Hochdruck reagierende spezifische Streßantwort detektieren. Größte Ähnlichkeit zur hochdruckinduzierten Streßantwort zeigen stationäre Zellen bzw. Zellen, die mit Säure- oder Osmostreßbedingungen konfrontiert wurden.

Zur Untersuchung der Eignung von Green Fluorescent Protein (GFP) als Reportermolekül für die hochdruckinduzierte Genexpression wurden GFP-haltige Rohextrakte, gereinigtes GFP und GFP-haltige Zellen mit hydrostatischem Hochdruck von 100 bis 900 MPa behandelt und

anschließend die Fluoreszenzänderung bestimmt. Hierzu wurden „wildtyp“-GFP (wtGFP) und drei verschiedene „rotshift“-Mutanten (rsGFP, GFP_{mut1}, GFP_{mut2}) verwendet. Alle getesteten GFPs zeigten ohne Verlust bis 600 MPa deutliche Fluoreszenz. Bei höheren Drücken nahm die Fluoreszenz ab.

Zur Klärung dieser Abnahme wurde die druckinduzierte Änderung der Sekundärstruktur mittels Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)-Spektroskopie untersucht. Für wtGFP, GFP_{mut1} und GFP_{mut2} konnte bis zu einem Druck von 1,3-1,4 GPa keine Änderung der Sekundärstruktur beobachtet werden, wohingegen rsGFP bereits bei 1,0 GPa erste Auffaltungserscheinungen zeigte. Hierfür wird die 3D-Struktur des Moleküls verantwortlich gemacht. Die beobachtete Fluoreszenzänderung wird druckinduzierten elastischen Effekten zugeschrieben. Über 600 MPa beruht die Abnahme der Fluoreszenz auf Aggregation.

Die Expression von GFP unter subletalen Bedingungen wurde in *Escherichia coli* mit dem Plasmid pQBI63 untersucht, in dem sich rsGFP abwärts der T7 RNS-Polymerasebindungsstelle befindet. Die T7 RNS-Polymerase wird in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS durch einen Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren lacUV5 Promotor kontrolliert. Bei einem Druck von 50 MPa und 70 MPa konnte sowohl mit als auch ohne IPTG-Zusatz eine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden.

Die Expression von GFP konnte bei schwächer induzierten Promotoren wie *dnaK*, *clpB* und *groE* nicht online unter Hochdruckbedingungen gemessen werden. Durch kurzzeitigen Druckschock konnte bei *E. coli* jedoch die Expression von GFP unter der Kontrolle der Promotoren *dnaK* bzw. *clpB* induziert werden, dessen Bildung bei Atmosphärendruck und Sauerstoffanwesenheit gemessen werden konnte. GFP unter der Kontrolle eines *groE*-Promotors zeigte nach Hochdruckschock keine erhöhte Expressionsrate. Hitzeschockkontrolllexperimente zeigten stets eine erhöhte Expression.

6 Summary

Methods of non-thermal treatment of food are gaining more and more interest in food industry. Among these methods especially the treatment with high hydrostatic pressure is of special interest, as it not only improves the preservation, but also conserves the flavour, the colour and the texture of food very accurately. Apart from the improvement of the preservation it is considerable that the mechanisms of microorganism to adapt and compensate high hydrostatic pressure will be used in biotechnology. Therefore it is necessary to know the gene expression induced by high hydrostatic treatment. The aim of this work was to investigate the high pressure induced stress response using *Escherichia coli* for gramnegative and *Lactobacillus sanfranciscensis* for grampositive bacteria. Furthermore the object of this work was to evaluate the use of wild-type GFP and mutant forms thereof as reporter for the *in situ* measurement of gene expression under high pressure conditions.

For grampositive bacteria it was shown, that a pretreatment with sublethal high pressure induces a barotolerance. A pressure resistance with similar intensity was observed after pretreatment with acid or osmo stress with comparable results for cells in the stationary growth phase. Heat stress on the other hand leads to a higher barosensitivity.

Using 2-D-Gelelectrophoresis it was shown, that high hydrostatic pressure induces the expression of about 30 proteins. Eight of them were identified by n-terminal sequencing. Two of the overexpressed proteins were general stress proteins (ClpL, GroEL), three are playing an important role in the energy metabolism of cells (RbsK, GapDH, AdhE) and one was a seryl tRNA synthetase, which is also induced in the stationary growth phase of *Clostridium acetobutylicum*. For two other short sequences of pressure sensitive proteins no homologies to known proteins were found. *Lb. sanfranciscensis* TMW1.53 is not able to use ribose in the energy metabolism, so that the function of the protein RbsK which shows similarity to a ribokinase needs to be determined. The pressure induced proteome level stress response of growing cells was compared to the response induced by pH-, salt- and, temperature stress as well as to the response in stationary cells. It became evident that the answer of especially the

stationary , pH and salt stressed cells are comparable to the response of the pressurized cells. The proteome level of heat stressed cells shows the least similarities.

The investigation of the high pressure induced stress response of *Escherichia coli* with DNA microarray showed the induction of the heat stress gene *clpB*, which shows homology to ClpL, a protein which was induced in grampositive bacteria. Also the expression of the heat shock gene *dnaK* was induced. In contrast to grampositive bacteria the overexpression of the chaperonin component *groEL* could not be determined. Furthermore the genes *yccv*, *yrfg* und *yhel* were induced. The function of these genes is not known exactly. Moreover the expression of the gene *ydce* (4-oxalocronat tautomerase) is induced, an enzyme of the energy metabolism. Six of 27 investigated genes in gramnegative bacteria are repressed by high hydrostatic pressure treatment. One of them is found in the glycolyse (*eno*), two of them in the Krebs cycle (*acnb*, *fba*), two in the respiration chain (*nuoc*, *nuoe*), and one of them is a porin channel in the outer membrane (*ompf*). The pressure induced RNA level stress response was compared to that one induced by heat stress of the same stress intensity. It became evident, that the genes induced by heat stress showed a higher expression rate than those induced by high hydrostatic pressure. Furthermore only about 50% of the investigated genes were regulated in the same way.

Generally speaking it was not possible to detect a stress response specifically induced by high pressure. The high pressure induced stress response showed closest similarity to that one induced by pH-, NaCl and in stationary cells.

Green fluorescent protein (GFP) is a widely used reporter molecule for monitoring gene expression. To evaluate the use of wild-type GFP and three mutant forms as reporter for gene expression under high pressure conditions, the intensity of fluorescence after high pressure treatment was checked by subjecting cells, crude protein extracts containing GFPs and purified GFPs to pressure ranging from 100 bis 900 MPa. All tested GFPs retained fluorescence up to 600 MPa without loss of intensity. Pressure treatment with more than 600 MPa leads to a significant loss of fluorescence. To determine the reason for the loss of fluorescence intensity, the high pressure induced changes of the secondary structure was investigated by FTIR spectroscopy. For wtGFP, GFPmut1 and GFPmut2 the secondary

structure remained intact up to 1,3-1,4 GPa, whereas rsGFP started unfolding around 1,0 GPa. The 3-D structure is held responsible for this high pressure stability. The observed changes in fluorescence are rationalized in terms of the pressure-induced elastic effects. Above 600 MPa, loss of fluorescence is due to aggregation. The expression of GFP under sublethal conditions was investigated by *Escherichia coli* with plasmid pQBI63, in which rsGFP is placed downstream of the T7 RNA polymerase binding site. T7 RNA polymerase is controlled in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS by an isopropylthiogalactosid (IPTG) inducible LacUV5 promoter. A pressure induced increase of GFP expression with and without IPTG was monitored at 50 MPa and 70 MPa. The expression of GFP under the control of the high pressure induced promoters *dnaK*, *clpB* and *groE* could not be detected online under high pressure conditions, as for the folding of the chromophore the presence of oxygen is necessary. After treatment with high pressure for 15 min., the expression of GFP under the control of the promoters of *dnaK* and *clpB* could be monitored under atmospheric conditions and the presence of oxygen. GFP under the control of the promoter of *groE* showed no GFP expression after high hydrostatic pressure treatment. Heat stress control experiments always showed greater GFP expression rate.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, F., Horikoshi, K. (2000):** Tryptophan Permease Gene *TAT2* Confers High-Pressure Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20: 8093-8102.
- Abe, F., Horikoshi, K. (2001):** The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnol* 19: 102-108.
- Abe, F., Kato, C., Horikoshi, K. (1999):** Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends in Microbiology* 7: 447-453.
- Achen , M.G., Davidson, B.E., Hillmier, A.J. (1986):** Construction of plasmid vectors for the detection of streptococcal promoters. *Gene* 45: 45-49.
- Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W.E., Rao, G. (1998):** Green Fluorescent Protein as a Real Time Quantitative Reporter of Heterologous Protein Production. *Biotechnol Prog* 14: 351-354.
- Alemayehu, D., O'Sullivan, E., Condon, S. (2000):** Changes in acid tolerance of *Lactococcus lactis* during growth at constant pH. *Int J Food Microbiol* 55: 215-221.
- Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Suzuki, J., Tasaka, Y., Murata, N. (1999):** Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5862-5867.
- Allen, E.A., 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.A., 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: 1710-1720.
- Arnau, J., Jorgensen, F., Madsen, S.M., Vrang, A., Israelsen, H. (1998):** Cloning of the *Lactococcus lactis adhE* Gene, Encoding a Multifunctional Alcohol Dehydrogenase, by Complementation of a Fermentative Mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 3049-3055.

- Arnau, J., Sorensen, K.I., Appel, K.F., Vogensen, F.K., Hammer, K. (1996):** Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology* 142: 1685-1691.
- 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.
- Arroyo, G., Sanz, P.D., Préstamo, G. (1999):** Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. *J Appl Microbiol* 86: 544-556.
- Auffray, Y., Gansel, X., Thammavongs, B., Boutibonnes, P. (1992):** Heat shock-induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr Microbiol* 30: 87-91.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sedman, J.A., Struhl, K. (1987):** Current protocols in molecular microbiology. John Wiley and Sons, New York.
- Balny, C., Masson, P., Travers, F. (1989):** Some recent aspects of the use of high-pressure for protein investigations in solution. *High Pressure Research* 2: 1-28.
- Balny, C., Masson, P. (1993):** Effects of high pressure on proteins. *Food Review Int* 9: 611-628.
- Baross, J.A., Hanus, F.J., Morita, R.Y. (1975):** Survival of human enteric and other sewage microorganisms under simulated deep-sea conditions. *Appl Microbiol* 30: 309-318.
- Bartlett, D., 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., Kato, C., Horrikoshi, K. (1995):** High pressure influences on gene and protein expression. *Res Microbiol* 146: 697-706.
- Benz, R., Bauer, K. (1988):** Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria, review on bacterial porins. *Eur J Biochem* 176: 1-19.
- Bernhardt, J., Völker, U., Völker, 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: 999-1017.
- Blum H., Beier, H., Gross, H.J. (1987):** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

- Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W.P. (1995):** Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis*. Getreide Mehl und Brot 49: 370-374.
- Bokman, S.H., Ward, W.W. (1981):** Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. Biochem Biophys Res Commun 101: 1372-1380.
- Boutibonnes, P., Gillot, B., Auffray, Y., Thammavongs, B. (1991):** Heat shock induces thermotolerance and inhibition of lysis in a lysogenic strain of *Lactococcus lactis*. Int J Food Microbiol 14: 1-10.
- Bradford, M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.
- Brandts, J.F., Oliveira, R.J., Westort, C. (1970):** Thermodynamics of protein denaturation: Effects of pressure on denaturation of ribonuclease A. Biochemistry 9: 1038-1047.
- Broadbent, J.R., Lin, C. (1999):** Effect of Heat Shock or Cold Shock Treatment on the Resistance of *Lactococcus lactis* to Freezing and Lyophilization. Cryobiology 39: 88-102.
- Broadbent, J.R., Oberg, C.J., Wang, H., Wei, L. (1997):** Attributes of the heat shock response in three species of dairy *Lactobacillus*. System Appl Microbiol 20: 12-19.
- Broadbent, J.R., Oberg, C.J., Wei, L. (1998):** Characterization of the *Lactobacillus helveticus* *groESL* operon. Res Microbiol 149: 247-253.
- Broekman, J.H.F.F., Steenbakkens, J.F. (1973):** Growth in high osmotic medium of an unsaturated fatty acid auxotroph of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 116: 285-189.
- Buehler, L.K., Kusumoto, S., Zhang, H., Rosenbusch, J.P. (1991):** Plasticity of *Escherichia coli* porin channels dependence of their conductance on strain and lipid environment. J Biol Chem 266: 24446-24450.
- Byler, D.M., Susi, H. (1986):** Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted Fourier-transform IR spectra. Biopolymers 25: 469-487.
- Carrier, D., Mantsch, H.H., Wong, P.T.T. (1990):** Protective Effect of Lipid Surfaces against pressure-Induced Conformational Changes of Poly-(L)-Lysine. Biochemistry 29: 254-258.
- Casal, V., Gómez, R. (1999):** Effect of High Pressure on the Viability and Enzymatic Activity of Mesophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from Caprine Cheese. J Dairy Sci 82: 1092-1098.

- Cha, H.J., Srivastava, R., Vakharia, V.N., Rao, G., Bentley, W.E. (1999):** Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Stress Probe in Resting *Escherichia coli* Cells. *Appl Environ Microbiol* 65: 409-414.
- Chai, H.C., Jhon, M.S. (2000):** *Mol Simulat* 23: 257-274.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994):** Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 263: 802-805.
- Chatterjee, M.T., Khalawan, S.A., Curran, B.P.G. (2000):** Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology* 146: 877-884.
- Cheftel, J.-C. (1995):** Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sc Technol Int* 1, 75-90.
- Chi, E., Bartlett, D.H. (1993):** Use of a reporter gene to follow high pressure signal transduction in the deep-sea bacterium *Photobacterium* SS9. *J Bacteriol* 175: 7533-7540.
- Close, T.J., Rodriguez, R.L. (1982):** Construction and characterization of the chloramphenicol resistance gene cartridge: a new approach to the transcriptional mapping of extrachromosomal elements. *Gene* 20: 305-316.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S. (1996):** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- Daly, C. (1983):** The use of mesophilic cultures in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 297-312.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Fabian, H., Gast, K., Krober, R., Wieske, M., Zirwer, D. (2000):** Conversion of yeast phosphoglycerate kinase into amyloid-like structure. *Proteins* 39: 204-211.
- deAngelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P.S., Gobetti, M. (2001):** The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* 147: 1863-1873.
- 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.
- deMan, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960):** A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 23: 130-135.
- Deschamps, J.R., Miller, C.E., Ward, K.B. (1995):** Rapid Purification of Recombinant Green Fluorescent Protein Using the Hydrophobic Properties of an HPLC Size-Exclusion Column. *Protein Expr Purif* 6: 555-558.

- deVos, W.M., Simons, G.F.M. (1988):** Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* 70: 461-473.
- deVos, W.M., Simons, G.F.M. (1994):** Gene cloning and expression systems in lactococci. Gasson, M.J., deVos, W.M. [Hrsg.], *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK: 52-105.
- Dong, A, Randolph, T.W., Carpenter, J.F. (2000):** Entrapping intermediates of thermal aggregation in alpha-helical proteins with low concentration of guanidine hydrochloride. *J Biol Chem* 275, 27689-27693.
- Drews, O., Weiss, W., Reil, G., Parlar, H., Wait, R., Görg, A. (2002):** High pressure effects step -wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics* 2: 765-774.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J. (1999):** Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 21: 10-14.
- Duwat, P., Ehrlich, S.D., Gruss, A. (1995):** The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Mol Microbiol* 17: 1121-1131.
- Eaton, T., Shearman, C., Gasson, M. (1993):** The use of bacterial luciferase genes as reporter genes in *Lactococcus*: regulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lactose genes. *J Gen Microbiol* 139: 1495-1501.
- Edwards, K.A., Demsky, M., Montague, R.A., Weymouth, N., Kiehart, D.P. (1997):** GFP-Moesin illuminates actin cytoskeleton dynamics in living tissue and demonstrates cell shape changes during morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 191:103-117.
- 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.
- Fabian, H., Schultz, C., Naumann, D., Landt, O., Hahn, U., Saenger, W. (1993):** Secondary structure and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T-1 in aqueous solution: A Fourier transform infrared spectroscopic study. *J Mol Biol* 232: 967-981.

- Fradkov, A.F., Chen, Y., Ding, L., Barsova, E.V., Matz, M.V., Lukyanov, S.A. (2000):** Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Letters* 479: 127-130.
- Fraunfelder, H., Alberding, N.A., Ansari, A., Braunstein, D., Cowen, B.R., Hong, M.K., Iben, I.E.T., Johnson, J.B., Luck, S., Marden, M.C., Mourant, J.R., Ormos, P., Reinisch, L., Scholl, R., Schulte, A., Shyamsunder, E., Sorensen, L.B., Steinbach, P.J., Xie, A., Young, R.D., Yue, K.T. (1990):** Proteins and pressure. *J Phys Chem* 94: 1024-1037.
- Frees, D., Ingmer, H. (1999):** ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 31: 79-87.
- Fusi, P., Goossens, K., Consonni, R., Grisa, M., Puricelli, P., Vecchio, G., Vanoni, M., Zetta, L., Heremans, K., Tortora, P. (1997):** Extreme heat- and pressure-resistant 7-kDa protein P2 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is dramatically destabilized by a single-point amino acid substitution. *Proteins* 29: 381-390.
- Gänzle, M.G., Ehrmann, 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: 2616-2623.
- Gasson, M.J. (1983):** Plasmid Complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and Other Lactic Streptococci After Protoplast Induced Curing. *J Bacteriol* 154: 1-9.
- Gething, M.-J., Sambrook, J. (1992):** Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
- González, D., Sawyer, A., Ward, W.W. (1997):** Spectral perturbations of mutants of recombinant *Aequorea victoria* green-fluorescent protein (GFP). *Photochem Photobiol* 65: 21-22.
- Goossens, K., Smeller, L., Frank, J., Heremans, K. (1996):** Pressure-tuning the conformation of bovine pancreatic trypsin inhibitor studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur J Biochem* 236: 254-262.
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., Weiss, W. (1995):** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of the art and the controversy versus horizontal systems. *Electrophoresis* 16: 1079-1086.

- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000):** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W. (1999):** Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20: 712-717.
- Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldrige, K.K., Tsien, R.Y. (2000):** The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11990-11995.
- Groß, M., Jaenicke, R. (1994):** Proteins under pressure. *Eur J Biochem* 221, 617-630.
- 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., Kosmowsky, I.J., Lorenz, R., Molitoris, H.P., Jaenicke, R. (1994):** Response of bacteria and fungi to high-pressure stress as investigated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 15: 1559-1565.
- Groß, M., Lehle, K., Jaenicke, R., Nierhaus, K.H. (1993):** Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. *Eur J Biochem*, 218: 463-468.
- Hampton, R.Y., Koning, A., Wright, R., Rine, J. (1996):** In vivo examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 828-833.
- Haris, P.I., Chapman, D. (1995):** The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 37:251-263.
- Hartke, A., Bouché, S., Giard, J.-C., Benachour, A., Boutibonnes, Y.A. (1996):** The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr Microbiol* 33: 194-199.
- Hartke, A., Frère, J., Boutibonnes, P., Auffray, Y. (1997):** Differential Induction of the Chaperonin GroEL and the Co-Chaperonin GroES by Heat, Acid, and UV-Irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr Microbiol* 34: 23-26.
- Hawley, S.A. (1971):** Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry* 10: 2436-2442.

- Hawley, S.A., Meeleod, R.M. (1977):** The effect of base composition on the pressure stability of DNA in neutral salt solution. *Biopolymers*, 16: 1833-1835.
- Hecker, M. (1998):** Generelle Streßproteine und unspezifische Streßvorsorge in *Bacillus subtilis*. *Biospektrum* 4: 32-41.
- Herdegen, V., Vogel, R.F. (1999):** Mit Hochdruck konservieren. *Lebensmitteltechnik*, 10: 55-58.
- Heremans, K. (1992):** From living systems to biomolecules. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. [Hrsg.], *High Pressure and Biotechnology*, 224: 37-44.
- Heremans, K., Camp, J.V., Huyghebaert, A. (1997):** High-Pressure Effects on Proteins. Damodaran, S., Paraf, A. [Hrsg.]: *Food Proteins and their Applications*. 473-502.
- Heremans, K., Smeller, L. (1998):** Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim Biophys Acta* 138: 353-370.
- Hickey, M.W., Hillier, A.J., Jago, R (1986):** Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactococci. *Appl Environ Microbiol* 51: 825-831.
- Hite, B.H. (1899):** The effect of pressure in the preservation of milk. West Virginia Agricultural Experiment Station, Morgantown, Bulletin 58. 15-35.
- Holt, J.G. (1989):** Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Horwitz, J.P., Easwaran, C.V., Wolff, P.L. (1972):** Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. *Biochem Biophys Acta* 5: 206-214.
- 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: 957-965.
- Hummer, G., Garde, S., García, A.E., Paulaitis, M.E., Pratt, L.R. (1998):** The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1552-1555.
- 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.
- Ikegami, A., Nakasone, K., Kato, C., Nakamura, Y., Yoshikawa, I., Usami, R., Horikoshi, K. (2000):** Glutamine synthetase gene expression at elevated hydrostatic pressure in a deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*. *FEMS Microbiol Lett*, 192: 91-95.

- Ingmer, H., Vogensen, F.K., Hammer, K., Kistrup, M. (1999):** Disruption and Analysis of the *clpB*, *clpC*, *clpE* Genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a New Clp Family in Gram-Positive Bacteria. J Bacteriol 181: 2075-2083.
- Israelsen, H., Madsen, S.M., Vrang, A., Hansen, E.B., Johansen, E. (1995):** Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-*lacZ* integrants with the new promoter probe vector, pAK80. Appl Environ Microbiol 61: 2540-2547.
- Iwahashi, H., Fujii, S., Obuchi, K., Kaul, S., Sato, A., Komatsu, Y. (1993):** Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. FEMS Microbiol Lett 108: 53-58.
- 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. Hayashi, R. [Hrsg.], Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology: 239-246.
- Jackson, M., Mantsch, H.H. (1995):** Crit Rev Biochem Mol Biol 30: 95-120.
- Jaenicke, R. (1981):** Enzymes under extremes of physical conditions. Ann Rev Biophysics Bioengineering 10: 325-328.
- Jaenicke, R. (1983):** Biochemical Processes under High Hydrostatic Pressure. Naturwissenschaften 70: 332-341.
- Jaenicke, R. (1991):** Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. Eur J Biochem 202: 715-728.
- 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., Tylor, C.D. (1984):** Deep-sea microbiology. Ann Rev Microbiol 38: 487-514.
- Jimeno, J., Casey, M., Hofer, F. (1984):** The occurrence of β -galactosidase and β -phosphogalactosidase in lactobacillus casei strains. FEMS Microbiol Lett 25: 275-278.
- John, R.J.St., Carpenter, J.F., Randolph, T.W. (1999):** High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. Proc Natl Acad Sci USA 96: 13029-13033.

- 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.
- Kahana, J.A., Silver, P.A. (1996):** Use of the *A. victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics in vivo. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.E., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. [Hrsg.], *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, N.Y.: 9.6.13-9.16.19.
- Kato, C., Horikoshi, K. (1996):** Gene expression under high pressure. Hayashi, R., Balny, C. [Hrsg.], *High Pressure and Biotechnology* 13: 59-66.
- 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, C., Li, L., Tamegai, H., Smorawinska, M., Horikoshi, K. (1997a):** A pressure-regulated gene cluster in deep-sea adapted bacteria with reference to its distribution. *Recent Res Devel in Agricultural & Biological Chem* 1: 25-32.
- 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., Smorawinska, M., Li, L., Horikoshi, K. (1997b):** Comparison of the Gene Expression of Aspartate b-D-Semialdehyde Dehydrogenase at Elevated Hydrostatic Pressure in Deep-Sea Bacteria. *J Biochem* 121: 717-723.
- Kato, C., Smorawinska, M., Sato, T., Horikoshi, K. (1995):** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a pressure-regulated promoter region from a barophilic bacterium, strain DB6705. *J Mar Biotechnol* 2: 125-129.
- Kato, C., Smorawinska, M., Sato, T., Horikoshi, K. (1996a):** Analysis of a Pressure-regulated Operon from the Barophilic bacterium Strain DB6705. *Biosci Biotech Biochem* 60: 166-168.
- Kato, C., Tamegai, H., Ikegami, A., Usami, R., Horikoshi, K. (1996b):** Open reading Frame 3 of the Barotolerant Bacterium Strain DSS12 Is Complementary with *cydD* in *Escherichia coli*: *cydD* Functions are Required for Cell Stability at High Pressure. *J Biochem* 120: 301-305.

- Kavecansky, J., Dannenberg, A.J., Zakim, D. (1992):** Effects of High Pressure on the Catalytic and Regulatory Properties of UDP-Glucuronosyltransferase in Intact Microsomes. *Biochemistry* 31: 162-168.
- Kendrick, B.S., Cleland, J.L., Lam, X., Nguyen, T., Randolph, T.W., Manning, M.C., Carpenter, J.F. (1998):** Aggregation of recombinant human interferon gamma: Kinetics and structural transitions. *J Pharm Sci* 87: 1069-1076.
- 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: 1826-1837.
- Kline, L., Sugihara, T.F. (1971):** Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process. *Appl Microbiol* 21: 459-465.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., Verkman, A.S. (1998):** Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Intracellular pH Indicator. *Biophys J* 74: 1591-1599.
- 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. Hayashi, R. [Hrsg.], *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*: 287-294.
- Krämer, J. (1992):** *Lebensmittelmikrobiologie*. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leonardo, M.R., Cunningham, P.R., Clark, D.P. (1993):** Anaerobic regulation of the *adhE* gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 870-878.
- Lewis, P.J., Errington, J. (1996):** Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 142: 733-740.
- Lim, E.M., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2000):** Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* 21: 2557-2561.
- Ludwig, H., Bieler, C., Hallbauer, K., Scigalla, W. (1992):** Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. [Hrsg.], *High Pressure and Biotechnology* 224: 25-32.

- Macdonald, A.G., Martinac, B. (1999):** Effect of high hydrostatic pressure on the porin OmpC from *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 173: 327-334.
- Mackey, B.M., Forestière, K., Isaacs, N.S., Stenning, R., Brooker, B. (1994):** The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. Lett Appl Microbiol 19: 429-432.
- Marmur, J. (1961):** A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. J Mol Biol 3: 208-218.
- Marteinsson, V.T., Reysenbach, A.-L., Birrien, J.-L., Prieur, D. (1999):** A stress protein is induced in the deep-sea barophilic hyperthermophile *Thermococcus barophilus* when grown under atmospheric pressure. Extremophiles 3: 277-282.
- Masson, P., Arciero, D., Hooper, A.B., Balny, C. (1990):** Electrophoresis at elevated hydrostatic pressure of the multiheme hydroxylamine oxidoreductase. Electrophoresis 11: 128-132.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A. (1999):** Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nature Biotechnol 17: 969-973.
- Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H. (1981):** Ultrasensitive stain of proteins in polyacrylamid gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211: 1437-1438.
- Miyazawa, T., Blout, E.R. (1961):** The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands. J Am Chem Soc 5: 712-719.
- Michel-Beyerle, (1987):** Electron transfer in bacterial photosynthesis and bridged donor-acceptor systems. Photochemistry and Photobiology 45: 43
- Miller, K.J. (1986):** Effects of monovalent and divalent salts on the phospholipid and fatty acid compositions of a halotolerant *Planococcus sp.*. Appl Environ Microbiol 52: 580-582.
- Misteli, T., Spector, D.L. (1997):** Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nature Biotechnol 15: 961-364.
- Molina-Gutierrez, A., Stippl, 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.

- Morbild, E. (1981):** The theory of pressure effects on enzymes. *Advances in Protein Chemistry* 34, 93-166.
- Nakashima, K., Horikoshi, K., Mizuno, T. (1995):** Effect of hydrostatic pressure on the synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnol Biochem* 59: 130-132.
- Neidhardt, F.V., VanBogelen, R.A. (1987):** *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington.
- Neuhoff, V., Arnaold, N, Taube, D., Ehrhardt, W. (1988):** Improved staining of proteins in polyacrylamid gels including isoelectric focusing gels with clear background an nanogramm sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G 250 and R 250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- Neumann, Jr.R.C., Kauzmann, W., Zipp, A. (1973):** Pressure Dependence of Weak Acid Ionization in Aqueous Buffers. *J Physical Chem* 77: 2687-2691.
- Newton, C.R., Graham, A. (1994):** Introduction to Biotechniques Series: PCR. BIOS Scientific Publishers Ltd., St. Thomas House, Becket Street, Oxford, England: xii+161p
- Niven, G.W., Miles, C.A., Mackey, B.M. (1999):** The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an *in vivo* study using differential scanning calorimetry. *Microbiology* 145: 419-425.
- Noma, S., Hayakawa, I. (2002):** Barotolerance of staphylococcus aureus is increased by incubation at below 0 °C prior to hydrostatic pressure treatment. *Int J Food Microbiol* 2463: 573-577.
- Novitsky, Morita (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.
- O'Sullivan, E., Condon, S. (1997):** Intracellular pH Is a Major Factor in the Induction of Tolerance to Acid and Other Stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 63: 4210-4215.
- Odani, M., Shimizu, H., Komatsu, Y., Iwahashi, H. (2002):** Responses of growing yeast cells in the hydrostatic pressure status monitoring by DNA microarray. Hayashi, R. [Hrsg.], *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*: 247-252.
- Ogata, R., Gilbert, W. (1979):** DNA binding site of lac repression probed by dimethylsulfate methylation of the lac operator. *J Mol Biol* 132: 709-728.

- Ogawa, H., Fukuhisa, K., Kubo, Y., Fukumoto, H. (1990):** Pressure inactivation of yeast, molds, and pectinesterases in Satsuma mandarin juice: Effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation. *Agri Biol Chem* 54: 1219-1225.
- Ogawa, H., Fukuhisa, K., Fukumoto, H. (1992):** Effect of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of citrus juice. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. [Hrsg.], *High Pressure and Biotechnology* 224: 269-277.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996):** Crystal Structure of the *Aequoria* Green Fluorescent Protein. *Science* 273: 1392-1395.
- Orr, N., Yavin, E., Shinitzky, M., Lester, D.S. (1990):** Application of High Pressure to Subfractionate Membrane Protein-Lipid Complexes: A Case Study of Protein Kinase C. *Anal Biochemistry* 191: 80-85.
- Owen, B.B., Brinkley, S.R. (1941):** *Chem Rev* 29: 461-474.
- Oxen, P., Knorr, D. (1993):** Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 26: 220-223.
- Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J. (1997):** Effects of Several Factors on the Heat-Shock-Induced Thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3225-3232.
- Pagán, R., Mackay, 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.
- Pande, C., Wishnia, A. (1986):** Pressure Dependence of Equilibria and Kinetics of *Escherichia coli* Ribosomal Subunit Association. *J Biological Chem* 261: 6272-6278.
- Panick, G., Malessa, R., Winter, R., Rapp, G., Freye, K.J., Royer, C.A. (1998):** Structural characterization of the pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of staphylococcal nuclease by synchrotron small-angle X-ray scattering and Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Mol Biol* 275:389-402.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., Piston, D.W. (1997):** Use of green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysics J* 73: 2782-2790.
- Piper, P.W. (1993):** Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 11: 339-355.

- Platteeuw, C., Somins, G., deVos, W.M. (1994):** Use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 60: 587-593.
- Plautz, J., Day, R.N., Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpain, S., Kay, S.A. (1996):** Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* 173: 83-87.
- Pope, D.M., Berger, L.R. (1973):** Inhibition of metabolism by hydrostatic pressure: what limits microbial growth?. *Arch Microbiol* 93: 367-370.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., Silhavy, T.J. (1996):** From acids to *osmZ*: Multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 20, 911-917.
- Putzer, H., Grunberg-Manago, M., Springer, M. (1995):** Bacterial Aminoacyl-tRNA Synthetases: Genes and Regulation of Expression. Söll, D., RajBhandary, U.L. [Hrsg.], tRNA - Structure, Biosynthesis, and Function, ASM Press, Washington.
- 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.
- Rahmelow, K, Hübner, W., Ackermann, T. (1998):** Infrared absorbances of protein side chains. *Anal Biochem* 275: 1-11.
- Rallu, F., Gruss, A., Maguin, E. (1996):** *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 243-251.
- Randers-Eichhorn, L., Albano, C.R., Sipior, J., Bentley, W.E., Rao, G. (1997):** On-Line Green Fluorescent Protein Sensor with LED Excitation. *Biotechnol Bioeng* 55: 921-926.
- Rao, B., Kemple, M., Prendergast, F. (1980):** Proton nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopic studies of segmental mobility in aequorin and a green fluorescent protein from *Aequorea forskalea*. *Biophys J* 32: 630-632.
- Reysenbach, A.-L., Deming, J.W. (1991):** Effects of Hydrostatic Pressure on Growth of Hyperthermophilic Archaeobacteria from Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol* 57: 1271-1274.

- 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.
- Rosenberg (1987):** Efficient expression and purification of recombinant gene products. *J Cellular Biochem, Supplement* 11 PART C: 171.
- Russel, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A., Abee, T. (1995):** Membranes as a target for stress adaptation. *Int J Food Microbiol* 28: 255-261.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G., Kok, J. (1998):** A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol Microbiol* 27: 299-310.
- Sanders, J.W., Venema, G., Kok, J. (1999):** Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 23: 483-501.
- Sandroff, C.J., King Jr., H.E., Herschbach, D.R. (1984):** High-pressure study of the liquid/solid interface: surface-enhanced Raman scattering from adsorbed molecules. *J Phys Chem* 88: 5647-5653.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 293: 487-491.
- Samuel, D., Kumar, T.K.S., Srimathi, T., Hsieh, H., Yu, C.J. (2000):** Identification and Characterization of an Equilibrium Intermediate in the Unfolding Pathway of an All β -Barrel Protein. *J Biol Chem* 275: 34968-34975.
- 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., 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. Hayashi, R. [Hrsg.], *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*: 233-238.
- 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.

- Schaffer, S., Isci, N., Zickner, B., Dürre, P. (2002):** Changes in protein synthesis and identification of proteins specifically induced during solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Electrophoresis* 23: 110-121.
- Schlegel, H.G. (1992):** Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmid, R., Bernhardt, J., Antelmann, H., Völker, A., Mach, H., Völker, U., Hecker, M. (1997):** Identification of vegetative proteins for a two-dimensional protein index of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 143: 991-998.
- 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.
- Schwarz D. and J. R. Beckwith (1970):** Mutants missing a factor necessary for expression of catabolite-sensitive operons in *E. coli*. Beckwith, J.R., Zioser, D. [Hrsg.], The lactose operon. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbour, N.Y.: 417-422.
- Schwarz, J.R., Landau, J.V. (1972):** Hydrostatic Pressure Effects on *Escherichia coli*: Site of Inhibition of Protein Synthesis. *J Bacteriol* 109: 945-948.
- Sengupta, P., Chou, J.H., Bargmann, C.I. (1996):** *odr-10* encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* 84: 899-909.
- Sharpe, M.E., Errington, J. (1996):** The *Bacillus subtilis* *soj-spo0J* locus is required for a centromere-like function involved in prespore chromosome partitioning. *Mol Microbiol* 21: 501-509.
- Silva, J.L., Silveira, C.F., Correia, A., Pontes, L. (1992):** Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor. *J Mol Biol* 223: 545-555.
- Silva, J.L., Weber, G. (1993):** Pressure Stability of Proteins. *Annu Rev Phys Chem* 44: 89-113.
- Simons, G.H., Buys, H., Hoger, R., Koenhen, E., deVos, W.M. (1990):** Construction of a promoter-probe vector for lactic acid bacteria using the *lacG* gene of *Lactococcus lactis*. *J Int Microbiol* 31: 31-39.
- Smeller, L., Rubens, P., Heremans, K. (1999):** Pressure Effect on the Temperature-Induced Unfolding and Tendency to Aggregate of Myoglobin. *Biochemistry* 38: 3816-3820.
- Soares, T.A., Goodsell, D.S., Briggs, J.M., Ferreira, R. Olson, A.J. (1999):** Docking of 4-oxalocronate tautomerase substrates: implications for the catalytic mechanism. *Biopolymers* 50: 319-328.

- Somero, G.N. (1992):** Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annu Rev Physiol* 54: 557-577.
- Sonoike, K., Setoyama, T., Kuma, Y., Kobayashi, S. (1992):** Effect of pressure and temperature on the death rates of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. [Hrsg.], *High Pressure and Biotechnology*, 224: 297-301.
- Spicher, G. (1982):** Einige Aspekte der Biologie der Sauerteiggärung. *Getreide Mehl und Brot* 36: 12-16.
- Stenz, R., Zagorec, M. (1999):** Ribose utilization in *Lactobacillus sakei*: analysis of the regulation of the *rbs* operon and putative involvement of a new transporter. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 165-173.
- Studel, U.L. (2001):** Physiologische und molekulare Charakterisierung der Stressantwort von *Lactobacillus pontis* und *Lactobacillus sanfranciscensis*. Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan.
- Stolz, P. (1995):** Untersuchungen des Maltosemetabolismus von Laktobazillen aus Sauerteig. Dissertation Universität Hohenheim, Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Stolz, P., Böcker, G., Vogel, R.F., Hammes, W.P. (1995):** Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiol Lett* 109: 237-243.
- Storz, G., Hengge-Aronis, R. (2000):** Bacterial Stress Responses. ASM-Press, Washington DC.
- Stoschek, C.M. (1990):** Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-89.
- Stryer, L. (1994):** Biochemie. Spektrum Akad Verlag, Heidelberg.
- 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.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., Chapman, D. (1993):** Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry* 32: 389-394.
- Switzer, R.C., Merril, C.R., Shifrin, S. (1979):** A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 98: 231-237.

- 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. Hayashi, R., Balny, C. [Hrsg.], High Pressure Bioscience and Biotechnology 13: 79-82.
- 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.
- 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.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E. (1975):** Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. Appl Microbiol 29: 807-813.
- Tsien, R.Y. (1998):** The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 67: 509-544.
- Ulmer, H.M., Herberhold, H., Fahsel, S., Gänzle, M.G., Winter, R., Vogel, R.F. (2002):** 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.
- van Asseldonk, M., Simons, A., Visser, H., de Vos, W.M., Simons, G. (1993):** Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis dnaJ* gene. J Bacteriol 175: 1637-1644.
- van der Vossen, J.M.B.M., Kok, J., Venema, G. (1985):** Construction of cloning, promoter-screening, and terminator-screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 50: 540-542.
- vanThor, J.J., Pierik, A.J., Nugteren-Roodzant, I., Xie, A., Hellingwerf, K.J. (1998):** Characterization of the Photoconversion of Green Fluorescent Protein with FTIR Spectroscopy. Biochemistry 37: 16915-16921.
- Vogel, R.F., Knorr, R., Müller, M.R.A., Steudel, U., Gänzle, M.G., Ehrmann, M.A. (1999):** Non-dairy lactic fermentations: The cereal world. Antonie van Leeuwenhoek 76: 403-411.

- Ward, W.W. (1981):** Properties of the coelenterate green-fluorescent proteins. DeLuca, M., McElroy, D.W. [Hrsg.], Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications. Academic Press, New York: 235-242.
- Ward, W.W., Bokman, S.H. (1982):** Reversible Denaturation of *Aequorea* Green-Fluorescent Protein: Physical Separation and Characterization of the Renatured Protein. *Biochemistry* 21: 4535-4540.
- Ward, W.W., Pretince, H., Roth, A.F., Cody, C.W., Reeves, S.C. (1982):** Spectral Perturbations of the *Aequorea* Green-Fluorescent Protein. *Photochem Photobiol* 35: 803-808.
- Waterfield, N.R., LePage, R.W.F., Wilson, P.W., Wells, J.M. (1995):** The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*. *Gene* 165: 9-15.
- Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C. (1968):** Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 243: 4543-4555.
- 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., 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: 1408-1412.
- Wong, P.T.T. (1987):** High Pressure Vibrational Spectroscopy of Aqueous Systems: Phospholipid dispersions and Proteins. Jannasch, H.W., Marquis, R.E., Zimmermann, A.M. [Hrsg.], *Current Perspectives in High Pressure Biology*: 287-314.
- Wong, P.T.T., Moffat, D.J. (1989):** A New Internal Pressure Calibrant for High-Pressure Infrared Spectroscopy of Aqueous Systems. *Appl Spectrosc* 43: 1279-1281.
- Woodson, K., Devine, K.M. (1994):** Analysis of a ribose transport operon from *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140: 1829-1828.

- Wouters, J.A., Sanders, J.-W., Kok, J., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T. (1998a):** Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology* 144: 2885-2893.
- Wouters, P.C., Glaasker, E., Smelt, J.P.P.M. (1998b):** Effects of High Pressure on Inactivation Kinetics and Events Related to Proton Efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 64: 509-514.
- Wroblowski, B., Diaz, J.F., Heremans, K., Engelborghs, Y. (1996):** Molecular mechanisms of pressure induced conformational changes in BPTI. *Proteins* 25: 446-455.
- Yakhnin, A.V., Vinokurov, L.M., Surin, A.K., Alakhov, Y.B. (1998):** Green Fluorescent Protein Purification by Organic Extraction. *Protein Expr Purif* 14: 382-386.
- Yang, F., Moss, L.G., Phillips, Jr.G.N. (1996):** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* 14: 1246-1251.
- Yayanos, A.A. (1986):** Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 9543-9546.
- Yayanos, A.A. (1998):** Empirical and theoretical aspects of life at high pressure in the deep sea. Horikoshi, K., Grant, W.D. [Hrsg.], *Extremophiles-Microbiological Life in Extreme Environments*: 47-92.
- 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.
- Zakin, M.R., Hersbach, D.R. (1986):** Vibrational frequency shifts induced by molecular compression of pyridine in solution. *J Chem Phys* 85: 2376-2383.
- Zipp, A., Kauzmann, W. (1973):** Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry* 12: 4217-4228.
- Zobell, C.E. (1970):** Pressure effects on morphology and life processes of bacteria. Zimmermann, A. [Hrsg.], *High pressure effects on cellular processes*: 85-130.
- Zobell, C.E., Cobet, A.B. (1963):** Filament formation by *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J Bacteriol* 87: 710-719.

CURRICULUM VITAE

Carsten Heiko Scheyhing

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 17. Januar 1973
Geburtsort: Landshut
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

von/ bis

1979 - 1983: Grundschule Furth
1983 - 1988: Maristengymnasium Furth
1988 - 1992: Hans-Leinberger-Gymnasium Landshut mit Abschluß Abitur
1992 - 1998: Studium der Fachrichtung Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel an der Technischen Universität München - Weihenstephan mit Abschluß Diplom Ingenieur
1993 - 1994: Wehrdienst
1999 - 2002: Promotion am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München

BERUFSERFABUNG UND TÄTIGKEIT

von/ bis

Juli 1992 - Oktober 1992: Praktikum Brauerei C. Wittmann GmbH & Co. KG, Landshut
März 1998- Januar 1999: Assistent Einkauf Ingredienzen bei Danone GmbH, München
Diplomarbeit: Einfluß komplexer Nährmedienzusätze auf das Wachstum von *Lactobacillus plantarum* TMW1.25 und dessen Produktion von Plantaricin1.25 unter pH-kontrollierten Bedingungen
Promotion: Hochdruckinduzierte Genexpression bei Bakterien
