

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

**Genexpression und -regulation bei *Lactobacillus
sanfranciscensis* unter subletalem Hochdruck**

Melanie Pavlovic

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr.Ing. habil. Werner Back

1. Prüfer: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

2. Prüfer: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Schleifer

Die Dissertation wurde am 08.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 27.04.2006 angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes „Einfluss von Hochdruck auf molekulare und zelluläre Systeme in Lebensmitteln“ (Förderungsnummer:358-2). Die Partialsequenzierung des Genoms von *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451^T wurde von der Ernst Böcker GmbH (Minden) finanziert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel für die Möglichkeit diese Doktorarbeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie durchzuführen und seine vielseitigen Anregungen.

Herrn PD Dr. Matthias Ehrmann danke ich herzlichst für sein Engagement während dieser Doktorarbeit, für seine Zeit für Diskussionen, seine Geduld mir die Molekularbiologie näher zu bringen, seine Offenheit für und seine Unterstützung bei der Umsetzung neuer Ideen.

Sebastian Hörmann sei Dank für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit während unserer Doktorarbeiten, die ich mir nicht idealer vorstellen kann.

Weiterhin danke ich Dr. Maher Korakli für sein stets offenes Ohr, Frau Dr. Uta von Rad (GSF) für ihre Unterstützung bei den Mikroarray-Experimenten, Stefanie Rubenwolf für ihre Projektarbeit zur Cobalaminbiosynthese, Clarissa Schwab für die Hilfe bei den 2-D-Gelen und Herrn Dr. Thomas Rattei (Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, TUM) für die Auswertung der Daten der Partialsequenzierung des Genoms.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen anderen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie, ganz besonders Monika Hadek und Angela Seppeur, für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen
Abkürzungen Gene
Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Hochdruck..... 1

1.1.1 Leben unter extremen hydrostatischen Drücken-Die Tiefsee 1

1.1.2 Anwendung von Hochdruck in der Lebensmittelindustrie..... 2

1.1.3 molekulare Effekte von Hochdruck auf Mikroorganismen 3

1.1.3.1 Allgemeine Prinzipien und Auswirkungen auf Mikroorganismen 3

1.1.3.2 Genexpression- und -regulation unter Hochdruck 5

1.1.3.3 Charakterisierung piezotoleranter/ -resistenter Mutanten 7

1.1.4 mögliche Hochdrucksensoren piezosensitiver Bakterien 9

1.2 Molekulare Chaperone und *Trans*-Translation 9

1.2.1 Molekulare Chaperone 9

1.2.2 *Trans*-Translation 11

1.3 IS-Elemente 13

1.4 *Lactobacillus sanfranciscensis*: charakterisierte Stressreaktionen 15

1.5 Ziele der Arbeit..... 16

2 Materialien und Methoden 18

2.1 Materialien 18

2.1.1 Chemikalien 18

2.1.2 Organismen und Plasmide..... 18

2.1.3 Oligonukleotide 20

2.1.4 Medien..... 24

2.1.4.1 Magnesium-Mangan-Stamm-Lösung 24

2.1.4.2 Nährmedien..... 24

2.1.4.3 Antibiotika/Zusätze für Selektionsmedien 25

2.2 mikrobiologische Methoden 26

2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung 26

2.2.2 Keimzahlbestimmung..... 26

2.2.3 Messen der optischen Dichte..... 26

2.3 molekularbiologische Methoden 26

2.3.1 Ethanol-fällung von DNA 26

2.3.2 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligationen..... 27

2.3.3 Herstellen kompetenter Zellen 27

2.3.3.1 Herstellen chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen und Transformation 27

2.3.3.2 Herstellen elektrokompenter *E.coli*-Zellen und Transformation 27

2.3.3.3 Herstellen elektrokompenter *L. sanfranciscensis*-Zellen 28

2.3.4 Isolieren von Nukleinsäuren..... 28

2.3.4.1 DNA-Isolierung aus *L. sanfranciscensis* 28

2.3.4.2 RNA-Isolierung aus *L. sanfranciscensis*..... 29

2.3.4.3 Plasmidisolierung..... 29

INHALTSVERZEICHNIS

2.3.4.3.1	Alkalische Lyse und Ethanol-fällung	29
2.3.4.3.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> mit kommerziellen Kits.....	30
2.3.5	DNA und RNA Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung	30
2.3.6	Polymerasekettenreaktion	30
2.3.6.1	Standard-PCR und High-fidelity-PCR.....	30
2.3.6.2	Inverse-PCR.....	31
2.3.7	Auftrennung von Nukleinsäuren	32
2.3.7.1	Native Agarose-Gelelektrophorese	32
2.3.7.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	32
2.3.8	Real-Time-PCR.....	33
2.3.9	Southern und Northern Blots.....	34
2.3.9.1	Markieren der Sonden.....	34
2.3.9.2	Southern Blots.....	35
2.3.9.3	Kapillarblot	35
2.3.9.4	Hybridisierung	36
2.3.9.5	Immunologischer Nachweis.....	36
2.3.9.6	Stripping.....	37
2.3.9.7	Northern Blots.....	37
2.4	Proteinanalytische Methoden.....	37
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)	37
2.4.2	2D-Gelelektrophorese	38
2.4.2.1	Probenvorbereitung	38
2.4.2.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	38
2.4.2.3	Äquillibrierung und Auftrennung nach Molekulargewicht.....	39
2.4.2.4	Silberfärbung [Blum et al, 1987, modifiziert].....	40
2.5	shot-gun Genomsequenzierung.....	41
2.5.1	Anzahl der notwendigen Klone/ Erforderliche Insertlänge	41
2.5.2	Anlegen der Genbank.....	41
2.5.3	Sequenzierung	42
2.5.4	Auswertung der Sequenzen.....	42
2.6	Hochdruckbehandlung	42
2.7	Mikroarray Produktion.....	42
2.7.1	Herstellen der zu spottenden Proben	44
2.7.2	Screening-Array	44
2.7.3	Verifizierungsarray.....	44
2.7.4	Übertragen der PCR-Produkte auf silanierte Glaträger und Immobilisierung.....	45
2.8	Mikroarray-Analyse.....	45
2.8.1	Herstellen der Sonden	45
2.8.1.1	mRNA-Isolierungsbedingungen	45
2.8.1.2	Fluoreszenzmarkierung der Sonde.....	46
2.8.2	Hybridisierung der Mikroarrays.....	46
2.8.3	Einlesen der DNA-Mikroarrays und Auswertung.....	47
2.8.4	Verifizierung	48
2.9	Referenzgenbestimmung	48
2.10	Einfluss von mRNA-Stabilität auf die Genexpression unter Hochdruck	48
2.10.1	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Rifampicinkonzentration.....	48
2.10.2	Wirkung von Rifampicin unter Hochdruck.....	49
2.10.3	Versuchsdurchführung	49
2.11	Charakterisierung der Hochdruckmutante.....	50

INHALTSVERZEICHNIS

2.11.1	Erzeugen der Hochdruckmutante	50
2.11.2	Isolieren der Streptomycinresistenten Mutante	50
2.11.3	Wachstum unter Hochdruck.....	50
2.11.4	Abtötungskinetik	50
2.11.5	Wachstum bei Magnesium-Mangan-Limitierung	51
2.11.6	Temperaturabhängiges Wachstum	51
2.11.7	Empfindlichkeitstests gegenüber Antibiotika.....	51
2.11.8	Versuchsbedingungen für 2D-Gele	52
2.11.9	Sequenzieren der 16S-Operons	52
2.11.10	Ableiten der tmRNA-Sequenz	52
2.11.11	Quantifizierung der tmRNA-Induktion.....	52
2.12	Vitamin-B12-Biosynthese	53
2.12.1	Test auf Wachstum in modifizierten Vitamin-B12-freiem-Medium.....	53
2.12.2	Vitamin-B12-Bioassay	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Genomsequenzierung.....	54
3.1.1	Sequenzierung	54
3.1.2	Gengehalt	54
3.1.3	Regulatoren	55
3.1.4	Proteolyse.....	56
3.1.5	Adaptation an Stress.....	56
3.1.6	Vermutliche Adhensionsfaktoren.....	57
3.1.7	RNAs	57
3.1.7.1	rRNAs	57
3.1.7.2	tRNAs und 10S RNA (<i>ssrA</i>)	58
3.1.8	IS-Elemente, Transposasen und Prophagen	59
3.1.8.1	Codon-Usage.....	60
3.2	Charakterisierung einzelner Gene.....	61
3.2.1	Vitamin-B12-Biosynthese	61
3.2.2	Charakterisierung von IS <i>LsfI</i>	64
3.2.2.1	Einordnung von IS <i>LsfI</i> in die IS30-Familie.....	64
3.2.2.2	Ort der IS <i>LsfI</i> -Insertion und Transposaseaktivität.....	67
3.2.2.3	Vorkommen von IS <i>LsfI</i>	68
3.3	Einfluss von Hochdruck auf das Transkriptom	71
3.3.1	Identifizierung eines nichtdruckregulierten Referenzgens	71
3.3.2	Optimierung der Versuchsbedingungen	72
3.3.3	Auswertung der Mikroarrays	73
3.3.4	Einfluss der mRNA-Stabilität auf hochdrucksensitive Genexpression.....	77
3.3.5	Vergleich von subletalen Hochdruck und Hitzeschock.....	77
3.4	Charakterisierung der Hochdruckmutante.....	81
3.4.1	Druckabhängiges Wachstum und Druckresistenz	82
3.4.2	Temperaturabhängiges Wachstum	84
3.4.3	2-D-Gele für Wildtyp und Hochdruckmutante bei 80 MPa	85
3.4.4	Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika	87
3.4.5	<i>ssrA</i> Sequenz von <i>L. sanfranciscensis</i> DSM 20451 ^T	89
3.4.6	Induktion der tmRNA.....	90
3.4.7	Untersuchung weiterer Gene, in denen Mutationen wahrscheinlich sind	91
3.5	Aktivierung von IS-Elementen und Transposasen durch Hochdruck.....	93
3.5.1	Induktion der Transkription von IS-Elementen durch Hochdruck.....	93

3.5.2	Hochdruck begünstigt IS-Element vermittelte chromosomale Umstellungen	94
3.5.3	Charakterisierung von ISLsf6 und Insertionsstellen	97
4	Diskussion.....	100
4.1	Genomsequenzierung.....	100
4.2	Charakterisierung einzelner Gene.....	103
4.2.1	Vitamin-B ₁₂ -Biosynthese	103
4.2.2	ISLsf1	104
4.3	Einfluss von Hochdruck auf das Transkriptom	106
4.3.1	Bewertung des Mikroarrays	106
4.3.2	Identifizierung eines nichtdruckregulierten Gens	107
4.3.3	Hochdruckeffekte auf ribosomale Prozesse	108
4.3.3.1	Regulation von Translationsfaktoren	108
4.3.3.2	Regulation der Translationsgenauigkeit.....	109
4.3.3.3	Stressproteine.....	110
4.3.3.4	Zusammenfassung: Auswirkung auf ribosomale Prozesse	111
4.3.4	GTPasen und andere druckregulierte Gene.....	112
4.3.5	Vergleich mit den Proteomdaten.....	112
4.3.6	Einfluss der mRNA-Stabilität auf die Genexpression unter Hochdruck.....	113
4.4	Charakterisierung der Hochdruckmutante.....	115
4.4.1	Wachstumscharakteristika.....	115
4.4.2	2D-Gele bei 80 MPa/ 30 min	116
4.4.3	Empfindlichkeiten gegenüber Antibiotika	116
4.4.4	Funktion falschgefalteter Proteine in der Reaktion auf Hochdruckstress	117
4.4.5	Funktion der tmRNA in der Reaktion auf Hochdruckstress	117
4.5	Aktivierung transposabler Elemente durch Hochdruck	120
4.5.1	Induktion der Transkription.....	120
4.5.2	ISLsf6	120
4.5.3	chromosomale Umordnung	121
4.5.4	Ausblick	124
5	Zusammenfassung.....	125
6	Literaturverzeichnis	127
7	Anhang.....	141
7.1	Funktionelle Klassifizierung der bisher (an)sequenzierten Gene.....	141
7.2	Sequenzdaten	162
7.2.1	Cobyrinsäure-Synthase.....	162
7.2.2	Tetrapyrrolmethylase	163
7.2.3	AC-Nummern.....	163
7.3	Alignment sequenzierter 16S-Operons in <i>L. sanfranciscensis</i> DSM 20451^T ...	165
7.4	Alignment 16S rDNA-Sequenzen der Hochdruckmutante	168
7.5	Biosynthese von Cobalamin.....	179

ABKÜRZUNGEN

$A_{x\text{ nm}}$	Absorption bei x nm	Rbs	Ribosomenbindestelle
aa-dUTP	Aminoallyl dUTP	rRNA	ribosomale RNA
aa-tRNA	Aminoacyl-tRNA	RFLP	Restriktionsfragmentlängen- polymorphismus
AC	Akzessionsnummer		
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	$OD_{x\text{ nm}}$	optische Dichte bei x nm
ÄP	Äquilibrierungspuffer	ORF	offener Leserahmen
bidest.	bidestilliert	SAP	alkalische Phosphatase aus Garnelen
BLAST	Biological Local Alignment Search Tool	SDS	Natriumdodecylsulfat
BSA	Rinderserumalbumin	SSC	Natriumcitrat
bp	Basenpaare	aa-tRNA	aminoacyl-tRNA
Clp	Kaseinolytische Protease	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
COG	Cluster of Orthologous groups	TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
CIRCE	controlling inverted repeat of chaperone expression	TE	Tris-EDTA
DEPC	Diethylpyrocarbonat	T	Temperatur
dest.	destilliert	TMW	Technische Mikrobiologie Weihenstephan
DIG	Digoxigenin	U	units
DSC	Differential scanning calorimetry	UE	Untereinheit
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen	V	Volt
dNTP	Desoxyribonukleotide	v/v	Volumen pro Volumen
DMSO	Dimethylsulfoxid	VB ₁₂ AM	Vitamin-B ₁₂ -Assay-Medium
DR	direct repeat	m VB ₁₂ AM	modifiziertes VB ₁₂ AM
DTT	Dithiothreitol	Vol	Volumen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	W	Watt
EF	Elongationsfaktoren	w/v	Gewicht pro Volumen
GTP	Guanosintriphosphat	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl -D-β-galactopyranosidase
h	Stunde		
HHP	hoher hydrostatischer Druck		
IEF	isoelektrische Fokussierung		
IPG	immobilisierter pH-Gradient		
IPTG	Isopropylthiogalaktosid		
IR	inverted repeat		
IRL	linkes inverted repeat		
IRR	rechtes inverted repeat		
IS	Insertionssequenz		
Kb	Kilobasen		
KBE	koloniebildende Einheiten		
kVh	Kilovoltstunden		
M	Molar		
mA	Milliamper		
Mbp	Megabasenpaare		
Mg-Mn	Magnesium-Mangan		
MIC	minimale inhibitorische Konzentration		
min	Minute		
ml	Milliliter		
mm	Millimeter		
mM	Millimolar		
MOPS	3-(N-morpholino)- propansulfonsäure		
MPa	Mega-Pascal		
pI	isoelektrischer Punkt		

ABKÜRZUNGEN GENE

<i>aggH</i>	Autoaggregation vermittelndes Protein	<i>oxyR</i>	Transkriptionsregulator bei oxidativen Stress
<i>apfI</i>	Aggregationsfördernder Faktor	<i>pepC</i>	Cysteinaminopeptidase
<i>clpB</i>	ATP-abhängige Clp-Protease, ATP-bindende Untereinheit	<i>pepI</i>	Prolylaminopeptidase
<i>clpC</i>	ATP-abhängige Clp-Protease, ATP-bindende Untereinheit	<i>pepN</i>	Membran-Alanin-Aminopeptidase
<i>clpL</i>	ATP-abhängige Clp-Protease, ATP-bindende Untereinheit	<i>pepO</i>	Endopeptidase
<i>ctsR</i>	Transkriptionsrepressor von Klasse III Hitzestressgenen	<i>pepR</i>	Prolylaminopeptidase
<i>cobQ</i>	Cobyrinsäuresynthase	<i>pepT</i>	Tripeptidase
<i>dacA</i>	D-Ala-D-Ala Carboxypeptidase, Serin-Typ	<i>pepV</i>	vermutliche Aminosäure-permease/ Dipeptidase
<i>dnaJ</i>	Hitzeschockprotein DnaJ	<i>pepX</i>	X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase
<i>dnaK</i>	Hitzeschockprotein DnaK	<i>pgmA</i>	Phosphoglukomutase
<i>dtpT</i>	Di-/Tripeptidtransporter	<i>ppk</i>	Polyphosphatkinase
<i>ffh</i>	Typ IV Signalpeptidase	<i>ptr2</i>	Di-/Tripeptidtransporter
<i>ftsH</i>	Zellteilungsprotein, ATP-abhängige Zink-Metalloprotease	<i>ptsk</i>	HPr-Kinase/Phosphatase
<i>greA</i>	Transkriptionselongationsfaktor GreA	<i>rbsK</i>	Ribokinase
<i>gshR</i>	Glutathionreduktase	<i>recA</i>	Rekombinase A
<i>guaA</i>	GMP-Synthetase	<i>recD</i>	Exodeoxyribonuclease V
<i>gyrA</i>	DNA -Gyrase, A Untereinheit	<i>rpoH</i>	σ^{32} -Faktor
<i>hisS</i>	Histidin-tRNA-Ligase	<i>rpoS</i>	RNA-Polymerase σ -Faktor
<i>holB</i>	DNA-directed DNA polymerase III	<i>rr11</i>	Zwei-Komponenten-Response-Regulator
<i>hpO</i>	Haloperoxidase	<i>sigH</i>	Sigma-Faktor 30
<i>hprK</i>	HPr-Kinase; P-ser-HPr-Phosphatase	<i>sodAB</i>	Superoxiddismutase
<i>hrca</i>	transkriptionaler Regulator von Hitzeschockgenen	<i>soxS</i>	regulatorisches Protein
<i>hsp60</i>	GroEL-Chaperonin	<i>ssrA</i>	Transfer-Messenger-RNA
<i>htpG</i>	Klasse III Hitzeschockprotein	<i>tagB3</i>	Teichonsäurebiosyntheseprotein
<i>infB</i>	Translationsinitiationsfaktor 2	<i>thdF</i>	Thiophen-Furan oxidierendes Protein
<i>katE</i>	Katalase HPII	<i>trmE</i>	siehe <i>thdF</i>
<i>katF</i>	alternativer σ -Faktor	<i>trxA</i>	Thioredoxin
<i>lepA</i>	GTP-bindendes Protein LepA	<i>trxB</i>	Thioredoxinreduktase
<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramat-Alanin-Ligase	<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC, A-Untereinheit
<i>nox</i>	NADH-Oxidase	<i>xpk</i>	Phosphoketolase
<i>nusA</i>	Transkriptions Terminations-Antiterminationsfaktor	<i>orf1</i>	ähnelt DEAD-RNA-Helikase
		<i>orf2</i>	GTPase unbekannter Funktion

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Bezeichnung	Seite
1.1	Einteilung der Druckempfindlichkeit von Bakterien anhand ihrer Wachstumsrate	1
1.2	Zusammenwirken von Proteasen und Chaperonen	10
1.3	Struktur der tmRNA von <i>E.coli</i>	11
1.4	Modell der <i>Trans</i> -Translation	12
2.1	Aufbau des Kapillarblots	35
2.2	Überblick über den Ablauf der Mikroarrayanalyse	42
2.3	Einfluss von Hochdruck auf die <i>in vivo</i> mRNA-Stabilität-Veranschaulichung des Versuchsablaufs	48
3.1	Southern-Blot-Hybridisierung mit einer <i>ctsR</i> -spezifischen Sonde	54
3.2	16S-rRNA-Kopien in <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	58
3.3	Organisation von <i>cobQ</i> (A) und dem Gen der Tetrapyrrolmethylase (B) im Genom von <i>L. sanfranciscensis</i>	61
3.4	Transkription von <i>cobQ</i> aus <i>L. sanfranciscensis</i> DSM20451 ^T in mMRS4	62
3.5	Einfluss der Konzentration des Zellextraktes aus <i>L. sanfranciscensis</i> TMW1.52 auf das Wachstum von <i>L. delbrueckii</i> TMW 1.168.	64
3.6	Alignment von inverted repeats (IR) der IS30-Familie	65
3.7	Nukleotidsequenz von ISLsf1 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz	66
3.8	Insertion von ISLsf1 ins Genom von <i>L. sanfranciscensis</i>	67
3.9	Transkription von ISLsf1 in <i>L. sanfranciscensis</i>	68
3.10	Southern-Blot-Hybridisierung der <i>xpk</i> -spezifischen Sonde	72
3.11	Aminosäuresalignment der konservierten Regionen der GTPase Domänen (G1-G4) von ORF-2	76
3.12	Vergleich der Induktion von <i>dnaK</i> und <i>clpL</i> durch subletalen Hochdruck (45 MPa/ 30min/ 30°C) und Hitzeschock (42°C/ 10 min).	79
3.13	Mikroskopisches Bild von <i>L. sanfranciscensis</i> nach Wachstum unter Hochdruck	81
3.14	Druckabhängiges Wachstum von <i>L. sanfranciscensis</i>	82
3.15	Abnahme der KBE von <i>L. sanfranciscensis</i> durch Hochdruck	83
3.16	2D-Gele cytoplasmatischer Proteine von Wildtyp und Hochdruckmutante (80 MPa/30 min)	84
3.17	Einfluss der Mg-Mn-Limitierung auf das Wachstum von <i>L. sanfranciscensis</i>	86
3.18	Inhibitionshöfe und spontanresistente Kolonien für Kanamycin und Streptomycin	89
3.19	Partialsequenz des <i>L. sanfranciscensis</i> <i>ssrA</i> -Gens	90
3.20	Northern Blot Analyse der tmRNA Expression	91
3.21	Induktion der Transkription von IS-Elementen/ Transposasen durch Hochdruck	93
3.22	Southern-Blot-Hybridisierung mit spezifischen Sonden mobiler DNA-Elemente aus <i>L. sanfranciscensis</i>	94
3.23	Southern-Blot-Hybridisierung mit ISLsf6 spezifischen Sonden	95

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

3.24	(A) Aufbau von ISLsf6; (B)Repeats in den Termini von ISLsf6	96
3.25	Flankierende Regionen von ISLsf6	97
3.26	Bisher identifizierte flankierende Sequenzen upstream und downstream von ISLsf6.	98
3.27	Flankierende Regionen der von der Transposition betroffenen ISLsf6-Kopien	99
4.1	Induktion von Kälte- und Hitzeschockgenen durch subletalen Hochdruck bei <i>L. sanfranciscensis</i>	111
4.2	Möglicher Mechanismus der von ISLsf6 vermittelten chromosomalen Umordnung	122
8.5.1	Aerober und anaerober Adenosylcobalaminbiosyntheseweg	179
8.5.2	Struktur von Vitamin-B ₁₂	180

Tabellenverzeichnis

Nr.	Bezeichnung	Seite
1.1	Hochdrucksensitive Prozesse in <i>E. coli</i>	4
1.2	Übersicht über die Proteom- bzw. Genomweiten Genexpressionstudien bei 0,1 MPa adaptierten Mikroorganismen unter Hochdruck	6
1.3	Übersicht über die bisher isolierten Mutanten von 0,1 MPa adaptierten Mikroorganismen mit verändertem Verhalten gegenüber Hochdruck	8
2.1	In dieser Arbeit verwendete <i>L. sanfranciscensis</i> -Stämme	18
2.2	In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Stämme	19
2.3	In dieser Arbeit verwendete Plasmide	19
2.4	Oligonukleotide und Verwendungszweck	20
2.5	Nährmedien für die Kultivierung von <i>E.coli</i>	24
2.6	Nährmedien für die Kultivierung von Laktobazillen	25
2.7	Konzentrationen von Zusätzen von Selektionsmedium	25
2.8	PCR-Bedingungen	31
2.9	Programm zur cDNA-Synthese	33
2.10	Ablauf der Real-Time-PCR	33
2.11	Ablauf der Silberfärbung	40
2.12	Hochdruckregulierte und potentielle Referenzgene aus <i>L.sanfranciscensis</i> auf dem Screeningarray	44
2.13	Versuchsbedingungen und Wiederholungen auswertbarer Arrays	47
3.1	Übersicht über die Funktionale Klassifizierung	55
3.2	bisher sequenzierte Gene für tRNAs	58
3.3	IS-Elemente/ Transposasen in <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	59
3.4	Codon-usage in <i>L. sanfranciscensis</i> (vorläufige Berechnung)	60
3.5	Screening verschiedener Laktobazillen auf ihre Fähigkeit zur Synthese von Vitamin-B ₁₂	63

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

3.6	Vorkommen von ISLsf1 in verschiedenen <i>L. sanfranciscensis</i> -Stämmen	69
3.7	Vorkommen von ISlf1 in anderen Milchsäurebakterien als <i>L. sanfranciscensis</i>	70
3.8	Auswertung des Mikroarrays 1	73
3.9	Auswertung des Mikroarrays 2	74
3.10	Funktionelle Klassifizierung hochdruckinduzierter und reprimierter Gene (45 MPa/30 min)	75
3.11	Hochdruckregulation von tRNA-Synthetasen nach 30 minütiger Inkubation bei 45 MPa	76
3.12	Vergleich der Genexpression in <i>L. sanfranciscensis</i> bei subletalen Hochdruck und Hitzeschock	77
3.13	Einfluß von Hochdruck auf die <i>hsp60</i> -mRNA-Stabilität	78
3.14	Temperaturabhängige Wachstumsraten des <i>L. sanfranciscensis</i> Wildtyps und der Hochdruckmutante	85
3.15	Empfindlichkeit des <i>L. sanfranciscensis</i> Wildtyps und der Hochdruckmutante gegenüber verschiedenen, nicht ribosomalen Antibiotika	87
3.16	Empfindlichkeit des <i>L. sanfranciscensis</i> Wildtyps und der Hochdruckmutante gegenüber verschiedenen ribosomalen Antibiotika	88
3.17	Vergleich der Proteolys-Tag-Sequenz aus <i>L. sanfranciscensis</i> mit der anderer Laktobazillen	90

1 Einleitung

1.1 Hochdruck

1.1.1 Leben unter extremen hydrostatischen Drücken-Die Tiefsee

Der Grundstein der Hochdruckmikrobiologie wurde 1882/83 von Certes mit dem Nachweis von Mikroorganismen in Tiefseeproben aus 5000 Metern Tiefe gelegt [Certes, 1884, zitiert aus Kato, 1999]. Die systematische Erforschung mikrobiellen Lebens unter hohen hydrostatischen Drücken (HHP) begann erst in der Mitte des letzten Jahrhunderts [Kato, 1999; Groß, 1997]. 1949 begann ZoBell den Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Tiefseebakterien und *Escherichia coli* zu untersuchen und konnte später den ersten Beweis über piezophiles Wachstum in gemischten mikrobiellen Tiefseekulturen führen [ZoBell und Johnson, 1949; ZoBell und Morita, 1957], bevor Yayanos et al. 1979 die erste Isolierung eines piezophilen Tiefseebakteriums gelang.

Tiefseebakterien müssen nicht nur an die am Meeresgrund vorherrschenden extremen hydrostatischen Drücke (bis zu 110 MPa), sondern auch an die damit einhergehenden anderen extremen Lebensbedingungen, wie Kälte (1-3°C) oder geringe Nährstoffversorgung gewöhnt sein [Kato, 1999]. Das erklärt, dass die meisten isolierten Stämme nicht nur piezophil, sondern auch psychophil sind und bei Temperaturen oberhalb von 20°C nicht kultiviert werden können [Margesin und Nogi, 2004]. Fast alle bisher isolierten piezophilen Bakterien können in einige wenige Genera der γ -Proteobakterien, wie *Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwiella* und *Moritella* eingeordnet werden [Margesin und Nogi, 2004].

Piezophile Bakterien haben optimale Wachstumsraten bei Drücken oberhalb von 0,1 MPa (Abbildung 1.1). Die meisten bisher isolierten piezophilen Bakterien sind nicht obligat piezophil, sondern können bei veränderter Wachstumstemperatur auch als piezotolerant eingeordnet werden.

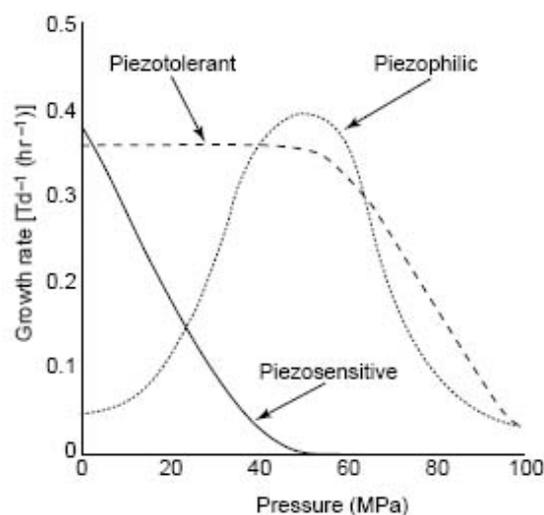


Abbildung 1.1: Einteilung der Druckempfindlichkeit von Bakterien anhand ihrer Wachstumsrate [aus Abe und Horikoshi, 2001]

Beispielsweise weist der aus der Tiefsee isolierte Stamm *Shewanella benthica* DB172F bei einer Wachstumstemperatur von 4°C identische Wachstumsraten bei Drücken zwischen 0,1 und 50 MPa (piezotolerant) und bei einer Wachstumstemperatur von 10°C ein Wachstumsoptimum bei 70 MPa (piezophil) auf [Kato et al., 1996; Kato und Nogi, 2001].

Der Zusammenhang von Wachstumstemperatur und -druck bei piezophilen Bakterien kann durch zwei Aussagen zusammengefasst werden [Kato, 1999]:

- a) Ihr piezophiles Verhalten ist in der Nähe des oberen Temperaturlimits, bei dem gerade noch Wachstum möglich ist, am stärksten ausgeprägt.
- b) Eine Erhöhung des Wachstumsdruckes erhöht das obere Temperaturlimit, bei dem gerade noch Wachstum möglich ist.

So war z.B. ab 10°C und atmosphärischen Druck ein Wachstum von *Shewanella benthica* DB6705 nicht mehr möglich. Wurde der Druck bis zu einem Optimum von 60 MPa erhöht, wies der gleiche Stamm auch bei 15°C noch Wachstum auf [Kato, 1999].

Die Mechanismen, die Bakterien Wachstum und Überleben unter Hochdruck ermöglichen, sind weitestgehend unbekannt [Bartlett, 2002]. Die Fähigkeit den Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren in der Zellmembran im Abhängigkeit vom Druck zu erhöhen und somit deren flüssig-kristallinen Zustand aufrechtzuerhalten, scheint einen Anteil daran zu haben [Allen et al., 1999]. Über den physikalischen Zustand der Membran können Proteine in der Transmembran, wie ToxR/S die Höhe des Druckes wahrnehmen und die Genexpression druckabhängig regulieren [Abe et al., 1999; Welch und Bartlett, 1998]. Die Existenz hochdruckregulierbarer Promotoren in piezophilen Bakterien wurde erstmals 1989 von Bartlett et al. am Beispiel des Promotors des äusseren Membranproteins *ompH* in *Photobacterium profundum* SS9 nachgewiesen. Einen Beitrag zur Piezophilie von *Shewanella benthica* DB172F scheint zudem dessen druckabhängige Zusammensetzung der Atmungskette zu haben [Quereshi et al., 1998a und 1998b].

1.1.2 Anwendung von Hochdruck in der Lebensmittelindustrie

Die Erprobung von Alternativen zu traditionellen Verfahren der Lebensmittelkonservierung und -verarbeitung kommt den Anforderungen von Konsumenten nach schonender verarbeiteten Lebensmitteln, die auch ohne zusätzliche Konservierungsstoffe lange haltbar sind, entgegen [Reviews: Smelt, 1998; Gould, 2001]. Unter diesen sogenannten innovativen Verfahren, wie Ozonbehandlung, Einsatz hoher magnetischer bzw. elektrischer Felder oder starker Lichtimpulse, gilt die Behandlung von Lebensmitteln mit HHP als am vielversprechendsten [Tauscher, 1998]. Aromastoffe und Vitamine, aber auch Farbstoffe von Lebensmitteln werden unter HHP im Vergleich zu konventionellen thermischen

Verfahren besser erhalten und können auch beim prozessierten Lebensmittel weiterhin zu einem frischen, natürlichen Eindruck beitragen.

Die Anwendungsmöglichkeiten von HHP gehen dabei über die reine Lebensmittelkonservierung durch Inaktivierung von Mikroorganismen oder Enzymen hinaus. So kann HHP Phasenübergänge, wie die Bildung von Gelen in protein- bzw. stärkereichen Lebensmitteln induzieren und damit gezielt eingesetzt werden, um die Lebensmitteltextrur zu verändern [Tauscher, 1998, Review]. Der Einfluss von Hochdruck auf die metabolische Aktivität und damit die Zusammensetzung von Metaboliten von Starterkulturen ermöglicht eine Steuerung von Lebensmittelfermentationen durch Hochdruck [Casal und Gomez, 1999].

1.1.3 molekulare Effekte von Hochdruck auf Mikroorganismen

1.1.3.1 Allgemeine Prinzipien und Auswirkungen auf Mikroorganismen

Die primären Effekte von HHP auf einzelne Zellkomponenten sind vielfältig und auf das Prinzip von Le Chatelier zurückzuführen, nachdem durch Druckerhöhungen Reaktionen mit einem niedrigeren Aktivierungsvolumen begünstigt sind [Bartlett, 2002, Review].

So haben die positiven Aktivierungsvolumina hydrophober Interaktionen zur Folge, dass unter Hochdruck Proteinoligomere in ihre Untereinheiten zerfallen können oder die Tertiärstruktur von Proteinen destabilisiert wird [Balny et al., 2002 Review]. Beides hat Folgen für die Enzymaktivitäten. Auch wenn die Druckstabilitäten verschiedener Proteine erheblich schwanken, führen i.a. erst Drücke oberhalb von 300 MPa, die dann auch die Sekundärstruktur verändern, zu irreversiblen Proteindenaturierungen [Lullien-Pellerin und Balny, 2002]. Drücke unterhalb von 200 MPa wiederum haben in erster Linie reversible Auswirkungen, die eher die Quartärstruktur als die Tertiärstruktur betreffen [Balny et al., 1989]. Neben veränderten Proteineigenschaften, führt HHP auch zu einer Abnahme der Membranfluidität.

Sekundäre Hochdruckeffekte sind nicht direkt auf die Hochdruckbehandlung, sondern auf die durch Hochdruck induzierten primären Effekte zurückzuführen. So verlängert HHP die Lag-Phase und inhibiert das Wachstum oder beeinflusst die Synthese von Makromolekülen und Lebensfähigkeit von Mikroorganismen [Somero, 1992]. Es ist zu beachten, dass es sich bei den meisten dieser Studien, die sich mit den Auswirkungen von Hochdruck auf einzelne Zellkomponenten oder Prozesse beschäftigt haben, um *in vitro* Studien handelte. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Druckbereiche, die notwendig sind, um hochdrucksensitive Prozesse in *E. coli* vollständig zum Erliegen zu bringen [nach Bartlett, 2002, Review].

Tabelle 1.1: Hochdrucksensitive Prozesse in *E. coli* [nach Bartlett, 2002; verändert]

Prozeß	vollständig inhibiert bei	Druck [MPa]
Beweglichkeit		10
Transport		26
Zellteilung		20-50
Wachstum		50
DNA-Replikation		50
Translation		60-80 ^a
Transkription		77
Lebensfähigkeit		100

^a verändert nach Welch et al. [1993]

Die Höhe des Druckes, bei dem bestimmte Prozesse nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr ablaufen hängt dabei von der Druckempfindlichkeit der jeweiligen Organismen ab (Abbildung 1.1).

Ribosomale Prozesse und die Zellmembran zählen zu den primären Faktoren, die das Wachstum von 0,1 MPa adaptierten Mikroorganismen unter Hochdruck limitieren [Pope und Berger, 1973; Landau und Pope, 1980; Macdonald, 1984]. Beide Komponenten, Zellmembran und das Ribosom, werden als Sensoren für veränderte Umweltbedingungen in Bakterien angesehen [VanBogelen und Neidhardt, 1990; Russell et al., 1995] (vergleiche Abschnitt 1.1.4).

Die Identifizierung der drucksensitivsten Proteinsynthesereaktion war das Ziel einer Reihe von Studien. 1972 konnten Schwarz und Landau nachweisen, dass oberhalb von 67 MPa keine Translation mehr in *E.coli* stattfindet, dieses aber nicht auf eine Beeinträchtigung der Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA)-Bildung, der Aminosäurepermeabilität, Polysomenstabilität oder der Bildung der Peptidbindungen zurückzuführen war [Schwarz und Landau, 1972a]. Der hochdrucksensitivste Schritt war demnach zwischen Entstehung der aa-tRNAs und der Peptidbindungen, und damit bei der aa-tRNA-Bindung ans Ribosom oder der Translokation zu suchen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung der aa-tRNA-Bindung ans Ribosom quantitativ identisch mit der Inhibierung der gesamten Proteinsynthese war [Schwarz und Landau, 1972b]. Die Konformationsänderung der 30S ribosomalen Untereinheit bei der Bindung von aa-tRNA würde mit einer Volumenzunahme einhergehen. Die These, dass somit die aa-tRNA-Bindung der drucksensitivste Prozeß sein müßte, wurde durch die Untersuchungen von Smith et al. [1975] unterstützt, in der nicht die Herkunft (piezophiles oder piezosensitives Bakterium) der 60S ribosomale Untereinheit oder Translationsfaktoren, sondern die Herkunft der 30S-Untereinheit die druckabhängige Geschwindigkeit der Translation bestimmte.

Mit Hilfe der DSC-(Differential scanning calorimetry)-Analyse von *E. coli*-Zellen konnte schließlich auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen hochdruckinduzierter Konformationsänderung des Ribosoms und der Überlebensfähigkeit der Zelle gezeigt werden [Niven et al., 1999; Alpas et al., 2003]. Auf eine, wie von Groß et al. [1993] *in vitro* beobachtete vollständige Dissoziation des Ribosoms in seine Untereinheiten, gab es *in vivo* keine Hinweise [Niven et al., 1999; Alpas et al., 2003].

1.1.3.2 Genexpression- und -regulation unter Hochdruck

Die Daten über hochdrucksensitive Genexpression 0,1 MPa adaptierter Mikroorganismen sind sehr gering und nur schwer untereinander zu vergleichen. Das ist nicht nur auf die Wahl der Mikroorganismen an sich (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *L. sanfranciscensis* und *Saccharomyces cerevisiae*), sondern auch auf die unterschiedlichen Hochdruckbedingungen und deren verschiedenartigen Auswirkungen auf die Zelle, zurückzuführen (vergleiche Tabelle 1.2).

In den wenigen bisher zu dieser Thematik erschienen Publikationen wurden die Veränderung der Genexpression bei Wachstum unter Hochdruckbedingungen [Ishii et al., 2005; Iwahashi et al., 2005], kurzer Behandlung mit letalen [Wemekamp-Kamphuis et al., 2002; Fernandes et al., 2004], subletalen [Hörmann et al., 2006] oder in der Höhe variierenden Drücken [Drews et al., 2002] und Temperaturen [Iwahashi et al., 2003] jeweils im Vergleich zu 0,1 MPa untersucht. Tabelle 1.2 faßt die bisher veröffentlichten genom- bzw. proteomweiten Expressionsstudien piezosensitiver Mikroorganismen unter Hochdruck zusammen.

Iwahashi et al. [2003 und 2005] haben die Veränderungen im Transkriptom unter wachstumsinhibierenden Druckbedingungen und während der Erholung von letalen Druck bei *S. cerevisiae* miteinander verglichen. In beiden Fällen wurden molekulare Chaperone induziert. Gene für den Abbau von Proteinen wurden nur während der Erholungsphase von letalen Druck, nicht aber während des Wachstums bei 30 MPa induziert, wenngleich auch hier v.a. mRNAs des Proteinmetabolismus in höheren Mengen als bei 0,1 MPa vorliegen. Auch in *in vivo* mRNA-Stabilitätsstudien bei 200 MPa in *S. cerevisiae* zählten mRNAs des Proteinmetabolismus neben denen des Energiemetabolismus zu den am stärksten druckstabilisierten Transkripten [Fernandes et al., 2004].

Obwohl für *E. coli* vermutet wird, dass keine Hochdruckadaptationsmechanismen während der Evolution entwickelt wurden und druckspezifische Reaktionen nicht erwartet werden können [Ishii et al., 2005], ähnelt die veränderte *E. coli* Genexpression bei Wachstum unter 30 MPa statt 0,1 MPa der des piezophilen Tiefseebakterium *Photobacterium profundum* auf die Verringerung des optimalen Wachstumsdruckes von 28 MPa auf 0,1 MPa [Vezi et al., 2005; Ishii et al., 2005]. In beiden Fällen waren die meisten induzierten Gene in den Kategorien Transportprozesse und Energiemetabolismus aufzufinden [Ishii et al., 2005; Vezi et al., 2005]. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht in der Induktion von Genen, die in die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind [Vezi et al., 2005]. Hingegen wurden in *P. profundum* molekulare Chaperone auch nach längerer Wachstumsdauer induziert [Vezi et al., 2005] und in *E. coli* nur in den ersten ein bis zwei Stunden des Hochdruckwachstums verstärkt exprimiert [Welch et al., 1993; Ishii et al., 2005]. In *E. coli* konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Promotoren von Genen der SOS-Reaktion durch Hochdruck induziert werden [Aertsen et al., 2004b].

Tabelle 1.2: : Übersicht über die proteom- bzw. genomweiten Genexpressionstudien bei piezosensitiven Mikroorganismen unter Hochdruck

Organismus	Hochdruckbedingungen		% aller Gene	Anzahl druck-regulierter Gene bzw. Proteine	am stärksten betroffene funktionale Klasse ^a	Referenz
PROTEOM (2D-Gele)						
<i>E. coli</i>	55 MPa	subletal, kein Wachstum	-	55	k.A. ^b	Welch et al. [1993]
<i>E. coli</i>	40 MPa	Wachstum	-	4	k.A.	Groß et al. [1994]
<i>Listeria monocytogenes</i>	200 MPa/ 10min	subletal, kein Wachstum	-	keine Angabe	k.A.	Wemekamp-Kamphuis et al. [2002]
<i>L. sanfranciscensis</i>	25-200 MPa/ je 30 min	je nach Druck	-	13	k.A.	Drews et al. [2002]
<i>L. sanfranciscensis</i>	80 MPa/ 60 min	subletal	-	16	k.A.	Hörmann et al. [2006]
TRANSKRIPTOM (Mikroarrays)						
<i>E. coli</i>	30 MPa	Wachstum unter Hochdruck				Ishii et al. [2005]
	frühe log-Phase		11%	469		
	späte log-Phase		8%	698		
	50 MPa	subletal, kein Wachstum ^c			Energiemetabolismus und Transport, in später Log-Phase auch Translation	
	frühe log-Phase		17%	313		
	späte log-Phase		16%	662		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 MPa/ 16 h	Wachstum unter Hochdruck	11%	619	Zellrettung, Verteidigung und Virulenz, gefolgt von Metabolismus	Iwahashi et al. [2005]
<i>S. cerevisiae</i>	40 MPa und 180 MPa bei 4°C/25°C mit Erholung der Zellen bei 0,1 MPa für 1h	je nach Druck und Temperatur		je nach Druck	Protein-Metabolismus (letaler Druck, v.a. Proteinabbau)	Iwahashi et al. [2003]
<i>S. cerevisiae</i>	200 MPa/ 30min	letaler Druck untersucht: mRNA-Stabilität	5%	274	Metabolismus und Energie gefolgt von Protein-Metabolismus	Fernandes et al. [2004]

^a abgesehen von nicht klassifizierten Genen^b k.A.- keine Angabe, nicht alle Spots sequenziert^c kein Wachstum, aber laut Definition nach Ishii et al. [2005]: frühe log-Phase nach 5 h, späte log Phase nach 11 h

1.1.3.3 Charakterisierung piezotoleranter/ -resistenter Mutanten

Neben Genexpressionsanalysen bietet auch die Isolierung und genetische Charakterisierung hochdrucktoleranter Mutanten die Möglichkeit Rückschlüsse auf die Auswirkungen von Hochdruck auf zelluläre Prozesse zu ziehen. In den letzten vier Jahrzehnten wurden immer wieder vereinzelt piezotolerante Mutanten beschrieben (siehe Tabelle 1.3). Bei der Isolierung dieser Mutanten wurden drei verschiedene Strategien verfolgt:

- (a) Isolierung natürlicher Varianten mit erhöhter Hochdrucktoleranz
- (b) Selektion der Überlebenden von für den Wildtyp letalen Drücken, eventuell über mehrere Zyklen (für den Wildtyp letale Hochdruckbehandlung, Wachstum der Überlebenden bei 0,1 MPa, wiederholte Behandlung mit für den Wildtyp letalen Druck, Wachstum der Überlebenden bei 0,1 MPa)
- (c) Wachstum für mehrere Wachstumszyklen unter subletalen Hochdruckbedingungen ohne zwischenzeitliche Inkubation bei 0,1 MPa

In nur zwei Fällen konnte der genetische Hintergrund der erhöhten Drucktoleranz identifiziert werden und war beide Male auf eine veränderte Expression von Chaperonen oder ATP-abhängigen Proteasen und deren Regulatoren zurückzuführen [Abschnitt 1.2]. In *Listeria monocytogenes* hatte eine Mutation im Gen des CtsR-Repressors zur Folge, dass dieser nicht mehr an die Operatorsequenz binden konnte und CtsR kontrollierte Gene, wie *clpP* oder *clpC* und *ctsR* selbst stärker als im Wildtyp exprimiert wurden. Auf die Inaktivierung von CtsR war auch die 1000fach höhere Überlebensfähigkeit bei 300 MPa zurückzuführen [Karatzas und Bennik, 2002; Karatzas et al., 2003]. In *E. coli* O157:H7 hatten hochdruckresistente Stämme eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Aktivität des Sigmafaktors RpoS, die auf Variationen in der *rpoS*-Sequenz zurückgeführt werden konnten [Robey et al., 2001]. Anders als für *L. monocytogenes* [Karatzas et al., 2003] konnten Veränderungen in der Hochdruckresistenz nicht direkt auf den Austausch dieser Nukleotide in *rpoS* zurückgeführt werden. Die Beteiligung von RpoS an Hochdruckresistenz wurde hingegen nachgewiesen, denn der Verlust eines funktionellen RpoS führte zu einer erhöhten Drucksensitivität [Robey et al., 2001].

Aertsen et al. [2004] haben zumindest Hinweise darauf, dass in *E. coli* MG1615 eine Überexpression des hitzeschockspezifischen σ^{32} -Faktors (RpoH), an der von Hauben et al. [1997], dokumentierten Hochdruckresistenz beteiligt ist, denn σ^{32} -regulierte Proteine der DnaK- und GroEL-Operons (GrpE, DnaK, GroEL, GroES) wurden in den druckresistenten Mutanten ebenso wie ClpB oder HtpG überexprimiert.

Die Charakterisierung von Mutanten, in denen die erhöhte Piezotoleranz nicht auf einzelne Gene zurückgeführt werden, lieferten, ebenso wie die gerade aufgezählten, Hinweise auf die Zusammenhänge von piezotoleranten und hitzetoleranten Wachstum, Resistenz gegen Hitze- oder Hochdruckinaktivierung, H₂O₂- oder Säuretoleranz. Tabelle 1.3 gibt eine Übersicht über bisher isolierte piezotolerante/-resistente Mutanten und ihre veränderte Resistenz/ Toleranz gegenüber weiteren Stressarten.

Tabelle 1.3: : Übersicht über die bisher isolierten Mutanten von piezosensitiven Mikroorganismen mit verändertem Verhalten gegenüber Hochdruck

	Isolierung	Hochdruckverhalten	Veränderung gegenüber Wildtyp	Ort der Mutation	Referenz
<i>Enterococcus faecalis</i>	a ¹	piezotolerantes Wachstum	erhöhte Ammoniumakkumulation in der Mutante	unbekannt	Marquis und Bender, [1980]
<i>Listeria monocytogenes</i>	b ²	erhöhte Resistenz gegenüber Hochdruckinaktivierung	resistenter gegen H ₂ O ₂ , Säure und Hitzeinaktivierung, Verlust der Flagellen, längere Zellen, geringere maximale Wachstumsrate bei 8°C, 22°C und 30°C	<i>ctsR</i> -Sequenz	Karatzas und Bennnik [2002]; Karatzas et al. [2003]
<i>E.coli</i>	b	erhöhte Resistenz gegenüber Hochdruckinaktivierung	-	unbekannt	Funaoka et al. [1965]
<i>E.coli</i>	b	erhöhte Resistenz gegenüber Hochdruckinaktivierung	keine Veränderung im piezotoleranten Wachstum, nur für einige Stämme Zusammenhang mit Hitzeresistenz	unbekannt, Hinweise auf σ^{32} (RpoH)-Überexpression [Aertsen et al., 2004a]	Hauben et al. [1997]
<i>E.coli</i>	c ³	erhöhte Resistenz gegenüber Hochdruckinaktivierung	-	vermutlich Unterschiede in <i>rpoS</i> -Sequenzen	Robey et al. [2001]
<i>E.coli</i>	d ⁴	geringeres Wachstum bei erhöhten Drücken	-	Deletion <i>hns</i>	Ishii et al. [2005]
<i>E.coli</i>	d	erhöhte Sensitivität gegenüber Hochdruckinaktivierung	empfindlicher gegenüber osmotischen Stress	Inaktivierung der Gene <i>katE</i> , <i>katF</i> , <i>oxyR</i> , <i>sodAB</i> , oder <i>soxS</i>	Aertsen et al. [2005]
<i>E.coli</i>	d	erhöhte Sensitivität gegenüber Hochdruckinaktivierung	-	Inaktivierung des Lon-Protease-Gens	Aertsen und Michiels [2005]
<i>E.coli</i>	e ⁵	piezotolerantes Wachstum	keine filamentösen Zellen unter Hochdruck	Expression des Photobacterium profundum SS9 <i>recD</i> -Gens	Bidle und Bartlett [1999]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	e	piezotolerantes Wachstum	kältetolerantes Wachstum	Expression von <i>tat2</i> (Tryptophan Permease)	Abe und Horikoshi [2000]

¹ (a) mehrere Wachstumszyklen unter Hochdruck

² (b) überlebte (wiederholt) für den Wildtyp letale Drücke

³ (c) natürliche Variante

⁴ (d) gezielte Inaktivierung eines Gens

⁵ (e) gezieltes Einfügen eines Gens

1.1.4 mögliche Hochdrucksensoren piezosensitiver Bakterien

Es wird nicht angenommen, daß Bakterien, die, wie *L. sanfranciscensis*, an atmosphärischen Druck angepaßt sind, über Mechanismen verfügen, die spezifisch HHP wahrnehmen und zu einer druckspezifischen Genregulation führen. Vielmehr wird vermutet, dass bei diesen Organismen Veränderungen in der Genexpression unter Hochdruck auf die Überlappungen der Effekte von Hochdruck mit Auswirkungen anderer Arten von Stress zurückzuführen sind [Welch et al., 1993; Ishii et al., 2005]. Am deutlichsten sind die Übereinstimmungen zwischen hochdruck- und kälte- bzw. hitzeinduzierter Genexpression.

Hingegen wird angenommen, dass Bakterien Veränderungen in der Umgebungstemperatur über deren physiko-chemischen Auswirkungen auf ihre biomolekulare Konstitution wahrnehmen [Eriksson et al., 2002]. Zu diesen Temperatursensoren zählen neben Veränderungen der Membranfluidität, und Konformationsänderungen in DNA, RNA und Proteinen [Eriksson et al., 2002] auch Veränderungen in ribosomalen Prozessen [VanBogelen und Neidhardt, 1990]. Gemeinsamkeiten zwischen Hochdruck- und Kältestreß liegen z.B. bei ihren Auswirkungen auf die Membrankonstitution vor [Vigh et al., 1998; Bartlett, 2002]. Beide senken die Membranfluidität, die durch entsprechende Veränderungen in der Membranzusammensetzung, wie einen erhöhten Anteil ungesättigter Fettsäuren, wiederhergestellt wird [Eriksson et al., 2002; Russel et al., 1995]. Veränderungen des Umgebungsdrucks und der Umgebungstemperatur führen zu DNA-Konformationsänderungen, die ihrerseits Auswirkungen auf die Regulation von Genen hat [zitiert nach Bartlett, 2002 und Eriksson et al., 2002]. H-NS, ein DNA bindendes Protein, das die Superhelizität der DNA aufrechterhält, ist verantwortlich für die Kälterepression von Genen in *E. coli*, kommt aber auch als Transkriptionsregulator bei dessen Hochdruckadaptation in Frage [Williams und Rimsky, 1997; Ishii et al., 2005].

1.2 Molekulare Chaperone und *Trans*-Translation

1.2.1 Molekulare Chaperone

Stressbedingungen, wie z.B. Hitze, Ethanol oder hohe Salzkonzentrationen führen zu einer vermehrten Entstehung nichtfunktionaler Proteine durch falsche Faltung, transkriptionale oder translationale Störungen oder DNA-Schäden. Bakterien haben verschiedene Strategien entwickelt, der Anhäufung nichtfunktionaler Proteine entgegenzuwirken. Molekulare Chaperone spielen dabei eine wichtige Rolle.

Molekulare Chaperone unterstützen die richtige Faltung nicht- oder falschgefalteter Proteine und sind bei der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt. Chaperone stehen dabei in Konkurrenz zu energieabhängigen cytoplasmatischen Proteasen (ClpAP, ClpXP, ClpYQ, FtsH, Lon), die diese

nichtfunktionalen Proteine abbauen. Die relative Affinität eines Proteins für bestimmte Chaperone entscheidet über die Wahrscheinlichkeit, ob nichtnative Proteine eher abgebaut oder neu gefaltet werden. Proteine mit Mutationen, die auch mit Hilfe von Chaperonen ihre native Form nicht einnehmen können, werden so mit der Zeit nach mehr oder weniger vielen Faltungsversuchen abgebaut oder aggregieren (Abbildung 1.2) [Wickner et al., 1999]. Eine Möglichkeit die Proteinqualitätskontrolle hinsichtlich des ATP-Verbrauchs effizienter zu gestalten, bildet das spezifische Markieren von Proteinen für den Abbau durch Proteasen, z.B. in der *Trans*-Translation (1.2.2).

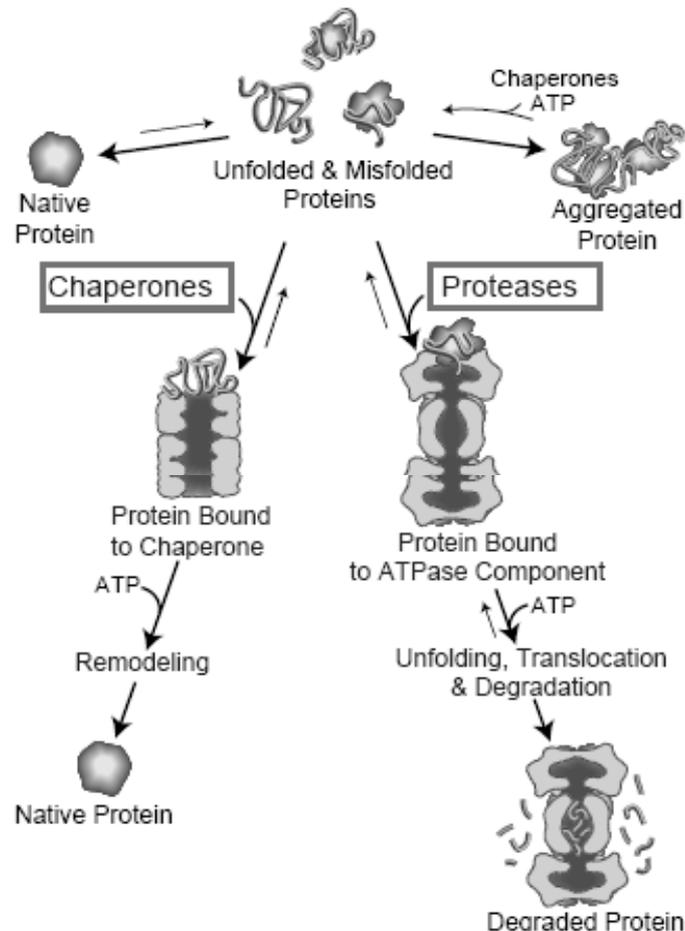


Abbildung 1.2: Zusammenwirken von Proteasen und Chaperonen beim Abbau des Pools nichtnativer Proteine [aus Wickner et al., 1999].

Zu den verbreitetsten ATP-abhängigen Chaperonen zählen die der Hsp60- (GroE/GroL), Hsp70- (DnaK/DnaJ) und Hsp100-Familie (Kaseinolytische Proteasen (Clp)). Clps wirken nicht nur als Chaperone. Einige von ihnen können, wie ClpA oder ClpX, in Verbindung mit der proteolytischen Untereinheit ClpP auch am Abbau nichtnativer Proteine beteiligt sein.

Viele der molekularen Chaperone sind Hitzeschockproteine. Diese werden in Milchsäurebakterien anders reguliert als im grampositiven Modellorganismus *B. subtilis*. Die klassische Einteilung in a) HrcA-reprimierte Gene wie die des dnaK- oder groESL-Operons, b) durch den alternativen sigma Faktor σ^B -regulierte Gene, c) ctsR-reprimierte Gene, wie solche für Clps und d) durch andere Faktoren

regulierte Gene, ist hier nicht möglich. So konnte z.B. im Genom von *Lc. lactis* kein Gen für σ^B identifiziert werden [Bolotin et al., 2001]. Auch eine klare Trennung zwischen HrcA-reprimierten Genen und CtsR-regulierten Genen ist, anders als bei *B. subtilis*, bei vielen grampositiven Bakterien widerlegt worden. So werden z.B. dnaK- und groESL-Operon in *Staphylococcus aureus* oder clpP in *Streptococcus salivarius* sowohl durch HrcA als auch CtsR reguliert [Chastanet et al., 2003; Chastanet und Msadek, 2003].

1.2.2 Trans-Translation

Transfer-messenger mRNA (auch 10Sa RNA oder SsrA) kommt in allen Prokaryoten vor und konnte, abgesehen von ausgewählten Chloroplasten und Mitochondrien, nicht in Eukaryoten identifiziert werden [Williams, 2002]. Sie besteht aus einer tRNA^{Ala} ähnlichen Struktur, die von Alanyl-tRNA-Synthetasen aminoacyliert werden kann [Komine et al., 1994] und einem kurzen ORF, das ein Abbausignal, in *E.coli* AANDENYALAA [Tu et al., 1995], für bestimmte zelluläre Proteasen (wie ClpAP, ClpXP, FtsH) kodiert [Gottesman et al., 1998; Herman et al., 1998; Keiler et al. 1996; Burton et al., 2001]. Die Struktur der *E. coli* tmRNA ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

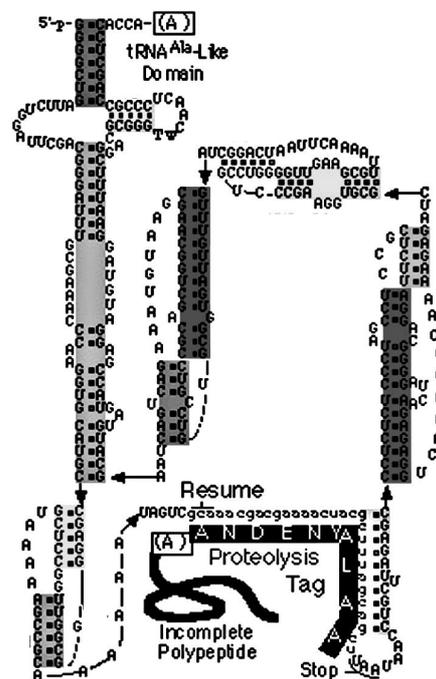


Abbildung 1.3: Aufbau der *E.coli* tmRNA, Quelle: tmRNA website (<http://www.indiana.edu/~tmrna/>)

Pausiert das Ribosom z.B. durch fehlende oder überlesene Stopcodons, seltene Codons oder tRNA-Mangel [Keiler et al., 1996; Abo et al., 2002; Roche und Sauer, 1999 und 2001], kommt es zur sogenannten *Trans*-Translation. Die aminoacylierte tmRNA bindet in ihrer Funktion als tRNA im

Komplex mit verschiedenen Faktoren, von denen bisher nur SmpB (= small protein B) als essentiell identifiziert wurde [Karzai et al., 1999], an die A-Seite des pausierenden Ribosoms.

Das Alanin der tmRNA wird an das unvollständig translatierte Polypeptid angehängt. Das Ribosom schaltet von der ursprünglichen mRNA zum ORF der tmRNA um und hängt das Abbausignal ebenfalls an dieses Polypeptid [zusammengefaßt von Withney und Friedman, 2002]. Abbildung 1.4 zeigt das von Whitney und Friedman [2002] vorgeschlagenen Modell der *Trans*-Translation.

Die *Trans*-Translation erfüllt damit zwei Funktionen. Einerseits erhöht sie die Effizienz der Translation. Ribosomen werden aus ihrem Stillstand erlöst und nachfolgenden Ribosomen ermöglicht die mRNA weiter zu übersetzen. Andererseits werden unvollständige oder fehlerhafte Peptide markiert, schnell abgebaut und können durch Aggregation oder unkontrollierte Aktivität keinen Schaden anrichten [Whitney und Friedman, 2002]. Proteasen, die den tmRNA-Tag erkennen, wie ClpAP, ClpXP oder FtsH in *E.coli* [Herman et al., 1998; Gottesman et al., 1998] oder ClpXP in *B. subtilis* [Wiegert und Schumann, 2001] bauen die markierten Proteine schneller ab als nichtmarkierte [Burton et al., 2001].

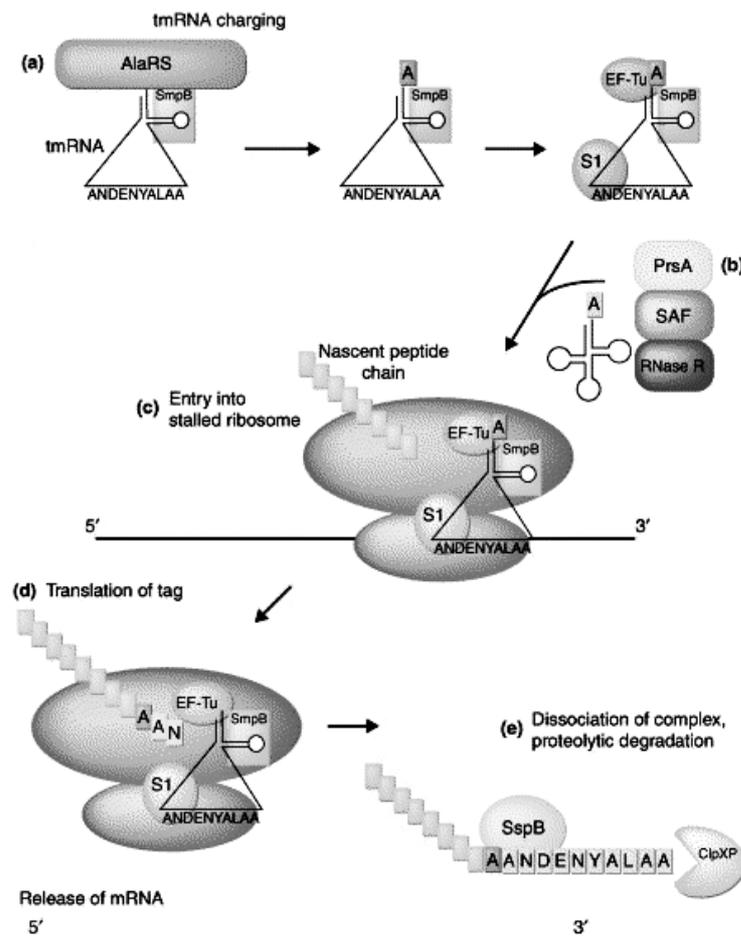


Abbildung 1.4: Modell der *Trans*-Translation aus: Whitney und Friedmann [2002]

Das Verhindern der Akkumulation pausierender Ribosomen und deren Recycling war damit in allen Fällen, in denen beide Funktionen einzeln untersucht wurden, wichtiger als die Proteolyse. *E. coli*-

ssrA-Mutanten zeigten zudem eingeschränkte Motilität [Komine et al., 1994], höhere Alp-Protease-Aktivität [Kirby et al., 1994], verzögerte Erholung von Kohlenstoffmangel [Oh und Apirion, 1991], oder erhöhte Aktivität von Repressoren (LacI, λ cI, LexA) [Retallack und Friedman, 1995]. *Synechocystis* ssp *ssrA*-Nullmutanten waren hypersensitiv gegenüber verschiedenen Proteinsyntheseinhibitoren [de la Cruz und Vioque, 2001: Auswirkungen von Aminoglykosiden konnten nicht untersucht werden]. Andererseits wurde die Häufigkeit des tmRNA-vermittelten Markierens von Peptiden bei Anwesenheit von Aminoglykosiden erhöht, deren induzierte Fehler zum Pausieren des Ribosoms führen können [Abo et al., 2002]. In *B. subtilis* induzierten auch hohe Temperaturen, Ethanol- und Calciumchloridkonzentration tmRNA, nicht aber hohe Salzkonzentrationen oder anderer osmotischer Streß [Muto et al., 2000].

Die *Trans*-Translation Signalkaskade ist nicht aufgeklärt [Karzai et al., 2000] schlugen zwei Mechanismen vor. Denkbar ist ein Erkennen überhängender 3' mRNA durch tmRNA oder eine innere Uhr, die zu lange stillstehende Ribosomen wahrnimmt, deren Konformation ändert und damit ein Binden der tmRNA ermöglicht.

Trans-Translation spielt eine wichtige Rolle in der proteolytischen Regulation der Genexpression von Bakterien. Spezifische „targeting factor“, wie SspB erleichtern Erkennung und Transfer von z.B. tmRNA-markierten Repressoren, wie LacI zu Clp-Proteasen [Abo et al., 2000; Levchenko et al., 2000, zusammengefaßt von Jenal und Hengge-Aronis, 2003].

Trotz des Zusammenhangs zwischen tmRNA und Clp-abhängiger Proteolyse, gibt es noch keine Studien wie sich tmRNA-Deletionen auf die Expression von Clp-Genen auswirkt.

1.3 IS-Elemente

Insertions (IS)-Elemente sind die einfachste Form mobiler genetischer Elemente, die die genetische Information für ihre Transposition selbst tragen [Mahillon und Chandler, 1998]. IS-Elemente werden anhand ihrer Struktur und den Mechanismen, der Spezifität und der Regulation dieser Transposition unterschieden.

IS-Elementen wird ein grosser Einfluß auf die genetische Variabilität mikrobieller Populationen zugesprochen [Mahillon und Chandler, 1998]. Sie leisten einen wesentlichen Beitrag zur bakteriellen Mutagenese [Rodriguez et al., 1992; Lieb, 1981; Kitamura et al., 1995, Hall, 1999] und können durch Insertionen in Gene diese inaktivieren oder chromosomale Umordnungen, wie durch z.B. homologe Rekombinationen wie Deletionen, Duplikationen oder Inversionen benachbarter DNA-Bereiche auslösen [Gray, 2000]. Einige IS-Elemente verfügen in ihrem rechten inverted repeat (IRR) über potentielle -35 Promotorregionen und können durch Insertion upstream von Genen deren Expression verändern [Boyen et al., 1978; Ciampi et al., 1982; Jaurin und Normark, 1983; Jellen-Ritter et al., 2001; Saedler et al., 1974; Treves et al., 1998]. Diese mutagene Aktivität kann für die Zelle vorteilhaft

sein, aber auch negative Auswirkungen haben. Je nach Standpunkt werden IS-Elemente daher als genomische Parasiten oder wichtige Quelle der Variation adaptativer Evolution angesehen [Review Blot, 1994].

Die Transposition von IS-Elementen wird auf verschiedenen Ebenen reguliert (Transkription, Translation, Sequenzspezifität, Wirtsfaktoren). Diese straff organisierte Regulation trägt dazu bei, dass die Transpositionsaktivität auf niedrigem Niveau gehalten wird und damit exzessive chromosomale Umordnungen, die den Wirt schaden würden, vermieden werden [Review: Nagy und Chandler, 2004]. Chromosomale Umordnungen, die auf die Transpositionsaktivität von IS-Elementen oder Transposons zurückzuführen sind, wurden unter verschiedensten Stressbedingungen, wie Hitze, UV, Überexpression rekombinanter Proteine oder Nährstofflimitierung beobachtet [Eichenbaum und Livneh, 1998; Gill et al., 2000; Ohtsubo et al., 2005; Riehle et al., 2001; Strøman et al., 2003; Treves et al., 1998]. Im allgemeinen handelte es sich hier um spontane Mutationen, die fixiert wurden, weil sie die Fitness der bakteriellen Population verbesserten. Aber die Häufigkeit von Transpositionen nahm unter Stress zu [Eichenbaum und Livneh, 1998; Ohtsubo et al., 2005; Strøman et al., 2003]. Es wird vermutet, dass die stressinduzierte Transkription der Transposasegene eine zentrale Rolle spielt [Strøman et al., 2003].

Der Einfluß von Hochdruck auf die Aktivierung der Transkription und Transposition von IS-Elementen oder Transposons wurde bisher noch nicht untersucht. In genomweiten Mikroarraystudien sind entweder keine Angaben über eine hochdruckinduzierte Transkription von IS-Elementen zu finden [Fernandes et al., 2004; Ishii et al., 2005] oder sie wurde nicht beobachtet [Iwahashi et al., 2005].

Angesichts der Tatsache, dass mobile DNA-Elemente zum horizontalen Gentransfer von Genen beitragen, die Antibiotikaresistenzen vermitteln oder in bakterielle Pathogenität bzw. Virulenz involviert sind [Mahillon und Chandler, 1998] und die Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln zunimmt, ist es unerlässlich, sich mit einer möglichen Aktivierung von IS-Elementen durch Hochdruck auseinanderzusetzen.

1.4 *Lactobacillus sanfranciscensis*: charakterisierte Stressreaktionen auf Proteomebene

Milchsäurebakterien stellen eine heterogene Gruppe von Bakterien dar, deren Gemeinsamkeit in der homo- oder heterofermentativen Produktion von Milchsäure liegt. Ihr Stoffwechsel hat wesentlichen Einfluß auf Aroma, Textur und Haltbarkeit der von ihnen fermentierten Lebensmittel [Klaenhammer et al., 2002]. In Sauerteigen dominieren, in Abhängigkeit vom Sauerteigtyp, heterofermentative Spezies, wie *Lactobacillus pontis* [Vogel et al., 1994; Müller et al., 2001], *Lactobacillus reuteri* [Stolz et al., 1995], *Lactobacillus panis* [Wiese et al., 1996] oder *Lactobacillus sanfranciscensis* [Kline und Sugihara, 1971; Weiss und Schillinger, 1984; Böcker et al., 1990]. Eine genauere Kenntnis ihrer physiologischen Eigenschaften und ihrer Stressreaktionsmechanismen sind die Grundlagen für eine effiziente Veränderung der Sauerteigeigenschaften, der Optimierung des Fermentationsprozesses und der Schaffung neuer Einsatzbereiche. Einen wesentlichen Beitrag dazu kann die Sequenzierung ihrer Genome leisten. Bisher wurden die Genomsequenzierungen von sechs Milchsäurebakterienstämmen abgeschlossen (*Lactococcus lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, zwei *Streptococcus thermophilus*-Stämme) [Bolotin et al., 2001, Kleerebezem et al., 2003; Pridmore et al., 2004; Altermann et al., 2005, Bolotin et al., 2004]. Eine Reihe weitere Sequenzierungsprojekte laufen, darunter auch die des an Sauerteigfermentationen beteiligten *Lactobacillus brevis* [Klaenhammer et al., 2002, Review]. Einige sauertereigrelevante Eigenschaften von *L. sanfranciscensis*, wie die Fähigkeit zur Bildung von Exopolysacchariden, denen ein Einfluß auf rheologische Eigenschaften, Textur und Haltbarkeit von Lebensmitteln zugeschrieben wird [Korakli et al., 2001] oder einzelne Komponenten seines proteolytischen Systems [Gobbetti et al., 1996], wurden bereits charakterisiert.

Die Stressreaktion von *L. sanfranciscensis* wurde auf molekularer Ebene nur für Säure und Hochdruck anhand des Proteoms untersucht [De Angelis et al., 2001; Drews et al., 2002; Hörmann et al., 2006].

Bei der Untersuchung der Auswirkung von Säurestress auf *L. sanfranciscensis* CB1 wurde das Proteom nicht-säureadaptierter Zellen mit dem säureadaptierter und toleranter Zellen verglichen. Im Vergleich zum Wildtyp waren bei säureadaptierten Zellen 15 Proteine und bei säuretoleranten 21 Proteine stärker exprimiert. Bei der Induktion von Hitzeschockproteinen scheinen posttranslationale Mechanismen eine Rolle zu spielen. Während DnaK und DnaJ weder in säureadaptierten noch säuretoleranten Zellen stärker als im Wildtyp exprimiert wurden, war GrpE, ebenfalls ein Bestandteil des dnaK-Operon, in beiden induziert [De Angelis et al., 2001].

Der Bereich, in dem Hochdruck auf *L. sanfranciscensis* subletal wirkt und die Regulation einzelner Gene auf Proteomebene durch Hochdruck war bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt. *L. sanfranciscensis* schränkt seinen Maltosemetabolismus bei ca. 50 MPa ein, eine Keimzahlreduktion war erst bei 100 MPa meßbar [Korakli et al., 2002]. Auch Scheyhing [2002] legte den subletalen Bereich für *L. sanfranciscensis* auf einen Druck um die 80 MPa fest. Er konnte zudem 30 Proteine identifizieren, die nach 60 minütiger Hochdruckbehandlung bei 80 MPa und 30°C mehr als 2fach

induziert wurden. Zu diesen Proteinen zählten eine Ribokinase (RbsK), eine ATP-abhängige Clp-Protease (ClpL), GroEL, Aminopeptidase- und tRNA-Synthetase-Homologe, Alkoholdehydrogenase (AdhE) und eine Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH).

Die Induktion der Ribokinase, wurde neben dem Translationelongationsfaktor TU, auch von Drews et al. [2002] nach 30 minütiger Behandlung bei Drücken zwischen 25 und 200 MPa als induziert identifiziert. Zu den durch Hochdruck herunterregulierten Proteinen zählte eine GMP-Synthetase. Ein zur Csp-Familie zählendes Kälteschockprotein wurde durch Hochdruck posttranslational modifiziert.

1.5 Ziele der Arbeit

Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit betraf die Charakterisierung der Streßreaktion von *L. sanfranciscensis* auf subletalen Hochdruck hinsichtlich Transkriptomveränderungen und Einfluss auf die Genomflexibilität. Als Voraussetzung der Mikroarraykonstruktion zur Analyse der Hochdruckreaktion auf transkriptionaler Ebene wurde der Sequenzierung des Genoms von *L. sanfranciscensis* begonnen.

Diese Phase der Genomsequenzierung, für die 2500 Sequenzierreaktionen zur Verfügung standen, sollte einen ersten Einblick in das genetische Potential von *L. sanfranciscensis* liefern. Die identifizierten Gene sollten vorläufig annotiert und klassifiziert werden. Die Identifizierung von IS-Elementen in *L. sanfranciscensis* sollte als Grundlage für die Analyse der mutagenen Potentials von Hochdruck dienen.

Bei der Charakterisierung der Auswirkungen von subletalen Hochdruck auf *L. sanfranciscensis* gab es drei thematische Schwerpunkte: a) Auswirkungen von HHP auf das Transkriptom und b) Adaptation des Wachstums an HHP und Suche nach möglichen molekularen Hintergründen und c) Aktivierung von IS-Elementen und Transposasen durch Hochdruck.

Zur Charakterisierung Auswirkungen HHP auf das Transkriptom sollte ein shot-gun-Mikroarray konstruiert werden, der mit ausreichender Wahrscheinlichkeit das *L. sanfranciscensis* Genom einmal abdeckt. Die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse sollten Klarheit darüber verschaffen, ob:

- die Genexpression hochdruckspezifisch oder mehr oder weniger identisch mit denen einer anderen Art von Stress, wie Kälte oder Hitze ist.
- sich der primäre Wirkungsort von Hochdruck (Membran, Ribosom) auch im Trankriptom widerspiegelt.
- es Unterschiede zwischen druckinduzierbaren Proteinen und Genen gibt und Aussagen über die primäre Ebene der Genexpressionsregulation durch Hochdruck getroffen werden können?.

Entscheidend für die Verifizierung der Mikroarraydaten war die Identifizierung eines nicht druckregulierten Gens, das die Anforderungen an „housekeeping-Gene“ für Real-Time-PCRs und Northern-Blots erfüllt.

In weiteren Versuchen sollte durch wiederholtes Wachstum bei subletalen Drücken eine Mutante von *L. sanfranciscensis* erzeugt werden, die an das Wachstum unter Hochdruckbedingungen angepasst ist. Die Beantwortung der Frage, ob diese erhöhte Drucktoleranz auf reine Adaptation oder vielmehr Mutationen zurückzuführen ist und der Versuch der Bestimmung potentieller Mutationen sollte ein besseres Verständnis der Auswirkung von Hochdruck auf *L. sanfranciscensis* ermöglichen. Ein Vergleich der RFLP-Analyse von IS-Elementen von *L. sanfranciscensis* vor und nach einer Hochdruckbehandlung und der Mutante mit der erhöhten Drucktoleranz sollte die Frage beantworten, ob IS-Elemente durch Hochdruck induziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien, für die in den folgenden Materialien- bzw. Methodenbeschreibungen keine Bezugsquelle angegeben wird, wurden von Merck KGaA (Darmstadt), Fluka, Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich geliefert.

2.1.2 Organismen und Plasmide

Im Zentrum dieser Arbeit standen die shot-gun-Genomsequenzierung und Hochdruckstressreaktion von *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.53 (=DSM 20451^T). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* TMW 1.168 (=DSM 20076) wurde als Indikatorstamm für die Vitamin-B₁₂-Biosynthesetests verwendet.

Stämme, die nur auf ihr Vitamin-B₁₂-Biosynthesevermögen oder das Vorhandensein von ISLs*fI* gescreent wurden, sind mit optimaler Wachstumstemperatur und verwendeten Wachstumsmedium in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Medium, Wachstumstemperatur und TMW-Nummer der für den Vitamin-B₁₂-Biosynthesetest oder Screening auf ISLs*fI* verwendeten Stämme.

mMRS4			30°C
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW			
1.52; 1.54; 1.73; 1.382; 1.383; 1.385; 1.386; 1.389; 1.390; 1.391; 1.392; 1.393; 1.395; 1.396; 1.449; 1.450; 1.622; 1.631; 1.618; 1.620; 1.625; 1.632; 1.636; 1.640; 1.641; 1.643; 1.647; 1.710; 1.711; 1.712; 1.724; 1.725; 1.854; 1.894; 1.896; 1.897; 1.898; 1.899			
<i>Lactococcus lactis</i> TMW 1.1085			
mMRS4			37°C
<i>L. frumenti</i> TMW 1.652	<i>L. panis</i> TMW 1.648	<i>L. pontis</i> TMW 1.56, TMW 1.85	
<i>L. pontis</i> TMW 1.397, TMW 1.675	<i>L. reuteri</i> TMW 1.106		
MRS4			30°C
<i>L. alimentarius</i> TMW 1.11	<i>L. brevis</i> TMW 1.57, TMW 1.384	<i>L. brevisimilis</i> TMW 1.122	
<i>L. casei</i> TMW 1.14, TMW 1.15	<i>L. curvatus</i> TMW 1.7, TMW 1.27	<i>L. curvatus</i> TMW 1.167	
<i>L. farciminis</i> TMW 1.68	<i>L. fructosus</i> TMW 1.198	<i>L. hammesii</i> TMW 1.1236	
<i>L. johnsonii</i> TMW 1.189	<i>L. kandleri</i> TMW 1.20	<i>L. lindneri</i> TMW 1.88	
<i>L. parabuchneri</i> TMW 1.429	<i>L. paralimentarius</i> TMW 1.256	<i>L. pentosus</i> TMW 1.10	

L. plantarum TMW 1.1, TMW 1.25 *L. plantarum* TMW 1.38, TMW 1.64 *L. suebicus* TMW 1.44
L. viridescens TMW 1.70 *L. species* TMW 1.225 *L. species* TMW 1.342

Leuconostoc lactis TMW 2.330 *Leuconostoc mesenteroides* TMW 2.48
Pediococcus acidilactici TMW 2.1 *Pediococcus clausenii* TMW 2.340
Pediococcus damnosus TMW 2. 4 *Pediococcus pentosaceus* TMW 2.6
Pediococcus pentosaceus TMW 2.8 *Weissella paramesenteroides* TMW 2.85

MRS4

37°C

L. acidophilus TMW1.18, TMW1.990 *L. animalis* TMW 1.19 *L. amylolyticus* TMW1.487
L. amylovorus TMW 1.694 *L. buchneri* TMW 1.75 *L. helveticus* TMW 1.1176
L. reuteri TMW 1.55; TMW 1.693 *L. rhamnosus* TMW 1.1186 *L. salivarius* TMW1.695, TMW1.805

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme sind in Tabelle 2.2 und Plasmide in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F', (Φ 80 Δ lacZ.M15).(lacZYAargF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
<i>Escherichia coli</i> cloni™	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ - <i>tonA</i>
<i>Escherichia coli</i> XLI MFK`	(<i>mcrA</i>)183 (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacIqZDM15</i> Tn5 (Kanr)]
<i>Escherichia coli</i> Top Ten	F', ϕ lacZ.M15.(lacZYH-argF) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Einsatz	Herkunft/ AC-Nr.
psmart HCamp	Anlegen der Genbank mit <i>L.sanfranciscensis</i> DNA	Lucigen AF 399742
pKS-Bluescript	Anlegen der Genbank mit <i>L.sanfranciscensis</i> DNA	Stratagene
pstBlue-1	klonieren der inversen PCR-Produkte für Sequenzierung	Novagen
pBAD MycHis B	klonieren des 16S rDNA Amplikons für Sequenzierung	Invitrogen

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 2.4A bis 2.4F fassen die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zusammen.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide und Verwendungszweck

Tabelle 2.4.A: Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Einsatz
Sequenzierprimer		
SL1	CAGTCCAGTTACGCTGGAGTC	pSmartHCamp
SR1	CTTTCTGCTATGGAGGTCAGGTATG	pSmartHCamp
T7-Terminator	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	pKS-Bluescript
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pKS-Bluescript, pstBlue-1, Alien Vektoren
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	pKS-Bluescript, pstBlue-1
5'pBADscreening	CCATAGCATTTTTATCATA	pBAD <i>Myc</i> -His B

Tabelle 2.4B: Primer für Kontrollgene auf dem Mikroarray

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Einsatz
Mikroarray-Primer		
clpL_V	TGGTGCTACTGCTGGTTAC	<i>clpL</i>
clpL_R	GTTACGGTATTCGTCTTGAG	
ISP1	ACATGCCAACTCGTTACG	IS153
ISP2	GCGTTTACCTTCCACAG	
ack_V	AGGGTGAATTTGCAGTC	Acetatkinase
ack_R	CAGCAGCACGTTGACTTAC	
rbK_V	AACATCGATGTTAGCCAATG	Ribokinase
rbK_R	GTCAATATTCATTCCGTCTG	
dnaK_V	A(AGC)AAACTCTGCAGTTGCTG	<i>dnaK</i>
dnaK_R	ATACCTAATGACAATGGAG	
map_V	ATGAAGCGAATTTTTGAAG	Maltosephosphorylase
map_R	GATG TTC AAACGCGCATCG	
P _{anf}	ATGGATTTATTTGAAAG	Phosphotransacetylase
P _{End}	TTAATCCTTATCTGCTA	
pp4V	TAATAAGCTTTGTTGTGTTAAGTG	Phosphoglukomutase
pp42	CACAGAAGCTGGAACCTG	

Tabelle 2.4C: Primer für Real-Time-PCRs

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Einsatz
-------------	-----------------	---------

Real-Time-PCRs

groEL_lc_V	ATTTTCTGATGACGCCCG	<i>hsp60</i>
groEL_lc_R	GGCAATGAAATTGCACGAG	
clpLL_V	GAAACACCAGTTGCTAAACC	<i>clpL</i>
clpLL_R	TTACCGTCATCAAAACCAG	
rbK_L_V2	GAATCAGAAGCAGCAACC	Ribokinase
rbK_L_R2	GCAAGAGAACCAATAAAGG	
GTPase-lc-V	TGTGCCATTTGACTTGC	GTPase unbekannter Funktion (=ORF2)
GTPase-lc-R	CGGGATGTTTATGTAGTTGG	
cps1D-lc-V1	GACAGCTATTTACTGGGC	Glykosyltransferase <i>cps1D</i>
cps1D-lc-R1	GGGTTCCCGATAATGAG	
gidA-lc-V	TCCGGTTTGCTGATAAAG	glukoseabhängiges Zellteilungsprotein <i>gidA</i>
gidA-lc-R	CAATCGCATAACCAGGAC	
xpk_lc_V _{neu}	CACCCTCGTCCACAATGG	Phosphoketolase <i>xpk</i>
xpk_lc_R _{neu}	CGAATCTTCATTTCTGGG	
Thdf_lc_V	TGCTATGGCAGAAAATGG	tRNA modifizierende GTPase <i>trmE/thdf</i>
Thdf_lc_V	GTAATCCCGCTCCAATTC	
IS153_lc_V	AATCCTCGGTGTTTCCAG	IS153
IS153_lc_R	TGCAGTGGTTGAAGTTCC	
ISLsf1_lc_V	TGGTATTCGTCGCAAACG	ISLsf1
ISLsf1_lc_R	GTAAGCCGACTCTTACGC	
ISLsf6a_lc_V	GGTTCATATTGCGATTGG	ISLsf6- <i>orfA</i>
ISLsf6a_lc_R	ATGCCGATTTAAGCCTTC	
ISLsf6b_lc_V	TTAAAGCCGTGAAAATGC	ISLsf6- <i>orfB</i>
ISLsf6b_lc_R	GATTGTTTCATGCCAAAGG	
ISLsf4_lc_V	TGGACATGAACGCCTCC	ISLsf4
ISLsf4_lc_R	AAACTTGCGGAAGCGAGC	
tuf_lc-V	GCAAACCTTTCATGATGC	Translationselongationsfaktor Tu <i>tuf</i>
tuf_lc-R	AATGTTATCACCGGCTTG	
fusA_lc_V	GGCTAACAAACGTGAATTC	Translationselongationsfaktor, <i>fusA</i>
fusA_lc_R	GTCCATTTGTGATGCACC	
tsf_lc_V	GCTAAAATTACTGCACAAC	Translationselongationsfaktor Ts, <i>tsf</i>
tsf_lc_R	AGGATTTCCCATGCTTTC	
infB_lc-V	TGAAGCTCGACTTGATCG	Translationitionsfaktor 2, <i>infB</i>
infB_lc-V	TGGAACGTCATTCAATCC	
pcrf_C-lc_V	GGACTIONTTGATGGCTGTTG	Peptidkettenablösefaktor 3, <i>pcrfC</i>
pcrf_C-lc_R	TACGCTTCAATTCCAAGG	

lepA_lc_V	ACTCGCCTCATCCAATTC	GTPase <i>lepA</i>
lepA_lc_R	TCATTTTCGCGATAACCTG	
gntK_lc_V	CTTGAATCTTCTTGGGGTTC	Glukonatkinase
gntK_lc_R	GGTGTAGTTGCCGTTAC	
ffh_V	TAGGAATGGGCGATGTC	Signalpeptidase Typ IV, <i>ffh</i>
ffh_V	ATCCCAGGAATCATAGCC	
dnaKL_V	AGCGGTTGCTTTAGGTGCTG	Hitzeschockprotein, <i>dnak</i>
dnaKL_R	CCATTGGACGTTACACCTTGT	
greA_lc-V	CAACGTCCACATGTAATTG	Transkriptionselongationsfaktor, <i>greA</i>
greA_lc-R	ATTTGAGCGAACTGCAAC	

Tabelle 2.4D: Primer für rRNA-Operons

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
rRNA-Operon Primer	
616_V	AGAGTTTGATCCTGGCT
630_R	GCAGAAAGGAGGTGATCC
616V_HindIII	TATAAAGCTTAGAGTTTGATCCTGGCT
630R_PstI	TATACAGCTGGCAGAAAGGAGGTGATCC

Tabelle 2.4E: Primer für inverse PCRs

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Einsatz
Primer für inverse PCRs		
cobQ_inv_V1	GGTACTGAAGGTGCTGGTTC	Cobyrinsäure-Synthase
cobQ_inv_V2	GTAACCTTCGCTAAATACATG	
cobQ_inv_R1	GATTGAATATCATCTGCCAC	
GroEL_inv_V0	GCTAAACAAAAACCAACAGAAGG	<i>hsp60</i>
GroEL_inv_R0	GCTAAACAAAAACCAACAGAAGG	
GroEL_inv_V1	CGCTCAGCACTTCAAAATGCT	
GroEL_inv_R1	CAAAGCCTTCTTCAACGGC	GTPase unbekannter Funktion (=Orf1)
GTP_inv_V2	CCAGGTACTACTTTAGAT	
GTP_inv_R2	GTAATCTAAAACAACGTTGAC	
guaA_inv_V	GATGTTGATTTCTTAGCTCA	GMP-Synthetase
guaA_inv_R	CATATTCACTGTTATCGGC	
ISLsf1_inv_V1	GAAACCGGTGGTAGTTTTAG	<i>ISLsf1</i>
ISLsf1_inv_R3	CTCACCAGCTAAGCGATGAACC	
ISLsf6_inv_V1	TGTTTCGCCTAACTGTTGC	<i>ISLsf6</i>
ISLsf6_inv_R1	CACGTTGCTCGGAATTAG	

ISLsf6_inv_R2	CTGCAAGATACTAACTAGC	ISLsf6
ISLsf6_inv_V2	CGTGAATGGGATTGTCC	
ISLsf6_inv_R3	CGCCGATATTTAACAACC	ISLsf6
ISLsf6_inv_V3	GCAACACCCGCATACGGAG	
ISLsf6_inv_V4	GTATAAATGTGATTGGTACGG	ISLsf6
ISLsf6_inv_R4	GATAATCCCAAGCAATGGC	
ISLsf6_inv_V5	CCACCTAGATCGCGATAT	
tpm_V1	CTCCCATTGGTAATTTAG	Tetrapyrrolmethylase
tpm_R1	CTTTTGGGTATTGCGAG	

Tabelle 2.4F: weitere Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Einsatz
weitere		
cobQ-nde_V1	<u>TATACAT</u> ATGACAATGATGATTAGAGT	Primer für das gesamte
cobQ-bamH1_R1	<u>ATATGGATCC</u> ATATTCGTAAGTTTTAAC	<i>cobQ</i> -Gen
ctsR_V	TGATACCATGGCAGTCATAGTATGTC	DIG-markierte Gensonde
ctsR_R	TTCTTTGTGCGACGCACTCATATTTCAACC	von <i>ctsR</i>
IF-2_R	AC(AG)TCGTCCTTGAAACGC	Ableiten von <i>infB</i>
IF-2_V	GGCATGAAATGC(CT)CA(AG)GAT	
IS6 _{flank_V}	GTGCTACCAGCAACCTCG	Primer für nicht kodierende Region upstream von ISLsf6
mdr_R	TCCAAGGGCATAAAGAACT	Multiple drug transporter downstream von ISLsf6
ISLsf6_orfA_R	TCCACACTTTAAGTCACG	Rückwärtsprimer in <i>orfA</i> von ISLsf6
ISLsf6_orfB_V	CTAACTTGTTGTGAAC	Vorwärtsprimer in <i>orfB</i> von ISLsf6
ISLsfI_V1	GGTAGATTGTAATAATTTAAG	DIG-markierte Gensonde
ISLsfI_R1	GCGTGCGCAAAGTACAG	von ISLsfI
IS1_V1	TGGCTTCTGTTTCTATCAGC	DIG-markierte Gensonde
IS1_R1	GACGTAAAATCGTGTTGAGG	von IS1
ISP1	ACATGCCAACTCGTTACG	DIG markierte IS153-
ISP2	GCGTTTACCTTCCACAG	spezifische Sonde
ISLsf3_lc_V	GTAAGTGTCTCATCTATTTTC	DIG markierte IS3-
ISLsf3_lc_R	GCCGCTGCTTTAAAATTC	spezifische Sonde
ISLsf6a-lc_V	GGTTCATATTGCGATTGG	DIG-markierte Gensonde
ISLsf6a-lc_R	ATGCCGATTTAAGCCTTC	von <i>orfA</i> aus ISLsfI

ISLsf6b_lc_V	TTAAAGCCGTGAAAATGC	DIG-markierte Gensonde
ISL sf6b_lc_R	GATTGTTTCATGCCAAAGG	von <i>orfB</i> aus ISLsf1
ISLsf4_lc_V	TGGACATGAACGCCTCC	DIG markierte ISLsf4
ISLsf4_lc_R	AAACTTGCGGAAGCGAGC	spezifische Sonde
lepA_V	AACTTTGCAATTGTTGCTC	Universalprimer für <i>lepA</i>
lepA_R	TCCACTTTGTCACCGTTC	
tpnH1_V	CAACTTAACTTAACCATTC	DIG markierte Transposase
tpnH1_R	AATAAATGATGCTTCCAAG	H1 spezifische Sonde
xpk _{for}	TCACCAAGATCCAGGTCT	DIG markierte <i>xpk</i> -
xpk _{rev}	TTATTTGTAAAGTGGTTC	spezifische Sonde

2.1.4 Medien

Alle Medien wurden, wenn nicht anders erwähnt, für 20 min bei 121°C autoklaviert.

2.1.4.1 Magnesium-Mangan-Stamm-Lösung

Die Magnesium-Mangan-Stamm-Lösung wurde separat autoklaviert (121°C, 20 min). Je 1 ml dieser Stammlösung wurde zu einem Liter mMRS4 (Tabelle 2.6) gegeben.

MgSO ₄ -7H ₂ O	100,0	g/l
MnSO ₄ -4H ₂ O	50,0	g/l

2.1.4.2 Nährmedien

Die Zusammensetzung der Nährmedien wird in den Tabellen 2.5 und 2.6 aufgeführt. Zucker und Glycerin wurden jeweils separat autoklaviert. Feste Nährböden enthielten 1,5% Agar. Sollten die Medien bei einzelnen Versuchen modifiziert worden sein, wird das in der jeweiligen Versuchsbeschreibung angegeben.

Tabelle 2.5: Nährmedien für die Kultivierung von *E.coli*

Medium	Zusammensetzung	Verwendung
LB	10 g Pepton aus Kasein; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl, pH=7,2	Anzucht von <i>E. coli</i>
LB nach Miller	LB, aber 10 g NaCl pro Liter	Anzucht von <i>E. coli</i> für

		Plasmidisolierungen
SOC	20 g Pepton aus Kasein; 5 g Hefeextrakt; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 10 mM NaCl; 10 mM KCl; 20 mM Glukose; pH=7,0	Transformation
TB	11,8 g Pepton aus Kasein; 23,6 g Hefeextrakt; 9,4 g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O; 9,4 g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O; 2,2 g KH ₂ PO ₄ ; 0,4% (v/v) Glycerin	den Empfehlungen des Plasmidvertreibers folgend, für die Anzucht von <i>E. coli</i> mit dem Plasmid psmart-HC-Amp

Tabelle 2.6: Nährmedien für die Kultivierung von Laktobazillen

Medium	Zusammensetzung pro Liter
mMRS4	10 g Pepton aus Kasein; 5g Hefeextrakt; 5g Fleischextrakt; 2,6 g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O; 4,0 g KH ₂ PO ₄ ; 3,0 g NH ₄ Cl; 0,5 g Cystein-HCl ; 1 ml Tween 80; 1 ml Magnesium-Mangan-Stammlösung (siehe 2.1.4.1); 10 g Maltose; 10 g Fruktose; pH=6,2
MRS4	10g Pepton aus Kasein; 4g Hefeextrakt; 8g Fleischextrakt; 2g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O; 5,0 g Natriumacetat; 2,0 g (NH ₄) ₂ hydrogencitrat; 1 ml Tween 80; 1 ml Magnesium-Mangan-Stammlösung (2.1.4.1); 20 g Glukose; pH=5,6
Vitamin B12 Assay-Medium	Difco® Kulturmedium (Merck)
modifiziertes Vitamin B12 Assay-Medium	wie Vitamin B12 Assay-Medium, aber mit 10g/L Maltose und 10g/L Fruktose

2.1.4.3 Antibiotika/Zusätze für Selektionsmedien

Wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Schleicher&Schuell, Dassel).

Tabelle 2.7: Konzentrationen von Zusätzen für Selektionsmedium

Zusatzstoff	Stammlösung		Endkonzentration im Medium [µg/ml]
	[mg/ml]	gelöst in	
Ampizillin	50	dest. H ₂ O	100
Chloramphenicol	34	Ethanol	25
IPTG	200	dest. H ₂ O	40
Erythromycin	20	Ethanol	5
Tetracyclin	5	70% Ethanol	10
X-Gal	20	DMSO	40

2.2 mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden auf dem Schüttler bei 37°C in LB, von *L. sanfranciscensis* bei 30°C in mMRS4 kultiviert und jeweils von festen Nährböden, die zur kurzfristigen Stammhaltung dienen, als Einzelkolonien angeimpft. Plasmidtragende Stämme wurden in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums kultiviert. Zur Anfertigung von Gefrierpräparaten als Stammsammlung wurden die Zellen aus einer 10 ml Übernachtskultur geerntet (Zentrifugation: 4000×g, 5 min), in 0,5 ml mMRS4 (*L. sanfranciscensis*) bzw. LB (*E. coli*) aufgenommen und zu je 0,5 ml autoklaviertem Glycerin (60 %) in sterile Schraubröhrchen pipettiert. Die Gefrierpräparate wurden bei -76°C gelagert.

2.2.2 Keimzahlbestimmung

Ringerlösung: 0,85% (w/v) NaCl; 0,1% (w/v) Pepton aus Kasein

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *L. sanfranciscensis* wurde eine Verdünnungsreihe mit Ringerlösung hergestellt und die entsprechende Verdünnungsstufe mit einem Spiralplater (IUL, Königswinter) auf je zwei Platten mMRS4-Agar ausplattiert. Die Platten wurden für 48 h bei 30°C und anaerober Atmosphäre bebrütet (76% N₂, 20% CO₂; 4% O₂) und dann ausgezählt.

2.2.3 Messen der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde mit einem Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 590 nm gegen mMRS4 gemessen.

2.3 molekularbiologische Methoden

2.3.1 Ethanolfällung von DNA

3M Natriumacetat pH 5,2 (mit Essigsäure eingestellt)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Zur Entsalzung oder Aufkonzentrierung von DNA wurde die DNA-Lösungen mit 0,11 Vol. Natriumacetat vermischt und im 2,56fachen Vol. 100% Ethanol gefällt. Genomische DNA wurde bei Raumtemperatur gefällt, auf Glasstäbe gewickelt, durch Eintauchen in 75% Ethanol entsalzt und nach dem Trocknen in TE-Puffer resuspendiert. Plasmide und DNA-Fragmente wurden für mindestens 1h bei 4°C inkubiert, durch Zentrifugation abgetrennt (12000×g/1h/4°C), zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in LiChrosolv[®] resuspendiert.

2.3.2 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligationen

Die Spaltung von DNA wurde mit handelsüblichen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs; MBI Fermentas; Promega GmbH, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers in den empfohlenen Puffersystemen durchgeführt. Zur Erhöhung der Ligationseffizienz wurden mit nur einem Enzym linearisierte Vektoren am 5'Ende mit SAP (shrimp alkaline phosphatase, MBI Fermentas) dephosphoryliert. Dafür wurden 100 µl des Restriktionsverdaus mit 5U SAP für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Die Enzyme wurden hitzeinaktiviert (10min/65°C) und anschliessend mit PCR-Reinigungssäulchen oder durch Ethanol-fällung aus dem Reaktionsansatz entfernt. Üblicherweise wurden Ligationen in einem Volumen von 15 µl mit 1U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs; MBI Fermentas) und dem Insert im Überschuss angesetzt. Die Ligationen fanden über Nacht in Eiswasser (10°C) bei Raumtemperatur statt.

2.3.3 Herstellen kompetenter Zellen

Sowohl kompetente Zellen von *E.coli* als auch von *L. sanfranciscensis* wurden generell bei 4°C zentrifugiert. Waschlösungen wurden vorher auf diese Temperatur gekühlt. Kompetente Zellen wurden in Aliquoten von 100 µl schockgefroren und bei -76°C gelagert.

2.3.3.1 Herstellen chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen und Transformation

CaCl₂-Lösung: 60 mM CaCl₂, 10 mM PIPES, 15% (v/v) Glycerin, pH=7,0

50 ml LB wurden 0,5% mit einer Übernachtskultur (37°C/220 rpm) des jeweiligen *E.coli* Stammes beimpft. Bei einer OD_{590nm} =0,6-0,7 wurden die Kultur für 30min auf Eis gestellt. Anschliessend wurden die Zellen bei 4°C und 5000×g abgetrennt, zweimal mit CaCl₂-Lösung gewaschen und in 1,5 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Vor einer Transformation wurden die kompetenten Zellen für mindestens 30 min auf Eis gestellt, 100 µl der Zellen mit 3-7 µl Ligationansatz vermischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 90 sec. Anschliessend wurden die Zellen mit 1ml SOC (Tabelle 2.5) vermischt, für 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, auf LB-Platten mit den entsprechenden Selektionszusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.3.3.2 Herstellen elektrokompenter *E.coli*-Zellen und Transformation

50 ml LB wurden mit einer Übernachtskultur (37°C/220 rpm) des jeweiligen *E. coli* Stammes beimpft. Bei einer $OD_{590\text{ nm}} = 0,6-0,7$ wurden die Kultur für 30min auf Eis gestellt. Anschliessend wurden die Zellen bei 4°C und $5000\times g$ abgetrennt, viermal mit eiskalten $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen und in 500 μl 10% (v/v) Glycerin resuspendiert.

50 μl der kompetenten Zellen wurden mit 0,5-5 μl vermischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 1mm pipettiert. Der Elektroporator (GenePulser, Biorad, München) wurde bei einer Spannung von 200 Ω auf 2500 V und 25 μF eingestellt. Zu den transformierten Zellen wurde 1ml LB pipettiert. Die Zellen wurden 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, anschliessend auf LB-Platten mit den entsprechenden Selektionszusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.3.3.3 Herstellen elektrokompenter *L. sanfranciscensis*-Zellen und Transformation

Glycerin-Saccharose-Lösung: 10% (v/v) Glycerin, 0,5 M Saccharose

100 ml mMRS4 wurden mit einer Übernachtskultur von *L. sanfranciscensis* 0,4% angeimpft, bei $OD_{590\text{ nm}}=0,5$ bei 4°C geerntet, viermal mit 10mM $MgCl_2$, je einmal mit 10 (v/v)% Glycerin bzw. Glycerin-Saccharose-Lösung gewaschen und in 1 ml Glycerin-Saccharose-Lösung resuspendiert. Der Elektroporator (GenePulser, Biorad, München) wurde bei einer Spannung von 1000 Ω auf 1200 V und 25 μF eingestellt. Zu den transformierten Zellen wurden 700 μl mMRS4 LB pipettiert. Die Zellen wurden für drei Stunden bei 30°C im Brutschrank inkubiert und auf mMRS4 mit 5ppm Erythromycin ausplattiert. Die Platten wurden für mindestens 48 h anaerob bei 30°C bebrütet.

2.3.4 Isolieren von Nukleinsäuren

2.3.4.1 DNA-Isolierung aus *L. sanfranciscensis*

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8,0

Lysozylösung: 10 mg Lysozym/ ml TE

5 M NaCl

20% SDS-Lösung

Chisom: Chloroform: Isoamylalkohl = 24:1

1000 ml mit *L. sanfranciscensis* beimpftes mMRS4 wurden für 24 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschliessend durch Zentrifugation abgetrennt ($5000\times g$, 5 min), das Zellpellet zwei Mal in TE-Puffer gewaschen und schliesslich in 10 ml Lysozylösung resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde SDS in einer Endkonzentration von 2% zugegeben, die Lösung für 10

min bei 60°C inkubiert und auf Eis gestellt. 5M NaCl wurde in einer Endkonzentration von 1M vorsichtig untergemischt. Diese Lösung wurde für eine Stunde auf Eis stengelassen und bei 4°C zentrifugiert (30 min/ 5000×g). Zum Überstand wurden 500 µg RNase A pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Es schloss sich ein Proteinabbau (10 mg Proteinase K) bei 55°C für 1-2 h an. Die Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol-Chisom (1:1) versetzt, 20 min bei 5000×g zentrifugiert und die obere, wässrige Phase einer wiederholten Extraktion mit 1 Vol. Chisom unterzogen bis keine Interphase mehr zu sehen war. Es schloss sich eine Ethanol-fällung bei Raumtemperatur an. Die ausfallende DNA wurde mit Glasstäben aufgewickelt, in 75% Ethanol gewaschen, anschliessend in Eppendorff-Reaktionsgefässen getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.3.4.2 RNA-Isolierung aus *L. sanfranciscensis*

Gesamt-RNA aus *L. sanfranciscensis* wurde für Mikroarray-Analysen und Real-Time-PCRs mit TRIzol (peqGold RNA pure, peqlab), für Northern Blots mit Qiagens RNeasy™-Mini-Kit isoliert. Bei beiden Isoliermethoden wurden die Proben vor der Isolierung mit dem doppelten Volumen RNA-Protect (Qiagen) vermischt. Pro ml TRIzol oder pro RNeasy-Säulchen wurden jeweils 0,5 ml Zellen bei einer OD_{590nm} von 0,3-0,4 eingesetzt. Für die Zellyse bei der Isolierung mit dem RNeasy™-Mini Kit wurden die Zellen in je 100 µl TE-Puffer mit 10mg/ ml Lysozym für 10 min bei 37°C inkubiert. Ansonsten wurde jeweils nach Herstellerangaben verfahren. Vor einer weiteren Verarbeitung der Proben wurde sowohl die Intaktheit der RNA (Gelelektrophorese, Abschnitt 2.3.7) als auch die Abwesenheit genomischer DNA (PCR, Abschnitt 2.3.6) sicher gestellt.

2.3.4.3 Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung wurden die *E. coli* Stämme jeweils in LB nach Miller mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Eine Ausnahme bildete die Isolierung der psmart-HC-Amp-Plasmide (Lucigen®Corporation, Biocat, Heidelberg). Hier wurde den Empfehlungen des Herstellers folgend TB statt LB zur Anzucht verwendet. Die Zellyse fand ausschliesslich nach dem Prinzip der alkalischen Lyse statt. Zur Aufreinigung der Plasmide wurden entweder kommerzielle Kits verwendet oder es schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung an.

2.3.4.3.1 Alkalische Lyse und Ethanol-fällung

Resuspendierungspuffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH=8,0

Lysepuffer: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

Neutralisierungspuffer: 3 M KOAc, pH=5,5

3M Natriumacetat, pH=5,2

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8,0

Zellen aus 10 ml Übernachtskultur wurden in 0,5 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und mit 0,5 ml Lysepuffer durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach Klärung des Lysats wurden 0,5 ml Neutralisierungspuffer zugegeben, die Mischung wiederum mehrmals invertiert und 10 min bei zentrifugiert ($10000\times g$ / 4°C). Die Plasmide wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.3.4.1) und anschließende Ethanol-fällung (2.3.1) aus dem Überstand aufgereinigt und in LiChrosolv[®] mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A gelöst.

2.3.4.3.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* mit kommerziellen Kits

Bei der Isolierung mit dem E.Z.N.A Plasmid Mini Kit (Peqlab) wurde nach Herstellerangaben verfahren. Das Protokoll zur Aufreinigung der Plasmide im 96er Mikrotiterplattenformat (Montagé Plasmid Miniprep₉₆ Millipore) wurde leicht modifiziert. Die Kulturen wurden in 10 ml statt 1 ml LB (bzw. TB) mit Ampicillin angezogen, geerntet ($5000\times g/10\text{min}$), in 100 μl Puffer A resuspendiert und mit 100 μl Puffer B lysiert. Das Lysat wurde auf die 96-well-„Clearing-plate“ aufgetragen und weiter nach Herstellerangabe mit dem MWG-Roboseq[®] 4204S aufgereinigt.

2.3.5 DNA und RNA Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration bzw. Reinheit der DNA oder RNA wurden entweder gelelektrophoretisch oder photometrisch bestimmt. Zur photometrischen Bestimmung wurden die Proben gegen TE-Puffer (pH=8,0) bei 230, 260 bzw.280 nm im GeneQuant (Pharmacia, Freiburg) vermessen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA. Verunreinigungen mit Proteinen wurden bei 280 nm, Verunreinigungen mit Polysacchariden bei 230 nm nachgewiesen. Reine RNA sollte ein Absorptionsverhältnis von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=1,8-2,2$ und $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}=2,2$ haben.

2.3.6 Polymerasekettenreaktion

2.3.6.1 Standard-PCR und High-fidelity-PCR

Zur Amplifizierung von DNA wurde, abgesehen von der Mutationsanalyse der 16S rRNA-Sequenzen, Taq-DNA-Polymerase (Bioron, Ludwigshafen oder Qbiogen, Heidelberg) eingesetzt. Der PCR-Reaktionsansatz für die Taq-Polymerase enthielt pro 100 μl 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 50 pmol je Primer und 2 U Taq. Zur Analyse von Mutationen in den 16S rRNA-Genen wurde die Pfu-DNA-Polymerase (Promega) gewählt. Die Pfu-Polymerase verfügt, im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase, neben ihrer Polymeraseaktivität noch über eine zusätzliche 3'-5'-Exonuclease-Aktivität,

sodass DNA-Amplifizierungen mit einer deutlich geringeren Fehlerrate ablaufen (High-Fidelity-PCR). Im Fall der vom Hersteller optimierten Bedingungen (5 U Pfu und DNA je 100 µl Reaktionsansatz, 0,1 mM dNTP, mitgelieferter 10×Pfu-Reaktionspuffer) liegt diese Fehlerrate etwa eine Zehnerpotenz unter der der Taq-DNA-Polymerase.

Die PCRs wurden entweder im Primus 96 (MWG-Biotech, Ebersberg) oder Eppendorff Gradient Cycler (Eppendorff, Hamburg) mit denen in Tabelle 2.8 dargestellten Programmen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit der jeweiligen Schmelztemperatur der Primer (Tabelle 2.4) gewählt. Die PCR Produkte wurden vor einer weiteren Verarbeitung (Restriktionsverdau, Klonierung, Sequenzierung) gelelektrophoretisch kontrolliert und aufgereinigt (PCR-Purification-Kit, Qiagen, Hilden).

Tabelle 2.8: PCR-Bedingungen

Schritt-Nr.	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Taq-Polymerase		Pfu-Polymerase	
			T	Zeit	T	Zeit
1	1	Denaturierung	94°C	2 min	94°C	2 min
2	32	Denaturierung	94°C	45 sec	94°C	45 sec
		Primer-Anlagerung	40-64°C	45 sec	53°C	1 min
		Elongation	72°C	1 min/kb	72°C	2 min/kb
3	1	abschliessende Elongation	72°C	10 min	72°C	10 min

2.3.6.2 Inverse-PCR

Die inverse PCR (Ochman et al., 1993) diente der Amplifizierung unbekannter Sequenzabschnitte. Genomische DNA aus *L. sanfranciscensis* DSM20451^T wurde mit hexanukleotidspezifischen Restriktionsendonukleasen vollständig verdaut. Die Restriktionsverdaus wurden mit Ethanol gefällt (2.3.1), in LiChrosolv[®] resuspendiert und, um intermolekulare Ligationen zu vermeiden, in sehr niedrigen Konzentrationen ligiert (2.3.2). Die in der inversen PCR verwendeten Primer wiesen eine entgegengesetzte Orientierung auf und sind gemeinsam mit den Zielgenen in Tabelle 2.4E dargestellt. Die PCR-Produkte wurden auf TAE-Gele aufgetragen, spezifische Banden ausgeschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gel-Extraktions-Kit (peqlab, Erlangen) aus dem Gel gereinigt. Gegebenenfalls wurden die so erhaltenen PCR-Produkte vor einer Sequenzierung noch in einen TA-Vektor (pst-Blue1, Novagen) ligiert und in *E.coli* transformiert. Die Ergebnisse der einzelnen inversen PCRs sind der Übersicht der Arbeit halber nicht dargestellt, aber in die in den Datenbanken hinterlegten Sequenzdaten eingeflossen (Abschnitt 7.2).

2.3.7 Auftrennung von Nukleinsäuren

2.3.7.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

DNA Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 20,00% (w/v) Saccharose

50×TAE-Puffer: 2 M Tris (Base); 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA; pH=8,2

20×TBE-Puffer: 890 mM Tris (Base); 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA; pH=8,2

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,5×TBE-Puffer bei einer Feldstärke von 6 V/cm, die präparative Auftrennung in 1×TAE-Puffer bei 5 V/cm als horizontale Gelelektrophorese. Die Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit der aufzutrennenden Fragmentgrößen gewählt und lag zwischen 0,6 und 1,5% (w/v). Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 0,1 Vol. DNA-Auftragspuffer vermischt. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen (Lambda DNA/ *EcoRI*+*HindIII* Marker 3). Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und mittels eines UV-Transilluminators visualisiert und digitalisiert (Gel-Dokumentationssystem, INTAS-science imaging instruments GmbH, Göttingen). Zur Auftrennung von RNA wurden Kammer und Kämme vor der Elektrophorese für 2h in einer 2% SDS-Lösung inkubiert.

2.3.7.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

10×-MOPS: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA, pH=7,0

RNA-Auftragspuffer: 1×MOPS, 50% deionisiertes Formamid, 6,14% Formaldehyd, 0,05%
Bromphenolblau

Zur Auftrennung von RNA-Proben für Northern Blots wurden denaturierende Elektrophoresebedingungen gewählt. Um das Risiko von RNase-Kontaminationen zu minimieren, wurde zur Herstellung aller Lösungen DEPC-behandeltes bidestilliertes Wasser verwendet. Die Elektrophoresekammern wurden vor der Gelelektrophorese über Nacht mit einer 0,1 M NaOH-Lösung gespült. 1,3 g Agarose wurden in 71 ml DEPC-H₂O aufgeschmolzen und mit 10 ml 10×MOPS-Puffer und 18 ml Formaldehyd (37%) vermischt. Nach dem Giessen und Erkalten des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 1×MOPS-Puffer bis zur Geloberkante gefüllt, sodass das Gel gerade nicht bedeckt war. Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben mit dem doppelten Volumen RNA-Auftragspuffer für 10 min bei 65°C denaturiert. Pro Tasche wurden 3,5 µg RNA aufgetragen. Das Gel wurde zunächst für 10 min bei einer Feldstärke von 4 V/cm laufen gelassen, sodass die Proben die Auftragstaschen verlassen hatten, und erst dann vollständig mit 1×MOPS-Puffer überdeckt.

2.3.8 Real-Time-PCR

10xNukleotid-Mix:: 10 mM dNTP

Vor der Erststrang cDNA-Synthese wurden aus der mit TriZOL isolierten Gesamt-RNA (2.3.4.2) DNA-Rückstände entfernt. Dafür wurden 4-6 µg Gesamt-RNA für 20 min in Gegenwart von RQ1 RNase-freier DNase I (Promega) bei 37°C inkubiert. DNaseI wurde anschliessend mit dem mitgelieferten Stopppuffer (1 µl/ 10 µl Reaktionsansatz) und zehnminütiger Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die „DNA-freie“ Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch auf ihre Intaktheit überprüft (2.3.5; 2.3.7.1), bevor die Erststrang-cDNA-Synthese im 50 µl Maßstab nach Tabelle 2.9 ausgeführt wurde. In Schritt 1 (Denaturierung) wurden 2 µg „DNA-freier“ Gesamt-RNA und 1,5 µg Random Hexamer Primer (Promega) kombiniert. Erst vor Schritt 3 (Annealing) wurden 5µl 10xNukleotid-Mix, RNase freies H₂O, Puffer für die Reverse Transkriptase und 200 U M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega) zur Reaktion gegeben.

Tabelle 2.9: Ablauf der cDNA-Synthese im Thermocycler

Schritt-Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	70°C	5min
2	Kühlen	94°C	5 min
3	Primer-Anlagerung	20°C	5min
4	Elongation	42°C	1 h

Nach der Reversen Transkription fand ein RNase H (Promega) Verdau zum Abbau der RNA in RNA-cDNA-Hybriden statt (20 min/ 37 °C). Rnase H und Reverse Transkriptase wurden anschliessend inaktiviert (65°C/ 10min). Vor der Real-Time PCR im LightCyclerTM (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurde die cDNA bei 5 min 95°C denaturiert. Der 20 µl Real-Time PCR Reaktionsansatz enthielt 1xSYBR Green 1 Master Mix (QuantiTectTM SYBR® Green, Qiagen), 10 pmol je Primer, 2 µl cDNA und Nuklease freies H₂O. Als Reaktionsgefäße wurden LightcyclerTM Kapillaren (Roche Molecular Biochemicals) benutzt. Das PCR Programm ist in Tabelle 2.10 dargestellt.

Tabelle 2.10: Ablauf der Real-Time-PCR

	Temperatur/Zeit	Heizrate	Zyklen
Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase	94°C/ 15 min	20°C /s	1
PCR	94°C/15 sec		
	50-52°C/ 20 sec	20°C /s	40-50
	72°C/30 sec		

Schmelzkurve	94°C/0 sec	20°C /s	
	40°C/ 10sec	20°C /s	1
	90°C/ 0sec	0,1°C /s	
Kühlen	40°C	20°C /s	1

Die Messungen wurden für jede cDNA doppelt durchgeführt und mit einem zweiten Set cDNAs wiederholt. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschliessen, wurden sowohl Wasserproben, als auch die zur jeweiligen cDNA gehörenden, verdünnten RNAs (entsprechend der Verdünnung im Erststrang-cDNA-Synthese-Ansatz), ebenfalls vermessen. Die Crossing-Point-Analysen des zweiten derivativen Maximums wurden mit der Lightcycler™ Software 5.32 durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte relativ zum Referenzgen *xpk* (Phosphoketolase) nach:

$$V = E^{(c_{HD} - c_K)}$$

V = x fache Induktion

E = Effizienz der Lightcycler PCR

c_{HD} = Crossing Point Hochdruck

c_K = Crossing Point Kontrolle

Die Effizienz der Lightcycler-PCR wurde für alle Primerpaare gleich 2,0 gesetzt. Primerpaare, die eine offensichtlich geringere Effizienz aufwiesen (Steigung der Fluoreszenzkurve) wurden gegen neue ausgetauscht. Sämtliche in dieser Arbeit für die Real-Time-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4C dargestellt.

2.3.9 Southern und Northern Blots

2.3.9.1 Markieren der Sonden

10×dNTP-Mix: 2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dGTP, 1,6 mM dTTP

DIG-dUTP-Stammlösung: 1 mM DIG-dUTP

Die Sonden für die Hybridisierung mit den Southern bzw. Northern Blots wurden mit Digoxigenin, das über alkali-labile Esterbindungen an dUTPs gekoppelt war (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate, alkali-labile, Roche Molecular Biochemicals), markiert. 50 µl PCR-Reaktionsansatz enthielten 2 µl 10×-dNTP-Mix, 1,0 µl DIG-dUTP-Stammlösung, 1 µmol je Primer, 2 U Taq-DNA-Polymerase und als Template 10 ng genomische DNA oder 10 pg Plasmid. Die PCR selbst wurde, wie in 2.3.6 beschrieben, durchgeführt. Der Erfolg der DIG-Markierung wurde gelelektrophoretisch überprüft, da DIG-markierte PCR-Produkte langsamer laufen als unmarkierte.

2.3.9.2 Southern Blots

2.3.9.3 Kapillarblot

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

Die nach 2.3.4.1 gewonnene DNA wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym (*EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII* oder *Vsp1*) verdaut (5 µg DNA und 5U Enzym je 100 µl) und anschliessend mit 2,56 V Ethanol (100%) und 0,11 V Isopropanol gefällt. Nach 45 min Zentrifugation bei 12000×g wurde die DNA in 75% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen. Die verdaut DNA wurde auf einem 0,7% (w/v) TAE-Gel aufgetrennt. Nach der Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid, wurde die DNA unter ständigen Schwenken in den entsprechenden Lösungen (s.o.) bis zum Umschlagen des Bromphenolblaus nach gelb depuriniert, dann denaturiert (2×15 min), neutralisiert (2×15 min) und kurz in 20×SSC äquilibriert. Die DNA wurde dann mit einem Kapillarblot (Abbildung 2.1) über Nacht mit 20×SSC als Blotting Puffer auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (*HybondTM-N+*, Amersham Biosciences) und schliesslich für 60 sec im UV-Licht mit einem UV-Transilluminator auf der Membran fixiert.

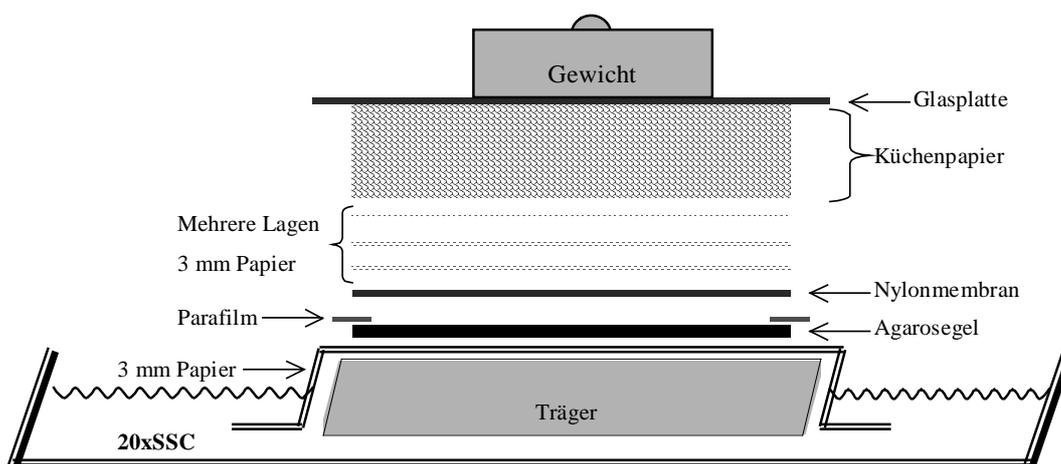


Abbildung 2.1: Aufbau des Kapillarblots

2.3.9.4 Hybridisierung

Standard-Hybridisierungspuffer: 5×SSC, 2% (v/v) Blocking Reagent; 0,02 (w/v)% SDS,
0,2% (w/v) N-Laurylsarcosin

Maleinsäurepuffer: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH=7,5

Low-stringency-Waschpuffer: 2×SSC, 01% (w/v) SDS

High-stringency-Waschpuffer: 0,5×SSC, 01% (w/v) SDS

Die Hybridisierungstemperaturen orientierten sich an Länge und GC-Gehalt der Sonden und der erwarteten Homologie zur Zielsequenz. Die Hybridisierungstemperatur (T_{Hyb}) wurde berechnet nach:

$$T_{\text{hyb}} = T_M - 25^\circ\text{C} - (x \cdot 1,4^\circ\text{C}) = 16,6 \log [\text{Mol Na}^+] + 0,41(\% \text{GC}) + 81,5 - 25^\circ\text{C} - (x \cdot 1,4^\circ\text{C})$$

T_m = Schmelztemperatur des Hybrids
%GC = GC-Gehalt der Sonde

x = % geringere Homologie als 80% der Sonde zur Zielsequenz
Mol Na⁺ = molare Na⁺-Konzentration im Hybridisierungspuffer

Für die Hybridisierungen wurden Homologien von 75% zwischen Sonde und Zielsequenz (x=5) als optimal empfunden, woraus Hybridisierungstemperaturen zwischen 55°C und 60°C resultierten.

Der Hybridisierungs-ofen (MWG Biotech AG, Ebersberg) wurde auf die berechnete Hybridisierungstemperatur vorgewärmt, bevor die positiv geladene Nylonmembran für 45 min mit 20 ml Hybridisierungspuffer prehybridisiert wurde. Währenddessen wurde die DIG-markierte DNA-Sonde 5 min bei 95°C denaturiert und anschliessend sofort auf Eis gekühlt. 7,0 µl der denaturierten Sonde wurden mit 20 ml Hybridisierungspuffer vermischt und für ca. 20 h mit der DNA auf der Nylonmembran hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 2×5 min bei Raumtemperatur in je 50 ml low stringency-Waschpuffer und anschliessend 2×15 min bei 65°C in high stringency-Waschpuffer gewaschen.

2.3.9.5 Immunologischer Nachweis

Waschlösung: Maleinsäurepuffer mit 0,3% (w/v) Tween 20

Detektionspuffer: 0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl; pH=9,5

Alle nun folgenden Schritte liefen bei Raumtemperatur ab. Die Membran wurde zunächst 5 min in 20 ml Waschlösung, dann 30 min in 50 ml Blocking-Lösung im Hybridisierungs-ofen inkubiert. Währenddessen wurde die Lösung der mit alkalischer Phosphatase verknüpften Anti-Digoxigenin-Antikörpern 5 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 5,0 µl zu 100 ml Maleinsäurepuffer gegeben und die Membran darin für 30 min geschüttelt, um anschliessend 2×15 min in je 50 ml Waschlösung gewaschen zu werden. Nach 5 min Inkubation in Detektionspuffer wurde die Membran

auf eine Plastikfolie gelegt, mit ca. 10 Tropfen CSPD gleichmässig benetzt, in die Plastikfolie eingeschweisst und im Dunkeln 5 min bei Raumtemperatur und 10 min bei 37°C inkubiert. Ein Röntgenfilm (Kodak® X-Omat AR-Film, XAR-2, 13×18 cm²) wurde in einer Filmkassette auf die eingeschweisste Membran aufgelegt und anschließend entwickelt (Kodak®GBX developer and replenisher, 2% Essigsäure, Kodak®GBX fixer and replenisher).

2.3.9.6 Stripping

Strippinglösung: 0,2 M NaOH, 0,5% (w/v) SDS in DEPC-H₂O_{bidest.}

Das verwendete DIG war über alkalilabile Esterbindungen an dUTP gekoppelt und ließ sich daher besonders effizient unter alkalischen Bedingungen entfernen. Zur Entfernung DIG-markierter Sonden, wurde die Membran kurz mit bidestillierten Wasser gespült und zwei mal für 15 min mit je 20 ml Strippinglösung bei 37°C im Hybridisierungsöfen gewaschen. Anschliessend wurde die Membran in 2×SSC äquilibriert, in Folie eingeschweisst und bis zur nächsten Hybridisierung zwischen 3 mm Papier bei 4°C gelagert.

2.3.9.7 Northern Blots

Die denaturierenden Agarosegele (2.3.7.2) wurden nach der Auftrennung der RNA-Proben zur Entfernung des Formaldehyds zunächst 10 min in bidestillierten DEPC-H₂O, dann 10 min in 20×SSC inkubiert. Es schlossen sich ein Kapillarblot (2.3.9.3), Fixieren der RNA, und die Detektion der Hybridisierungssignale, wie bei den Southern-Blots beschrieben, an. Bei der Hybridisierung gab es zwei Abwandlungen. Dem Standard-Hybridisierungspuffer wurde deionisiertes Formamid in einer Endkonzentration von 50% zugegeben. Im high-stringency-Waschpuffer wurde 0,1% SSC statt 0,5% SSC eingesetzt. Die Hybridisierung fand bei 50°C über Nacht statt. Bei der Herstellung aller Lösungen für die Hybridisierung und Detektion von Northern Blots wurde DEPC-behandeltes bidestilliertes Wasser eingesetzt.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Die Protein-Assay-Lösung (BioRad) wurde 1:5 mit H₂O_{bidest.} verdünnt. 990 µl wurden mit 10µl Probe kombiniert und die Extinktion gegen einen Blindwert bei 595 nm im Spektrophotometer gemessen. Für die Bestimmung des Proteingehalts wurde eine Eichkurve mit BSA aufgenommen.

2.4.2 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese kombiniert die isoelektrische Fokussierung zur Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt in der ersten Dimension mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse in der zweiten Dimension. Für die Herstellung aller Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.4.2.1 Probenvorbereitung

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

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

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

20 ml Vorkultur wurden einmal mit dem gleichen Volumen vortemperierten PBS-Puffer bei 30°C gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl SDS-Puffer aufgenommen und auf Eis stehend mit Ultraschall aufgeschlossen (3 Zyklen à 30 sec bei 680 W). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (12000×g/ 1h/ 4°C) und die Rohextrakte nach der Proteinbestimmung nach Bradford (2.4.1) bei -76°C eingefroren. Vor der isoelektrischen Fokussierung wurden die Rohextrakte 1:4 mit Harnstoffpuffer auf eine SDS-Konzentration von 0,25% (w/v) verdünnt und noch nicht gelöste Proteine durch 10minütige Zentrifugation bei 12000×g entfernt.

2.4.2.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Quelllösung: 6 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 1% (w/v) CHAPS; 0,4 % (w/v) DTT;
0,5% (v/v) Pharmalyte 3-10, pH=9,5

inertes Öl: PlusOne Immobiline DryStrip Cover Fluid

Die Rehydrierung der Gelfolien mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) (IPG-DryStrips: pH 4-7, 180×3mm, Amersham Biosciences) fand in einer Quellkammer (Amersham Biosciences) in der Quelllösung über Nacht statt. Die IPG-Streifen wurden luftblasenfrei auf 200 µl Quelllösung aufgelegt und mit inertem Öl überschichtet. Für die eigentliche isoelektrische Fokussierung wurden die mittlerweile rehydrierten IPG-Streifen nach Entfernen der Schutzstreifen mit H₂O_{bidest.} gespült. Die auf 20°C temperierte, mit Kerosin benetzte Kühlplatte der Fokussierungskammer wurden aufgelegt und zur besseren Wärmeübertragung mit inertem Öl überschichtet. Die Elektroden-Filterstreifen wurden in H₂O_{bidest.} getränkt, aufgelegt und alle 2 h gewechselt. Der Applikatorstreifen wurde in der Nähe der Anode angebracht und die Hälfte des aufzutragenden Probenvolumens sofort, die andere Hälfte erst

nach zwei Stunden Fokussierung, aufgetragen. Es wurde zunächst 8 Stunden bei 150 V, je eine weitere bei 300 V bzw. 600 V fokussiert, bevor dann die Spannung in einem Gradienten von 1500 auf 3500V erhöht wurde. Die Gesamtzahl an Voltstunden betrug 42 kWh. Nach der IEF wurden die Gelstreifen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült.

2.4.2.3 Äquillibrierung und Auftrennung nach Molekulargewicht

Äquillibrierungspuffer (ÄP): 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin; 2% (w/v) SDS;

50mM Tris-HCl (pH 8,8)

ÄP1: ÄP mit 1% (w/v) Dithiothreitol (DTT)

ÄP2: ÄP mit 4% (w/v) Iodacetamid

Glycerinlösung: 86 g Glycerin (87%), 63 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, 0,01% (w/v) Bromphenolblau

Gelpuffer: 90,8 g Tris mit 2 g SDS in 300 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und 4 N HCl auf pH8,6 einstellen, nach Filtration mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 500 ml auffüllen.

Gelpuffer-gesättigtes Butanol: 20 ml Gelpuffer mit 30 ml 2-Butanol ausschütteln, 2-Butanol dekantieren

Gellösung (13%): 422 ml 30% Acrylamidlösung, 250 ml Gelpuffer, 57,5 g Glycerin (87%), 55 µl TEMED, 7 ml Ammoniumpersulfat (10%), 263 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Tankpuffer: 19,9 g SDS, 299,6 Glyzin, 58,0 g Tris, 19,9 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Agaroselösung: 0,35 g Agarose, 49 ml Tankpuffer, aufkochen, 0,01% Bromphenolblau

Dieser Abschnitt der 2D-Gelelektrophorese wurde von Clarissa Schwab durchgeführt.

Nach der IEF wurden die Disulfidbrücken in den Polypeptidketten reduziert und die entstehenden SH-Gruppen durch Alkylierung geschützt. Dafür wurden die IPG-Streifen 10 min in ÄP1 und danach 10 min in ÄP2 äquillibriert.

Gelkassetten (Hofer Dalt, 20 cm×23cm für 1,5 mm dicke Gele) und Spacer wurden im Gelständer (Hofer Dalt Gel Caster) mit Plastikfolien getrennt, bevor die Gellösung eingefüllt und mit Gelpuffer-gesättigten Butanol überschichtet wurde. Nach Polymerisation der Gele (mind. 12 h) wurden die Gelkassetten voneinander getrennt und äquillibrierte, in Tankpuffer getauchte, abgetropfte IPG-Streifen luftblasenfrei auf je ein Polyacrylamidgel aufgelegt. Der auf Filterstreifen aufgebrachte, eingetrocknete Molekulargewichtsmarker (je 10µl Precision Plus Protein Standard 161-0363, Biorad) wurde ebenfalls aufgelegt, bevor IPG- und Filter-Streifen mit 3 ml Agaroselösung fixiert wurden. Die Gelkassetten wurden in die Kämme der vertikalen Elektrophoresekammer (Hofer DALT multiple Elektrophoresis Tank, Amersham Biosciences) gesteckt und die 2. Dimension gestartet. Der Probeneinlauf erfolgte für eine Stunde bei 200V/80mA, die weitere Auftrennung bei 165mA/200V.

Die Elektrophoresetemperatur wurde mit einem Wasserbad auf 15°C eingestellt. Die Elektrophoresedauer orientierte sich an der Bromphenolblaulauffront.

2.4.2.4 Silberfärbung [Blum et al, 1987, modifiziert]

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

Thiosulfatlösung: 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat in H₂O_{bidest.}

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

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

Stopplösung: 0,5% (w/v) Glyzin

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

Da der Versuch 3.4.3 weniger auf quantitative als qualitative Unterschiede zielte, wurden die Gele ohne vorangehende Coomassie-Blaufärbung direkt silbergefärbt. Silberfärbungen (>1 ng Protein pro Bande) haben gegenüber Coomassie-Blaufärbungen den Vorteil einer 10-100fach höheren Sensitivität (0,1-2 µg Protein pro Bande). Alle Lösungen für die Silberfärbung wurden erst kurz vor ihrem Einsatz hergestellt. Die Färbung wurde, wie in Tabelle 2.11 zusammengefaßt, durchgeführt

Tabelle 2.11: Ablauf der Silberfärbung

Schritt Nr.	Bezeichnung	Lösung	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
1	Fixieren	Fixierer	3 h	1
2	Waschen	H ₂ O _{bidest.}	30 min	3
3	Sensibilisieren	Thiosulfatlösung	1 min	1
4	Waschen	H ₂ O _{bidest.}	20 sec	3
5	Silberfärbung	Silbernitratlösung	20 min	1
6	Waschen	H ₂ O _{bidest.}	20 sec	2
7	Entwickeln	Entwickler	bis Proteinspots fast entwickelt	1
8	Waschen	H ₂ O _{bidest.}	20 sec	1
9	Stoppen des Entwickelns	Stopplösung	5 min	1
10	Waschen	H ₂ O _{bidest.}	20 sec	1
11	Schrumpfen	Schrumpflösung	15 min	1

2.5 shot-gun Genomsequenzierung

2.5.1 Anzahl der notwendigen Klone/ Erforderliche Insertlänge

Die Genbank sollte nicht nur zu shot-gun-Sequenzierung des Genoms verwendet, sondern auch für die Herstellung des Mikroarrays genutzt werden. Sie sollte daher das 1,4 Mbp große Genom [Zapparoli et al., 1998] von *L. sanfranciscensis* DSM 20451^T mit 90% Wahrscheinlichkeit theoretisch einmal abdecken. Um die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass auf dem Mikroarray pro Spot mehr als ein bis zwei ORFs vorhanden sind, sollten die Fragmente nicht länger als 1.800 bp sein. Bei einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 1500 bp ergibt sich nach

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

N= Anzahl der benötigten Klone einer Genbank

f= Verhältnis Fragment zur Genomgröße

P=Wahrscheinlichkeit, dass jede chromosomale Sequenz in der Genbank vorhanden ist

eine erforderliche Anzahl von 2000 Klonen.

2.5.2 Anlegen der Genbank

Zum Anlegen einer shotgun-Genbank mit genomischer DNA aus *L. sanfranciscensis* DSM 20451^T wurden zwei parallele Ansätze verfolgt. Zum einem wurde die DNA mit *Bsu*RI und *Alu*I partiell verdaut, zum anderen mit Ultraschall für 40s bei 7W auf Eis geschert (UW2070 Ultrasonication Processor, Bandelin, Berlin). Fragmente mit einer Größe von 800-1800bp wurden aus TAE-Gelen isoliert (E.Z.N.A Gel extraction kit, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). *Bsu*RI und *Alu*I gewonnene Fragmente wurden direkt, gescherte DNA erst nach einem Auffüllen und 5' Phosphorylierung der Enden mit einem DNA-Terminator-Kit (Lucigen® Corporation, Biocat, Heidelberg) in den bereits linearisiert erworbenen Vektor psmart-HCAmp (Lucigene®) ligiert. *Escherichia coli* DH5 α und *Escherichia coli* cloniTM wurden mit den Plasmiden transformiert.

Zur Absicherung, dass Redundanzen in der Genbank innerhalb eines akzeptablen Rahmens liegen, wurden 100 zufällig ausgewählte Inserts sequenziert und die Ergebnisse ausgewertet, bevor mit der eigentlichen Sequenzierung begonnen wurde. Die Genbank wurde bei -20°C in 20% Glycerin in Mikrotiterplatten gelagert, und alle 6 Monate durch Ausstreichen auf LB mit Ampizillin (Tabelle 2.7) überimpft. Die Beschriftung der einzelnen Klone richtet sich nach den Mikrotiterplatten. So bezeichnet 15-7H z.B. den Klon in Position 7H der Mikrotiterplatte 15.

2.5.3 Sequenzierung

Die Plasmide wurden mit dem Montagé Plasmid Miniprep₉₆-Kit (Millipore; siehe 2.3.5) und dem MWG-Roboseq® 4204S isoliert und von einem kommerziellen Anbieter mit den Primern SL1 und SR1 (Tabelle 2.4-A) sequenziert.

2.5.4 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzdaten wurden von den Plasmidsequenzen bereinigt. Der BLAST-(Biological Local Alignment Search Tool)-Algorithmus wurde verwendet, um Sequenzhomologien auf DNA und Proteinebene zu finden. Es wurde entweder die BLAST-Version bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oder EMBL (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2>) verwendet. Die durch die Sequenzhomologien bestimmten Proteine wurden manuell anhand der COGs (Cluster of Orthologous groups) eingeordnet. Sequenzalignments wurden mit ClustalW, das manuelle Zusammensetzen einzelner Sequenzen mit DnasisMax (Hitachi) ausgeführt.

Sämtliche, bis Januar 2004 erhaltenen Sequenzen wurden zusätzlich im Rahmen des bioinformatischen Praktikums „practical genome orientated bioinformatics“ des Lehrstuhls für Genomorientierte Bioinformatik der TU München einer automatischen, vorläufigen Annotation unterzogen. Aus den in diesem Rahmen erhaltenen Contigs, konnte die manuelle Annotation überprüft und Codon-Usage abgeleitet werden. Weiterhin wurden die Contigs auf bereits sequenzierte tRNAs und rRNA-Operons gescannt.

2.6 Hochdruckbehandlung

Bei allen Hochdruckversuchen, mit Ausnahme der Proben für die 2-D-Gele (2.4.2), wurden sterile Schraubröhrchen mit der Zellsuspension bis zum Rand befüllt, luftblasenfrei verschlossen und mit Parafilm umwickelt. Druckaufbau- und Druckabbaurate waren jeweils 200 MPa/min. Als Druckflüssigkeit wurde Polyethylenglykol verwendet.

2.7 Mikroarray Produktion

Einen Überblick über den Ablauf der Mikroarrayanalyse gibt Abbildung 2.2. Das Spotten der Proben und Einscannen der Mikroarrays wurde von Frau von Rad (Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF) übernommen.

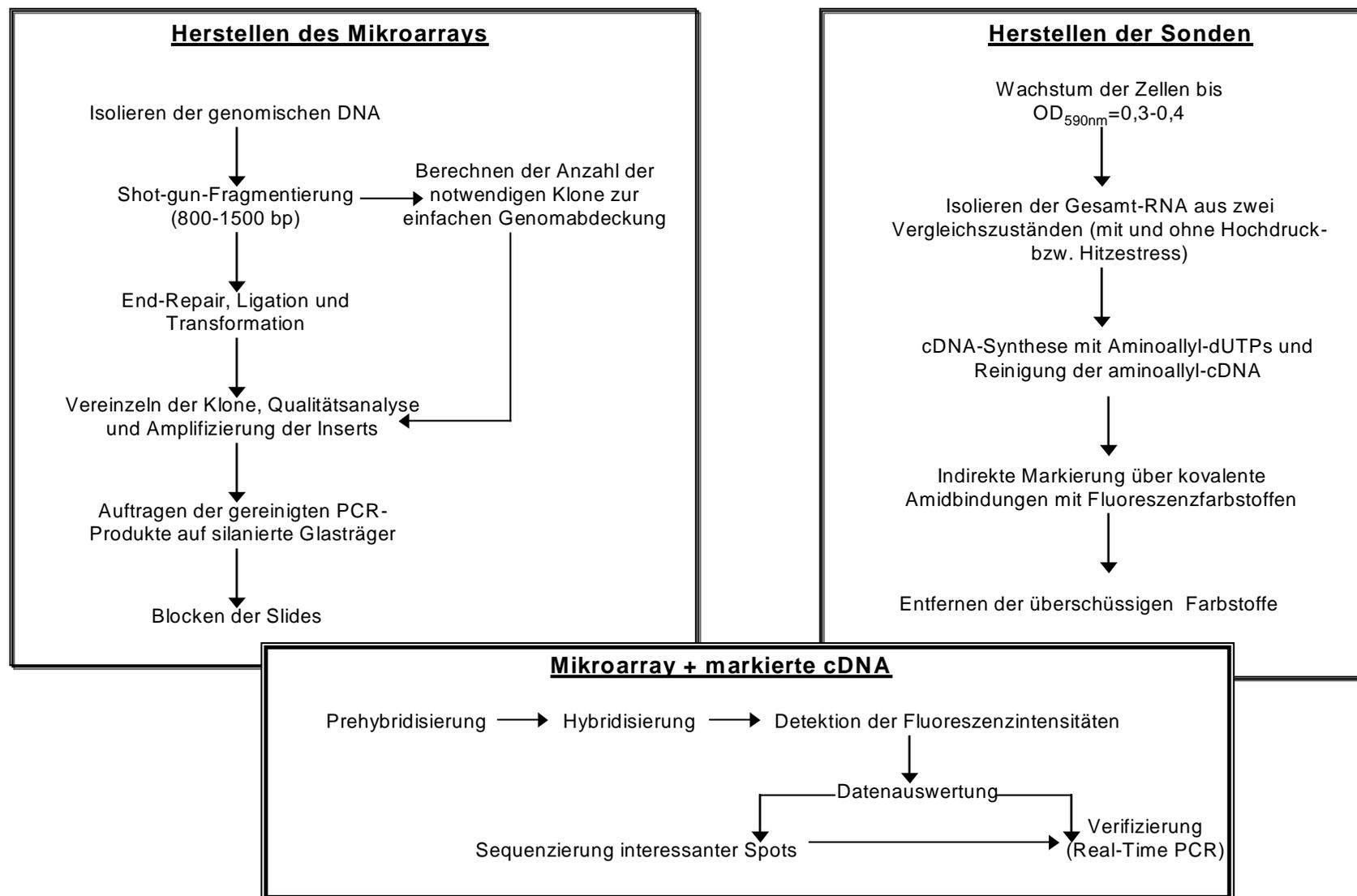


Abbildung 2.2: Überblick über den Ablauf der Mikroarrayanalyse

2.7.1 Herstellen der zu spottenden Proben

2000 Klone mit Insert wurden auf LB mit Ampizillin-Platten vereinzelt und direkt als Template für die PCR eingesetzt. Die PCR (2.3.6) wurde im 100 µl Maßstab mit den Sequenzierprimern SR1 und SL1 (Tabelle 2.4A) mit Taq-DNA-Polymerase bei einer Annealingtemperatur von 56°C durchgeführt. Die Elongationszeit betrug 2min 30s. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch kontrolliert, gereinigt (QIAquick 96 PCR Purification Kit, Qiagen mit dem MWG-Roboseq® 4204S oder QIAquick 96 PCR Purification Kit Qiagen) und vakuumgetrocknet.

2.7.2 Screening-Array

Für den Screening-Array wurden 24×80 Proben in doppelter Ausführung auf je einen der silanierten Glasträger (CSS-100 silylated slides, CEL Associates, Houston Tex., USA) aufgetragen (2.7.4). Neben den PCR-Produkten aus der Genbank wurden dabei positive und negative Hybridisierungskontrollen gespottet. Als negative Hybridisierungskontrollen dienten 20×SSC und Alien-DNAs (SpotReport™ Alien™ cDNA Array Validation System, Invitrogen). Als positive Hybridisierungskontrolle wurde eine Verdünnungsreihe von genomischer *L. sanfranciscensis* DSM20451^T-DNA eingesetzt. Ferner wurde eine Reihe bereits bekannter Gene amplifiziert (2.7.1). Diese Gene waren entweder bereits als in *L. sanfranciscensis* hochdruckreguliert beschrieben oder galten als Kandidat eines nicht druckregulierten Referenzgens (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Hochdruckregulierte Gene (Scheyhing, 2002) und potentielle Referenzgene aus *L. sanfranciscensis* DSM20451T auf dem Screeningarray

Gen der/ von	AC-Nummer	Primer (Tabelle 2.4)	Zweck
Maltosephosphorylase	CAA11905	map_V und map_R	potentielles Referenzgen
Acetatkinase	AB035799	ack_V und ack_R	potentielles Referenzgen
Phosphotransacetylase	BAB19267	pAnf und pEnd	potentielles Referenzgen
Phosphoglukomutase	CAA11906	Pp4V_V und pp42	potentielles Referenzgen
clpL	AY912122	clpL_R und clpL_V	Hochdruckinduktion bekannt ^a
Ribokinase	-	rbk_R und rbk_V	Hochdruckinduktion bekannt ^a
DnaK	Q8KML6	dnaK_V und dnaK_R	Hochdruckinduktion bekannt ^a

a- auf Proteinebene [Scheyhing, 2002; Hörmann et al., 2006]

2.7.3 Verifizierungsarray

Auf den Verifizierungsarray wurden 76 Fragmente gespottet. Einerseits sollten mit diesem Array die Hybridisierungsergebnisse des Screeningarrays, andererseits Hypothesen die aus den Ergebnissen des

Screeningarrays abgeleitet wurden, überprüft werden. Daher wurden neben auf dem Screeningarray regulierten Genen, unter anderem weitere Stressgene (DnaK, DnaJ), GTPasen, und Transposasen untersucht. Die dafür erforderlichen Fragmente wurden wiederum aus den entsprechenden psmartHC-Amp-Klonen (2.5.2) amplifiziert. Als Hybridisierungskontrollen dienten weiterhin 20×SSC, Alien-DNAs und eine Verdünnungsreihe genomischer *L. sanfranciscensis* DNAs [vergleiche 2.7.2].

2.7.4 Übertragen der PCR-Produkte auf silanierte Glaträger und Immobilisierung

Spotting Puffer: 6×SSC (pH=7,2), 3 M Betain

PBS: 10 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH=7,2

Blocklösung: 3,5 g/L NaBH₄ in PBS, 27% Ethanol

Die aufgereinigten, vakuumgetrockneten PCR-Produkte wurden in 20 µl Spotting-Puffer verdünnt, in 384er Mikrotiterplatten pipettiert und mit einem Spotting-Roboter (GMS 417, Genetic Microsystems Robotics, Cambridge, UK) auf silanierte Glaträger (CSS-100 silylated slides, CEL Associates, Houston Tex., USA) aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden jeweils in Duplikaten auf jeden der Glaträger gespottet. Die Arrays wurden vor der Immobilisierung und Dehydrierung der gespotteten Proben für zwei Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Zur Immobilisierung bzw. Dehydrierung wurden die Arrays jeweils unter Schütteln erst zweimal für 2 min mit 0,1% SDS-Lösung, dann zweimal 2 min in bidestillierten Wasser und schliesslich 5 min in Blocklösung gewaschen. Nach weiteren 2 min Waschen der Arrays mit auf 95°C erwärmten bidestillierten Wasser, wurden sie 1 min in 0,1% SDS gewaschen, zweimal mit bidestillierten Wasser und einmal mit 100% Ethanol gespült. Die Arrays wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.8 Mikroarray-Analyse

2.8.1 Herstellen der Sonden

2.8.1.1 mRNA-Isolierungsbedingungen

Eine Übernachtskultur von *L. sanfranciscensis* wurde in mMRS 0,5% überimpft und bei 30°C und 0,1 MPa bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bis 0,4 bebrütet. Anschliessend wurden die Zellen in sterilen, mit Parafilm umwickelten Schraubröhrchen für 30 min bzw. 4h einem subletalen Druck von 45 MPa oder 80 MPa (2.6) ausgesetzt. Für Hitzeschockversuche wurden die Zellen bei der gleichen optischen Dichte in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen für 10 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Sofort nach der Hochdruckbehandlung oder dem Hitzeschock wurde RNA-Protect (Qiagen, Hilden) zu den Zellen pipettiert und die RNA mit TRIzol isoliert (vergleiche 2.3.4.2). Parallel wurde die RNA aus nicht hochdruck- oder hitzebehandelten Zellen isoliert.

2.8.1.2 Fluoreszenzmarkierung der Sonde

10×Aminoallyl-dUTP-Nukleotid-Mix: 5,0 mM dATP, 5,0 mM dCTP, 5,0 mM dGTP,
1,5 mM dTTP, 3,0 mM Aminoallyl-dUTP

Markierungspuffer: 25 mg Na₂CO₃/ml LiChroSolv[®]

Die Markierung der Proben bestand aus zwei Schritten. Zunächst wurde die mRNA unter Inkorporation von Aminoallyl-dUTP in cDNA umgeschrieben, dann die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor[®]555 bzw. Alexa Fluor[®]647 über die eingeführten Amingruppen kovalent gebunden.

Die Erststrang-cDNA-Synthese lief bis zum RNase H-Verdau und Inaktivierung beider Enzyme wie in 2.3.8 beschrieben ab. Allerdings wurde der 10×Nukleotid-Mix durch den 10×Aminoallyl-dUTP-Nukleotid-Mix ersetzt. Damit Farbstoffe nicht von nicht in die cDNA eingebauten Aminoallyl-dUTPs gebunden werden, musste die cDNA aufgereinigt werden. Hierfür wurde das MinElute[®]PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Der mitgelieferte Waschpuffer wurde durch 75% Ethanol ersetzt. Die gebundene, aminmodifizierte cDNA wurde drei Mal statt einmal gewaschen und in 10 µl LiChrosolv[®] eluiert.

10 µl der gereinigten, aminmodifizierten cDNAs wurden mit 6 µl Markierungspuffer und dem in 4 µl DMSO gelösten Farbstoff (Alexa Fluor[®]555 reactive dye und Alexa Fluor[®]647 reactive dye, Molecular Probes) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Überschüssige Farbstoffe wurden mit dem MinElute[®]PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) entfernt. Auch hier wurde der Waschpuffer durch 75% Ethanol ersetzt, drei Mal gewaschen und in 10 µl LiChrosolv[®] eluiert. Nach der Reinigung wurden je zwei mit dem gleichen Farbstoff markierte cDNAs einer Versuchsbedingung (Hochdruckbehandelt oder keine Hochdruckbehandlung) gepoolt und vakuumgetrocknet.

2.8.2 Hybridisierung der Mikroarrays

50×Denhardt´s-Lösung: 1,0% (w/v) Ficoll, 1,0% Polyvinylpyrrolidon, 1,0% BSA

Prehybridisierungspuffer: 6×SSC, 1% BSA, 0,5 % SDS

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 6×SSC, 0,5% SDS, 5×Denhardt´s-Lösung

low stringency Waschpuffer: 1×SSC, 0,1% SDS

high stringency Waschpuffer: 0,1×SSC, 0,1% SDS

Zur Hybridisierung wurden sowohl die Alexa Fluor[®]555 als auch die Alexa Fluor[®]647 markierten, vakuumgetrockneten cDNA´s in je 25 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert, kombiniert, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt. Währenddessen wurden die Mikroarrays für 45 min bei 42°C prehybridisiert, mit bidest. H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Die Hybridisierung fand in

Hybridisierungskammern (MWG Biotech, Ebersberg) in einem 42°C warmen Wasserbad über Nacht statt. Es schlossen sich ein 10minütiges Waschen in low stringency Waschpuffer und 5minütiges Waschen in high-stringency Waschpuffer an. Die Arrays wurden dann noch kurz in in high-stringency Waschpuffer und bidestilliertem H₂O gespült und luftgetrocknet. Sowohl die Hybridisierung als auch die Waschschriffe fanden unter Lichtausschluß statt.

2.8.3 Einlesen der DNA-Mikroarrays und Auswertung

Nach der Hybridisierung wurden die Mikroarrays in einem Axon GenePix 4000 Scanner eingelesen. Dafür wurden beide Fluorophore jeweils einzeln bei 565 nm bzw. 635 nm angeregt und die jeweilige Fluoreszenzintensität bei einer Auflösung von 10 µm pro Pixel ermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der GenePix Pro 4.0 Software. Als „lower treshold“ wurde die Hintergrundfluoreszenz, berechnet als der Median der Fluoreszenzsignale um die jeweiligen Spots, gewählt. War die Fluoreszenzintensität des Spots nicht mindestens doppelt so hoch, wie die Hintergrundfluoreszenz, wurde dieser Spot nicht mit in die Auswertung einbezogen. Da der Hintergrund innerhalb eines Arrays starken Schwankungen unterliegen kann, wurde er für jeden Spot einzeln berechnet. Daten der Spots, die diese Analyse bestanden wurden in Excel kopiert und normalisiert. Im Fall des Screening-Arrays wurde das mittlere Expressionsverhältnis aller Spots wurde gleich 1,0 gesetzt (Annahme: absolute Menge der mRNA verändert sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht). Dabei stellte sich heraus, das *xpk* als nicht druckreguliertes Referenzgen herangezogen werden kann. Im Fall des Verifizierungsarrays wurden die Daten dann im Verhältnis zu *xpk* normalisiert. Gene, deren Transkriptmenge eine mehr als zweifache Veränderung auf mindestens zwei der Arrays einer Versuchsbedingung aufwiesen, wurden als induziert oder reprimiert angesehen. Erst nach dieser Auswertung wurden die Expressionswerte des Screening- und des Verifizierungsarrays, für Gene die auf beiden Arrays waren, miteinander verrechnet. Um zu verhindern, dass die unterschiedlichen Eigenschaften beider Fluoreszenzfarbstoffe (Inkorporation in die cDNA, unterschiedliche molare Fluoreszenzeigenschaften) zu einer Verfälschung des Expressionsprofils führen, wurden „dye-swaps“ durchgeführt. Tabelle 2.13 fasst die Versuchsbedingungen und die Wiederholungen zusammen.

Tabelle 2.13: Versuchsbedingungen und Wiederholungen auswertbarer Arrays

	Array	Versuchsbedingungen	Wiederholungen
1	Screening Array	45 MPa/ 30 min im Verleich zu 0,1 MPa	3 ^a
2	Verifizierungsarray	-“-	4 ^a
3	Verifizierungsarray	42°C , 10 min im Vergleich zu 30°C	2 ^a
5	Screening Array	45 MPa/ 4 h im Verleich zu 0,1 MPa	1 ^b
6	Screening Array	80 MPa/ 4 h im Verleich zu 0,1 MPa	1 ^b

^a Dye-Swaps wurden durchgeführt.

^b Diese Versuche wurden im Rahmen der Optimierung der Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind nicht dargestellt.

2.8.4 Verifizierung

Die Ergebnisse des Screeningarrays wurden durch einen Verifizierungsarray (2.5.1.1.2) und Real-Time-PCRs (2.3.8) überprüft. Für beide Verifizierungen wurde die Phosphoketolase als Referenzgen verwendet. Die in der Real-Time PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4C dargestellt.

2.9 Referenzgenbestimmung

Nachdem durch die Mikroarrayanalyse das Gen der Phosphoketolase *xpk* als nichtdruckreguliert identifiziert worden war, mußte kontrolliert werden, ob *xpk* auch als Referenzgen in Real-Time-PCRs geeignet ist. Voraussetzung dafür ist, das nur eine Kopie dieses Gens im Genom von *L. sanfranciscensis* vorhanden ist und auch ansonsten keine unspezifischen Hybridisierungssignale auftreten. Dafür wurde eine *xpk*-spezifische Sonde (Primern *xpk_{for}* und *xpk_{rev}*, Tabelle 2.4F) mit DIG-dUTPs markiert (2.3.9.1) und mit einem Southern Blot hybridisiert (2.3.9). Die komplette *xpk*-Sequenz ist in Datenbanken unter der AC-Nummer AJ586560 hinterlegt.

2.10 Einfluss von mRNA-Stabilität auf die Genexpression unter Hochdruck

Veränderungen im Transkriptionsmuster unter Hochdruck können entweder auf eine hochdruckinduzierte Regulation des Gens und damit stärkerer oder schwächerer Transkription oder veränderte mRNA-Stabilität zurückzuführen sein. Um den Einfluss der mRNA-Stabilität zu untersuchen, muss die Transkription als Einflussfaktor ausgeschlossen werden. Dafür werden Transkriptioninhibitoren wie Rifampicin oder Rifamycin eingesetzt. Zusätzlich muss gewährleistet sein, das der Transkriptioninhibitor auch unter Hochdruck wirkt und keinen Einfluss auf die mRNA-Stabilität des nicht druckregulierten Referenzgens, hier *xpk*, hat

2.10.1 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Rifampicinkonzentration

Die Bestimmung der Rifampicinkonzentration, bei der *L. sanfranciscensis* innerhalb von 24 Stunden gerade nicht mehr wuchs (minimale inhibitorische Konzentration=MIC), wurde in mMRS4 mit Verdünnungsreihen von Rifampicin durchgeführt. Das Wachstum wurde bei 30°C und 590 nm in mit Paraffin überschichteten Mikrotiterplatten (96well, flacher Boden, Sarstedt) mit dem Spektrophotometer verfolgt (SpectraFluor, Tecan).

2.10.2 Wirkung von Rifampicin unter Hochdruck

Rifampicin kann unter Hochdruck eine andere MIC haben, als unter atmosphärischen Druck. Eine Bestimmung des MICs in Verdünnungsreihen unter Hochdruck ist zu aufwendig. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob der MIC von 0,1 MPa auch auf 45 MPa zu übertragen ist. *L. sanfranciscensis*-Kulturen (OD=0,3) wurden in mMRS4 mit der MIC von Rifampicin bei 0,1 MPa und der Rifampicinkonzentration bei der gerade noch Wachstum bei 0,1MPa zu beobachten war, für 24 Stunden unter Hochdruck (45 MPa) inkubiert.

2.10.3 Versuchsdurchführung

Eine *L. sanfranciscensis*-Kultur wurde in der exponentiellen Wachstumsphase auf zwei Röhren aufgeteilt, abgetrennt und in mMRS4 ohne Rifampicin resuspendiert. Je eine der Kulturen wurde für 30 min bei 0,1 MPa bzw. 45 MPa inkubiert (Abbildung 2.3), bevor RNA-Protect (Qiagen) zugegeben und die RNA mit TRIzol (peqlab) isoliert wurde (2.3.4.2). Um der Zelle die Möglichkeit zur Reaktion auf subletalen Hochdruck zu geben, wurde eine weitere Kultur erst für 10 min bei 45 MPa ohne Rifampicin inkubiert, bevor Rifampicin entsprechend der MIC-Konzentration (3 µg/ ml) zugegeben und die Kultur weitere 30 min einem Druck von 45 MPa ausgesetzt wurde. Entsprechend wurde mit der Rifampicinbehandlung bei 0,1 MPa verfahren. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der Real-Time-PCR eingesetzt (2.3.8). Zunächst wurde nur die mRNA-Stabilität von *xpk* und *hsp60* untersucht.

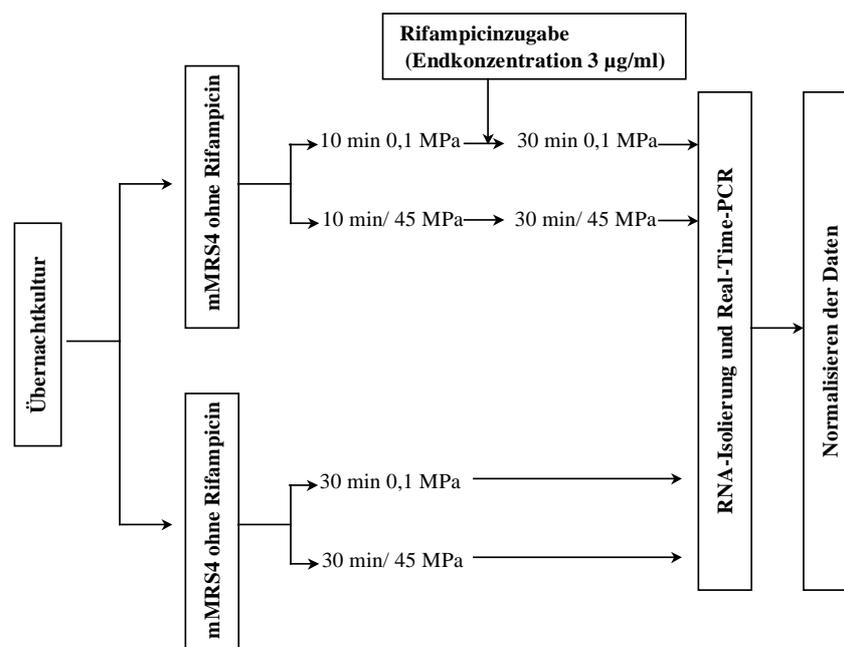


Abbildung 2.3: Einfluss von Hochdruck auf die *in vivo* mRNA-Stabilität- Veranschaulichung des Versuchsablaufs.

2.11 Charakterisierung der Hochdruckmutante

2.11.1 Erzeugen der Hochdruckmutante

Zur Erzeugung einer Hochdruckmutante von *L. sanfranciscensis* wurde eine Übernachtskultur bei $OD_{590\text{ nm}} = 0,3$ abgetrennt, in frischem mMRS4 resuspendiert und für 25 Wachstumszyklen (ca. 1000 h) bei einem Druck von 50 MPa inkubiert. Nach diesen 25 Wachstumszyklen wurde die Kultur auf mMRS4-Platten ausplattiert und aus Einzelkolonien Glycerinkulturen angelegt. Eine dieser Einzelkolonien (Hochdruckmutante 5) wurde für die folgende weitere Charakterisierung ausgewählt und vor jedem Experiment mindestens zweimal ohne weitere Hochdruckbehandlung überimpft, um sicherzustellen, dass Veränderungen im Verhalten gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen auf Mutationen und nicht nur Adaptationen zurückzuführen sind.

2.11.2 Isolieren der Streptomycinresistenten Mutante

L. sanfranciscensis wurde auf mMRS4-Platten mit einem Streptomycinkonzentrationsgradienten ausplattiert. Eine einzelne Kolonie, die noch bei hohen Streptomycinkonzentrationen wuchs wurde isoliert. Für diese streptomycinresistente Mutante wurde, ebenso wie für den *L. sanfranciscensis*-Wildtyp, die Streptomycinkonzentration bestimmt, bei der der jeweilige Stamm innerhalb von 24 h gerade nicht mehr wuchs. Die MIC-Tests wurden in mMRS4 in 1:2-Verdünnungsreihen von Streptomycin durchgeführt.

2.11.3 Wachstum unter Hochdruck

Zunächst wurde überprüft, ob durch die 25 Wachstumszyklen bei der Hochdruckmutante eine Mutation aufgetreten ist, die ihr ermöglicht bei erhöhten Drücken besser als der Wildtyp zu wachsen. Für diesen Versuch wurden Kulturen des Wildtyps, der Hochdruckmutante und der streptomycinresistenten Mutante bei einer optischen Dichte von 0,7 bis 0,8 abgetrennt, einmal mit mMRS4 gewaschen und in mMRS4 auf eine $OD_{590\text{ nm}}$ von 0,2 eingestellt. Ein Teil der Kultur wurde bei 0,1 MPa, der andere bei 50 MPa für jeweils 15 h bei 30°C inkubiert, bevor die Zunahme der optischen Dichte bestimmt wurde. Zusätzlich wurde für Wildtyp und Hochdruckmutante die Veränderung der KBE [2.2.2] bei 30°C und 50 MPa über je 48 h verfolgt.

2.11.4 Abtötungskinetik

Von den *L. sanfranciscensis* Kulturen (Wildtyp, Hochdruckmutante und streptomycinresistente Mutante) wurden bei einer $OD_{590\text{ nm}}$ von 0,5 2,5 ml aus mMRS4 mit oder ohne Mg-Mn-Lösung abgetrennt, im selben Volumen des jeweiligen Mediums resuspendiert und für 30 min bei 30°C einem Druck zwischen 0,1 und 400 MPa ausgesetzt. Anschliessend wurden die KBE bestimmt [2.2.2].

2.11.5 Wachstum bei Magnesium-Mangan-Limitierung

Um festzustellen, ob die erhöhte Hochdruckresistenz der Mutante auf eine höhere Resistenz gegenüber Magnesium-Mangan-(Mg-Mn)-limitierenden Bedingungen zurückzuführen war, wurde der Einfluss einer Mg-Mn-Limitierung auf Hochdruckmutante und Wildtyp untersucht. Übernachtskulturen wurden in mMRS4 angeimpft und abgetrennt (5000×g/ 10min/ 30°C). Die Zellen wurden zweimal in mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung gewaschen und in mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung auf eine OD_{590nm} von 1,0 eingestellt. Mit dieser Zellsuspension wurde mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung 0,5% angeimpft. Ein Teil dieses Mediums wurde über Nacht im Brutschrank bei 30°C bebrütet. Von dem anderem Teil wurden je 200 µl in mehreren parallelen Ansätzen in 96er-Mikrotiterplatten (flacher Boden, Sarstedt) pipettiert und mit je 50 µl Paraffin überschichtet (1. Überimpfen). Das Wachstum wurde bei 30°C und 590 nm mit dem Spektrophotometer verfolgt (SpectraFluor, Tecan), indem alle 30 min die OD gemessen wurde. Vor jeder Messung wurde die Platte 30 sec geschüttelt. Nach 24 Stunden wurde die Messung gestoppt und eine zweite Mikrotiterplatte mit den Kulturen in mMRS4 aus den Brutschrank pipettiert und wie beschrieben vermessen (2. Überimpfen).

2.11.6 Temperaturabhängiges Wachstum

Der *L. sanfranciscensis* Wildtyp und die Hochdruckmutante wurden in der stationären Phase geerntet und in mMRS4 auf eine OD_{590 nm} von 1,0 eingestellt. mMRS4 wurde mit dieser Zellsuspension 0,5% angeimpft, in mehreren parallelen Ansätzen zu je 200 µl in 96well-Mikrotiterplatten (flacher Boden, Sarstedt) pipettiert und mit je 50 µl Paraffin überschichtet. Die Wachstumsraten wurden bei 590 nm mit dem Spektrophotometer verfolgt (SpectraFluor; Tecan), indem alle 30 min die optische Dichte gemessen wurde. Vor jeder Messung wurde die Platte 30 sec geschüttelt.

2.11.7 Empfindlichkeitstests gegenüber Antibiotika

Der *L. sanfranciscensis* Wildtyp und die Hochdruckmutante wurden in der stationären Phase geerntet und in mMRS4 auf eine OD_{590 nm} von 1,0 eingestellt. 40 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden auf mMRS4-Platten mit je 20 ml mMRS4 ausplattiert. Plättchen mit 500 µg Spectinomycin bzw. Polymyxin, 400 µg Kasugamycin, 200 µg Streptomycin, 125 µg Trimethoprim, 116,2 µg Paromomycin, 100 µg Puromycin, 50 µg Ampicillin, 30 µg Amikazin, Cefozolin, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin, Piperacillin, Teicoplanin, Tetracycline, Tobramycin bzw. Vancomycin, 25 µg Spiramycin, 10 µg Amoxicillin, Gentamycin bzw. Meropenem oder 5 µg Ciprofloxacin bzw. Enrofloxacin wurden auf die mMRS4-Platten aufgelegt. Die Platten wurden bei 30°C für 48 h bebrütet. Die Antibiotikaempfindlichkeitstests wurden dreimal bzw. wenn Unterschiede zu sehen waren, fünfmal wiederholt.

2.11.8 Versuchsbedingungen für 2D-Gele

Für die 2-D-Gele wurden *L. sanfranciscensis* Wildtyp und die Hochdruckmutante bei einer optischen Dichte von 0,5 für je 30 min bei 30°C einem Druck von 80 MPa ausgesetzt. Nach der Hochdruckbehandlung wurden die Kulturen für weitere 30 min bei 30°C und 0,1 MPa bebrütet, bevor die Zellen aufgeschlossen wurden. Für den Zellaufschluß nach 2.4.2.1 wurden je 20 ml der hochdruckbehandelten und unbehandelten Kulturen eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine und die Auswertung der 2D-Gele wurden wie in 2.4.2 beschrieben, ausgeführt.

2.11.9 Sequenzieren der 16S-Operons

Zum Zeitpunkt des Versuchs wurde aufgrund früher Southern-Blot-Hybridisierungen von 6 rRNA-Operons ausgegangen [Ehrmann und Vogel, 2001]. Um jedes Operon mit 95% Wahrscheinlichkeit einmal zu sequenzieren, war eine zufällige Auswahl von 48 *E. coli*-Klonen, in die das 16S-Amplikon kloniert wurde, notwendig. Der verwendete Vektor war pBad MycHis B (Invitrogen). Primer zur Amplifizierung des 16S-Amplikons waren 616V-*Hind*III und 630R-*Pst*I (Tabelle 2.4D). Zur Vermeidung von Amplifizierungsfehlern wurde statt der Taq-DNA-Polymerase, eine Pfu-DNA-Polymerase (Promega) gewählt. Die nach 2.3.4.3.2 gereinigten Plasmide wurden mit dem Primer pBadscreening (Tabelle 2.4A) sequenziert. Das Alignment ist Anhang 7.3 dargestellt. Parallel wurde das gesamte 16S-Amplikon mit dem Primern 616V und 630R sequenziert (Tabelle 2.4D/ Abschnitt 3.4).

2.11.10 Ableiten der tmRNA-Sequenz

Die Universalprimer L11 und L12 für die Amplifizierung von tmRNAs grampositiver Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wurden zuvor von Schönhuber et al. abgeleitet [2001]. Die Annealingtemperatur der PCR lag bei 43°C, für die Elongationszeit wurden 30 sec gewählt. Das PCR-Produkt wurde auf einem TAE-Gel aufgetrennt. Das Fragment der passenden Größe von 390 bp wurde ausgeschnitten, mit dem E.Z.N.A. Gel Extraktionskit aufgereinigt (peqlab) und in den Vektor pSTBlue-1 (pSTBlue1-AcceptorTor™ Vektor Kit, Novagen) ligiert. Ein Teil des Plasmids wurde sequenziert, der andere zur Markierung mit DIG-dUTPs eingesetzt (2.3.9.1).

2.11.11 Quantifizierung der tmRNA-Induktion

Die entwickelten Röntgenfilme der Northern-Blots wurden im Durchlichtscanner eingescannt. Die Spots wurden anschliessend mit Hilfe der Software Image Master II (Amersham Biosciences) quantifiziert.

2.12 Vitamin-B12-Biosynthese

2.12.1 Test auf Wachstum in modifizierten Vitamin-B12-freiem-Medium

Durch das Wachstum verschiedener Stämme auf Vitamin-B₁₂-freiem-Medium sollte getestet werden, ob diese Stämme Vitamin-B₁₂ selbst synthetisieren können. Das Vitamin-B₁₂-Assay-Medium enthielt als einzige Kohlenstoffquelle Glukose. Um das Wachstum der *L. sanfranciscensis*-Stämme dennoch zu begünstigen, wurde das Medium zusätzlich mit 10g/L Maltose und 10g/L Fruktose supplementiert (modifiziertes Vitamin-B₁₂-Assay-Medium (mVB₁₂AM)). Für den Wachstumstest wurden die Stämme zunächst in mMRS4 oder MRS4 (Tabelle 2.1) angeimpft. Die Übernachtskulturen wurden dann dreimal mit mVB₁₂AM gewaschen, 1% in mVB₁₂AM angeimpft und bei der optimalen Wachstumstemperatur inkubiert (Tabelle 2.1). Um sicherzustellen, dass das Wachstum auf mVB₁₂AM nicht von Medienresten oder noch gespeicherten Vitamin-B12 herrührt, wurden Stämme, die in der 2-10 Tage dauernden Adaptationsphase gewachsen sind, weitere zweimal in mVB₁₂AM überimpft, bevor das Wachstum für positiv befunden wurde.

2.12.2 Vitamin-B12-Bioassay

PBS: ,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄; 0,20 g/L KCl; 8 g/L NaCl; pH=7,0

Cyanocobalamin-Stammlösung: 100 mg/L

Für den Vitamin-B₁₂-Bioassay wurden Übernachtskulturen der zu testenden *L. sanfranciscensis*-Stämme zweimal mit je 10 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und anschliessend in PBS-Puffer auf eine optische Dichte von 8,0 bei 590 nm eingestellt. Die Zellen wurden auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen (3 Zyklen zu je 90s). Zellfragmente wurden bei 4°C durch Zentrifugation (12000×g/45min) abgetrennt. Der Rohextrakt wurde sterilfiltriert und der Proteingehalt der Proben bestimmt (2.4.1). Das mit *L. delbrueckii* ssp. *lactis* TMW 1.168 beimpfte Vitamin-B12-Assay-Medium wurde mit Zellextrakten in verschiedenen Konzentrationen supplementiert. Der pH-Wert aller Fermentationen lag am Anfang bei 6,0. Das Wachstum von *L. delbrueckii* ssp. *lactis* TMW 1.168 wurde bei 590nm in mit Paraffin überschichteten Mikrotiterplatten verfolgt (Spektrafluor, Tecan). Als Kontrolle wurde das Wachstum von *L. delbrueckii* ssp. *lactis* TMW 1.168 sowohl in Vitamin-B₁₂-Assay-Medium mit sterilfiltrierten Cyanocobalamin (Endkonzentrationen 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 und 50,0) und ohne Zusatz von Zellextrakten oder Cyanocobalamin bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Genomsequenzierung

3.1.1 Sequenzierung

Ein Ziel dieser Arbeit war es mit den zur Verfügung stehenden 2500 Sequenzierreaktionen einen möglichst hohen Anteil des Genoms von *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T zu sequenzieren. Dafür bewährt haben sich shot-gun-Sequenzierungen, in denen genomische DNA zufällig fragmentiert und in *E. coli* Plasmide kloniert wird. Theoretisch wären bei der gewählten Fragmentgröße (\varnothing 1500) 2000 Klone, also mindestens 4000 Sequenzierreaktionen für eine einfache Abdeckung des Genoms notwendig gewesen. Von den 2500 von einem kommerziellen Anbieter durchgeführten Sequenzierungen führten 70% zu auswertbaren Sequenzdaten.

3.1.2 Gengehalt

Das komplette Genom von *L. sanfranciscensis* besteht aus 1,4 Mbp [Zapparoli et al., 1998] mit, der bisherigen Sequenzierung zufolge, einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 38,4 %. Im Verlauf dieser Arbeit wurden ca. 24% (ca. 0,34 Mbp) des Genoms sequenziert. Ein Abgleich mit Datenbanken (siehe 2.5.4) zeigte, dass diese 0,34 Mbp für 635 Proteine kodieren. 115 dieser Proteine (=18%) ähneln nicht näher charakterisierten Genen anderer Organismen. Die meisten dieser nicht näher charakterisierten Gene (57%) sind homolog zu hypothetischen Proteinen aus *Lactobacillus plantarum*. Eine Aussage über Anzahl und Vorhandensein von ORFs ohne Ähnlichkeit zu (hypothetischen) Proteinen in Datenbanken ist, aufgrund der geringen Menge an Sequenzdaten, noch nicht möglich. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Klassifizierung der bisher ansequenzierten Proteine. Eine detaillierte Auflistung ist in Anhang 7.1 einzusehen. Mögliche Redundanzen in dieser Auflistung können zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.1: Übersicht über die funktionale Klassifizierung der bisher sequenzierten, potentiell protein-kodierenden Gene in *Lactobacillus sanfranciscensis*

Funktionale Klassifizierung	Anzahl der ansequenzierten Gene	
	absolut	% ^a
Aminosäurebiosynthese	13	2,0
Purine, Pyrimidine, Nukleoside und Nukleotide	32	5,0
Fettsäure und Phospholipidbiosynthese	22	3,5
Biosynthese von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen	18	2,8
zentraler intermediärer Metabolismus	16	2,5
Energiestoffwechsel	51	8,0
Transporter	95	15,0
DNA-Metabolismus	45	7,1
Transkription	21	3,3
Proteinsynthese	60	9,4
Proteinabbau	17	2,7
Regulatoren	26	4,1
Zellhülle	35	5,5
zelluläre Prozesse	45	7,2
andere Kategorien	24	3,8
hypothetische Proteine	115	18,1

^a Einige Gene konnten mehr als einer Klasse zugeordnet werden.
Die Summe aller Klassen beträgt daher mehr als 100%.

3.1.3 Regulatoren

Im Genom von *L. sanfranciscensis* ist mit mindestens drei Sigma-Faktoren zu rechnen. Unter den 26 bisher ansequenzierten Genen, die für Regulatoren kodieren, befanden sich zwei Sigma-Faktor-Gene (Sigma-Faktor 30 (*sigH*) und ein Sigma Faktor 24 Homologon). Zudem wurde das auch in *L. sanfranciscensis* zu erwartende Gen des primären Sigma-Faktor RpoD noch nicht sequenziert.

Weiterhin gibt es Gene für mindestens drei Zwei-Komponenten Regulatoren (*hprK*, *ptsk*, *rr11*), während nur ein globaler Regulator (*hrcA*) bisher identifiziert werden konnte. Transkriptions-Elongationsfaktoren (*greA*) waren ebenso vorhanden, wie Antiterminationsfaktoren (*nusA*). Die einzigen Transkriptionsregulatoren, die bisher aufgrund von Homologien bestimmten Genen/ Operons zugeordnet werden könnten, sind *kdgR* (Pektin-Abbau-Operon), *malR* (Maltose-Operon-Repressor), *purR* (Purine Biosynthese-Operon-Repressor) und *ctsR*. Der CtsR-Repressor reguliert Klasse III Hitzeschockgene, auf die bereits in der Einleitung genauer eingegangen wurde (siehe 1.2.1) und die auch an der Reaktion von *L. sanfranciscensis* auf subletalen Hochdruck eine Rolle spielen (siehe 3.3 und 4.3.3.3). Southern-Blots mit *ctsR* als spezifische Sonde zeigten, dass es zwei *ctsR*-Homologe im Genom von *L. sanfranciscensis* gibt. Innerhalb der Sequenz der *ctsR*-spezifischen Sonde gab es weder Schnittstellen für *VspI*, *HindIII* noch *EcoRV*. Für alle drei Restriktionsendonukleasen sind jedoch zwei Hybridisierungsbanden zu erkennen (Abbildung 3.1).

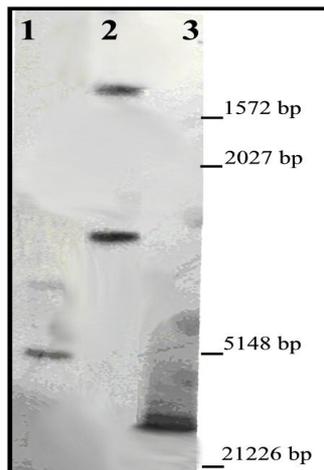


Abbildung 3.1: Southern-Blot-Hybridisierung mit einer *ctsR*-spezifischen- Sonde. Genomische DNA von *L. sanfranciscensis* DSM20451^T wurde mit *HindIII* (Bande 1), *VspI* (Bande 2) oder *EcoRV* (Bande 3) verdaut. Keine dieser drei Restriktionsendonukleasen hatte eine Erkennungssequenz innerhalb der *ctsR*-spezifischen Sonde.

3.1.4 Proteolyse

L. sanfranciscensis ist an das proteinreiche Medium Sauerteig adaptiert. Die Aufnahme von Aminosäuren ist essentiell für das Wachstum von *L. sanfranciscensis*. Deren Abbau wiederum trägt zur Aromabildung in Sauerteig bei und hat eine dementsprechend hohe Anzahl an Genen für verschiedene Aminosäuretransporter (wie Lysin, Glutamin, verzweigte Aminosäuren), zwei Di- und Tripeptidtransporter (*dtpT*, *ptr2*) und ein ABC-Typ-Oligonukleotid-Transportsystem (*oppA*, *oppB*, *oppD*, *oppF*). Zum Abbau der Peptide (Proteine) tragen mindestens zwei membrangebundene (FtsH und eine CAAX-Proteasae) und 13 cytoplasmatische Proteasen (PepC, PepI, PepN, PepO, PepR, PepT, PepV, PepX, Ffh, ClpAP, ClpXP, DacA, Peptidase der M20/M25/M40 Familie) bei.

3.1.5 Adaptation an Stress

Eine schnelle und effiziente Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ist für das Durchsetzungsvermögen von Milchsäurebakterien in industriellen Prozessen entscheidend.

Unter den bisher ansequenzierten Genen von *L. sanfranciscensis* konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die für Stressproteine kodieren. Darunter waren z.B. Gene für Kälteschockproteine der Klasse I (NusA) und Klasse II (RecA, GyrA, IF-2) oder für als Hitzeschockproteine eingeordnete konservierte Chaperone (GroES, GroEL, DnaK, DnaJ, GrpE, ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpL, ClpX) und energieabhängige Proteasen (ClpAP, ClpXP, FtsH). Weiterhin wurden bereits Gene für Proteine der oxidativen Stressresistenz (GshR, TrxA, TrxB, RecA, Nox, Hpo), Osmotoleranz (Glycin-Betain/Carnitin/Cholin-Transporter) und natürlich Säuretoleranz (wie die

F₁F₀-ATPase, malolaktisches Enzym, Na⁺/H⁺-Antiporter, Ffh oder UvrA) identifiziert. Einige dieser Gene werden auch in der Reaktion auf subletalen Hochdruck induziert (siehe 3.3).

3.1.6 Vermutliche Adhesionsfaktoren

Adhesionsfaktoren sind Oberflächenproteine und Polysaccharide, die das Binden von Bakterien an Oberflächen (anderer Zellen) fördern. Zu diesen Oberflächenproteinen gehören die von *L. sanfranciscensis* kodierten kollagenbindenden Proteine (*cnB*), „aggregation promoting“ Faktoren (*aggH*, *apfI*), Lipoproteine oder Teichonsäurebiosyntheseproteine (*tagB3*). Weiterhin wird eine Reihe von polysaccharidbildenden Proteinen, wie eine Levansukrase, Dextransukrasen, Galaktosyltransferase, Rhamnosyltransferase und weiteren, nicht näher charakterisierten Glykosyltransferasen, kodiert (siehe Anhang 7.1).

3.1.7 RNAs

3.1.7.1 rRNAs

Die Anzahl der rRNA-Operons in *L. sanfranciscensis* wurde über Southern-Blots abgeschätzt. Zunächst mußten Restriktionsendonukleasen gefunden werden, die in keiner der 16S-rRNA-Sequenzen schneiden. Aufgrund fehlender Informationen über Unterschiede in den einzelnen 16S rRNA-Sequenzen, hat eine bioinformatische Analyse die Anzahl der in Frage kommenden Restriktionsendonukleasen nur eingegrenzt. Erst ein Restriktionsverdau des 16S rDNA-PCR-Produktes (Primer 616V/630R) zeigte, dass *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* und *VspI* keine Schnittstelle innerhalb der 16S-rRNA-Gene haben (Abbildung 3.2-A). Mit diesen Enzymen wurde dann die genomische DNA von *L. sanfranciscensis* für den Southern Blot fragmentiert. Die Hybridisierung des Blots mit einer 16S rDNA-spezifischen Sonde deutet darauf hin, dass *Lactobacillus sanfranciscensis* mindestens sieben rRNA-Operons hat (*EcoRI* verdaute DNA, Abbildung 3.2-B).

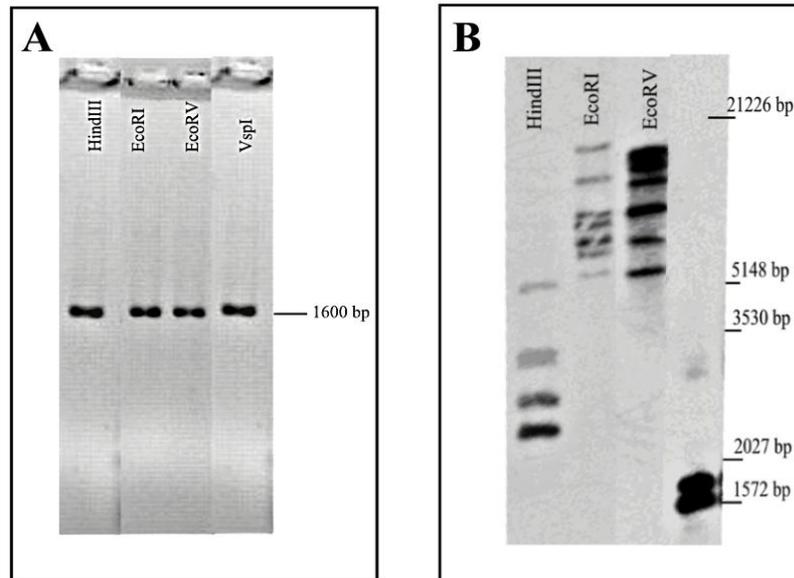


Abbildung 3.2: 16S-rRNA-Kopien in *Lactobacillus sanfranciscensis*

- A) Ethidiumbromidgefärbtes Gel des Restriktionsverdaus des 1572 bp langen PCR-Produkt des 16S rRNA-Amplikons (Primer 616V/630R) mit *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV und *Vsp*I
- B) Hybridisierung von *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV und *Vsp*I verdauter genomischer *L. sanfranciscensis*-DNA mit einer 16S rDNA-spezifischen Sonde (Primer 616V/630R).

Einige der Unterschiede zwischen den 16S rRNAs der einzelnen rRNA-Operons konnten im Verlauf der partiellen Genomsequenzierung aufgeklärt werden. Die 16S rRNA-Sequenz aus der Datenbank eingeschlossen, sind vier verschiedene vollständige 16S rRNA-Sequenzen (Operon A bis D) und je ein Unterschied am Anfang (bp 411 Operon E) bzw. Ende (bp 1501) in partialen Sequenzen der 16S rRNAs bekannt (Anhang 7.3). Es handelt sich bei diesen Unterschieden, abgesehen von Operon C, um den Austausch einzelner Basen. Operon C unterscheidet sich an Position 72 in 5 bp (TTGAT zu AATCA) von den anderen 16S rRNA-Sequenzen. Weiterhin konnten bisher vier 5S rRNAs und sechs 23S rRNAs sequenziert werden (Daten nicht dargestellt).

3.1.7.2 tRNAs und 10S RNA (*ssrA*)

Bisher konnten 19 tRNAs für 14 Aminosäuren sequenziert werden (Tabelle 3.2). Auf das vorhandene 10S-RNA-Gen (*tmRNA/ssrA*) wird in Abschnitt 3.4.5 näher eingegangen.

Tabelle 3.2: bisher sequenzierte Gene für tRNAs

Aminosäure	Anzahl	Score	Aminosäure	Anzahl	Score
Ala	2	85.72 und 85.72	Lys	1	82.78
Arg	1	70.19	Met	1	71.11 und 74.01
Asp	1	71.62			
Gln	1	63.99	Pro	1	86.81
Glu	1	63.41	Ser	1	60.22

Gly	1	85.44	Thr	1	91.58
Ile	2	92.01 und 92.01	Tyr	1	70.08
Leu	2	62.06 und 70.81	Undet	2	48.08 und 73.03

3.1.8 IS-Elemente, Transposasen und Prophagen

Es wurden acht eindeutig unterschiedliche IS-Elemente und weitere fünf Transposasen aus insgesamt sieben verschiedenen Familien identifiziert (Tabelle 3.3). Am häufigsten vertreten ist dabei die IS3-Familie. Über die Integrität der Gene ist noch keine Aussage möglich. Die Kopiezahl wurde mit Southern-Blot-Hybridisierungen abgeschätzt (siehe auch Abschnitt 3.5). ISLsf1 wird in 3.2.2 und ISLsf6 in 3.5 näher charakterisiert. Weitere potentielle Transposasen wurden zwar sequenziert, können aber aufgrund des partiellen Charakters der Sequenzen nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden (Anhang 7.1). Es wurden keine Prophagen gefunden. Allerdings ähneln die Integrase CodV, drei potentielle Transkriptionsregulatoren (ArpU, PspC und ein Bakteriophage EJ-1-Regulator) und der dGTP triphosphohydrolyase Inhibitor eines T7- Phagen-Proteins.

Tabelle 3.3: IS-Elemente und Transposasen in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T

IS-Element/ Transposase	Homologie zu	Kopien (mindestens)
IS1-Familie		
IS1	100% zu CAA11401 InsA (<i>E. coli</i>)	1
IS3-Familie		
ISLsf2	30% zu AAA56999 IS1223 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	4
ISLsf3	35% zu CAA53008 IS1163 (<i>Lactobacillus sakei</i>)	2
IS153	100% zu ACQ9RDW4 IS153 (<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>)	8
ISLsf5	95% zu CAA83672 iso-IS3 (<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	n.d. ^a
Transposase	56% zu NP_982063 Tranposase aus <i>Bacillus cereus</i>	n.d.
IS4-Familie		
Transposase von IS10	95% zu ACCAE55755 Transposase aus <i>E. coli</i>	n.d.
ISL3-Familie		
ISLsf4	98% zu CAA44487 IS1165 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	1
Transposase	34% zu AAR22505 Tranposase aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	n.d.
IS200/605-Familie		
ISLsf6	52% zu AAM09847 Transposase A: IS605 (<i>Enterococcus faecium</i>)	6
	48% zu YP_194712 Transposase B: ISfae4 (<i>Enterococcus faecium</i>)	
IS30-Familie		
ISLsf1	45% zu ACQ48600 IS1070 <i>Lactococcus lactis</i>	1
Mutator	Familie/	
IS256		
Transposase H1	99% zu AAK96240 Tranposase aus <i>Enterococcus hirae</i>	4
Transposase H2	51% zu AAK96240 Tranposase aus <i>Enterococcus hirae</i>	n.d.

^a n.d.: Mit diesen Transposasen oder IS-Elemente wurden keine Southern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt.

3.1.8.1 Codon-Usage

Aus den erhaltenen Sequenzdaten konnten 249 Contigs zusammengefaßt werden, nur längere Contigs wurden zur Generierung der Codon-Usage herangezogen (2.5.4). Die Menge der Daten reicht aber für eine zuverlässige, wenngleich auch zunächst vorläufige Codon-usage aus (persönliche Auskunft, Herr Rattei vom Lehrstuhl für Bioinformatik der LMU, Freising).

Tabelle 3.4: Codon-usage in *L. sanfranciscensis* (vorläufige Berechnung)

Amino-säure	Codon	%	Anzahl	Amino-säure	Codon	%	Anzahl	Amino-säure	Codon	%	Anzahl	
A	GCA	27	1210	K	AAA	73	2923	R	CGC	10	245	
	GCC	20	883		AAG	27	1059		CGG	13	308	
	GCG	10	430	L	CTA	8	443	S	CGT	40	962	
	GCT	43	1921		CTC	4	220		AGC	7	250	
C	TGC	24	79		CTG	4	213		AGT	26	883	
	TGT	76	251		CTT	17	899		TCA	33	1141	
D	GAC	23	806	TTA	46	2487	TCC	7	244			
	GAT	77	2747	TTG	21	1113	TCG	6	207			
E	GAA	90	3025	M	ATG	100	1683	TCT	20	687		
	GAG	11	355		N	AAC	37	1163	ACA	20	697	
F	TTC	31	766	AAT		63	1973	ACC	20	674		
	TTT	70	1743	P	CCA	49	1062	ACG	16	532		
G	GGA	36	1440		CCC	12	254	ACT	45	1524		
	GGC	11	423		CCG	9	200	V	GTA	19	808	
	GGG	11	452	CCT	30	652	GTC		12	535		
	GGT	42	1687	Q	CAA	86	2076	GTG	16	687		
H	CAC	35	455		CAG	14	336	GTT	53	2284		
	CAT	65	836	R	AGA	15	363	W	TGG	100	507	
I	ATA	4	183		AGG	3	59		Y	TAC	37	719
	ATC	20	896		CGA	19	444			TAT	63	1248
	ATT	76	3352									

3.2 Charakterisierung einzelner Gene

3.2.1 Vitamin-B12-Biosynthese

Bei der Genomsequenzierung wurden zwei Gene gefunden, die dem Cobalaminbiosyntheseweg zuzuordnen sind: das Gen der Cobyrynsäuresynthase *cobQ* und eines für eine Tetrapyrrolmethylase. Tetrapyrrolmethylasen katalysieren Reaktionen der anaeroben Cobalaminbiosynthese zwischen Precorrin 2 und Precorrin 6A. Die Cobyrynsäuresynthase amidiert Adenosylcobyrynsäure-a,c-diamid unter Entstehung von Cobyrynsäure. Der gesamte Cobalaminbiosyntheseweg ist in Anhang 7.5 dargestellt. Die Sequenz von *cobQ* war nur partial bekannt. In der Hoffnung, *cobQ* könnte mit anderen Genen der Vitamin-B12-Biosynthese in einem Operon organisiert sein, wurde mit inverser PCR (Primer *cobQ*inv_V1/_V2 und_R1; Tabelle 2.4 E) zunächst die *cobQ*-Sequenz vervollständigt und anschliessend die flankierenden Gene ermittelt. Abbildung 3.3 stellt die genomische Organisation von *cobQ* und dem Tetrapyrrolmethylase-Gen schematisch dar. Beide Sequenzen sind in Anhang 7.2 einzusehen.

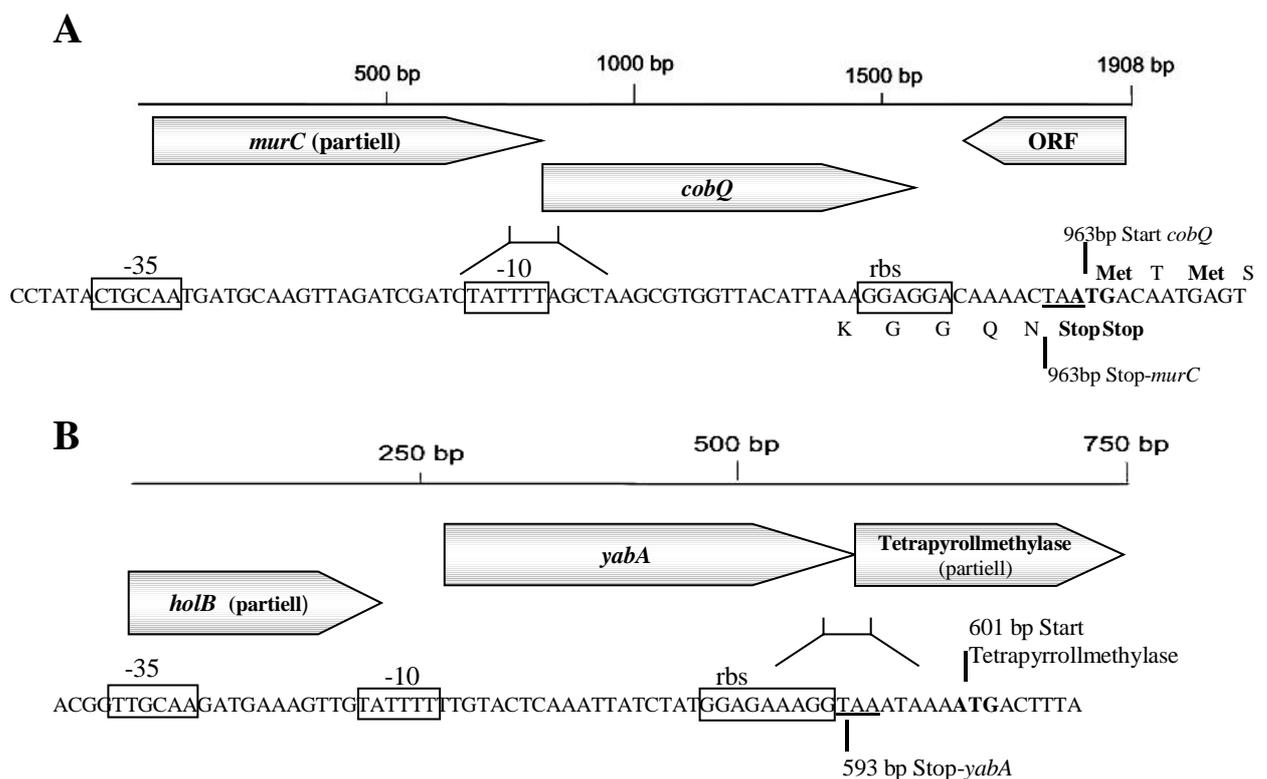


Abbildung 3.3: Organisation von *cobQ* (A) und dem Gen der Tetrapyrrolmethylase (B) im Genom von *L. sanfranciscensis*. Potentielle -10 und -35 Promotorbereiche sind ebenso wie die vermutliche Ribosomenbindestelle (rbs) gekennzeichnet. *yabA*=Transportproteinhomologon, *holB*= DNA-gerichtete DNA-Polymerase III, *murC*= UDP-N-acetylmuramat-Alanin-Ligase

Beide Gene verfügen über eigene potentielle Promotorregionen. Weder im Fall der von *cobQ* noch bei dem Gen der Tetrapyrrolmethylase sind in der Umgebung weitere Gene, die der Vitamin-B12-Biosynthese zuzuordnen sind, vorhanden. Weitere Gene dieses Stoffwechsels konnten daher in dieser

Arbeit nicht identifiziert werden. Um sicherzugehen, dass *cobQ* in *L. sanfranciscensis* TMW 1.53 auch aktiv ist, wurde geprüft, ob es in mMRS4 transkribiert wird. Dafür wurde RNA aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR mit den Primern *cobQ*-nde-V1 und *cobQ*-bamH1-R1 und entweder isolierter RNA, cDNA oder genomischer DNA als Template zeigt, dass das *cobQ* in *L. sanfranciscensis* transkribiert wird (Abbildung 3.4).

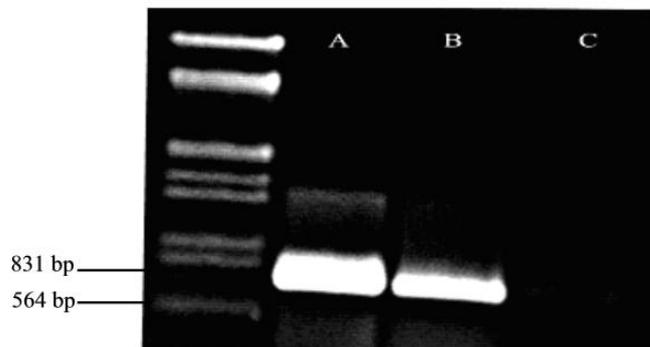


Abbildung 3.4: Transkription von *cobQ* aus *L. sanfranciscensis* DSM20451^T in mMRS4 ohne Vitaminzusatz. Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel der PCR mit den Primern *cobQ*-nde-V1 und *cobQ*-bamH1-R1 und (A) DNA, (B) cDNA oder (C) RNA als Template.

Nachdem die Voraussetzung eines aktiven transkribierten Gens innerhalb der Cobalaminbiosyntheseweges gegeben war, wurde untersucht, ob verschiedene *L. sanfranciscensis* Stämme, aber auch andere Laktobazillen Cobalamin (zumindestens aus Vorstufen) synthetisieren können. Dafür wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zunächst wurde getestet, ob die Stämme auf modifizierten cobalaminfreiem Medium wachsen können. Zweimaliges Überimpfen wachstumspositiver Stämme in mVB₁₂AM schloss dabei aus, dass dieses Wachstum auf Reste gespeicherter Cobalamine zurückzuführen ist. Mit Zellextrakten ausgewählter *L. sanfranciscensis*-Stämme wurde dann ein Vitamin-B₁₂-Assay durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Fähigkeit zum Wachstum auf cobalaminfreiem Medium auf eine eigene Vitamin-B₁₂-Biosynthese und nicht auf den fürs Wachstum fehlenden Bedarf an Vitamin-B₁₂ zurückzuführen ist. Für diesen Vitamin-B₁₂-Assay wurde das Wachstum des für Cobalamin auxotrophen *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* TMW 1.168 auf mit den Zellextrakten supplementierten VB₁₂AM verfolgt. Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse des Wachstumstests und des Vitamin-B₁₂-Assay zusammen. Einige, aber nicht alle der getesteten *L. sanfranciscensis*-Stämme können Cobalamin produzieren. Die meisten anderen getesteten Laktobazillen können zumindest auf Vitamin-B₁₂-freiem Medium wachsen.

Tabelle 3.5: Screening verschiedener Laktobazillen auf ihre Fähigkeit zur Synthese von Vitamin-B12. Wachstum auf mVB12AM wurde erst dann für positiv befunden, wenn sie nach zweimaligen Überimpfen auf mVB12AM immer noch wuchsen. Der Bioassay mit *L.delbrueckii* TMW 1.168 sollte sicherstellen, dass dieses Wachstum auf die Cobalaminbiosynthese und nicht auf den fehlenden Bedarf an Cobalaminen zurückzuführen ist.

Stamm		Wachstum auf mVB12AM	Wachstum von <i>L.delbrueckii</i> TMW 1.168 mit Zellextrakt aus
<i>L. delbrueckii</i>	TMW 1.168	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.53	+ ¹	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.52	+	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.54	+	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.392	+	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.396	+	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.632	+	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.636	+	+
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.647	+	+
<i>L. plantarum</i>	TMW 1.1	+	n.g. ³
<i>L. brevis</i>	TMW 1.57	+	n.g.
<i>L. farciminis</i>	TMW 1.68	+	n.g.
<i>L. hammesii</i>	TMW 1.1236	+	n.g.
<i>L. reuteri</i>	TMW 1.55	+	n.g.
<i>L. reuteri</i>	TMW 1.106	+	n.g.
<i>Lactobacillus</i> species	TMW 1.225	+	n.g.
<i>L. curvatus</i>	TMW 1.27	- ²	n.g.
<i>L. frumenti</i>	TMW 1.652	-	n.g.
<i>L. pontis</i>	TMW 1.56	-	n.g.
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.618	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.620	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i>	TMW 1.625	-	-

¹ (+) Wachstum ² (-) kein Wachstum ³ (n.g.) nicht getestet

Eine quantitative Abstufung der einzelnen Stämme hinsichtlich ihres Vitamin-B₁₂-Biosynthesevermögens war mit den ungereinigten Zellextrakten im Bioassay nicht möglich. Der Zellextrakt enthielt Stoffe, die bei höheren Konzentrationen das Wachstum von *L. delbrueckii* TMW 1.168 inhibierten und eine eindeutige Beziehung zwischen der Zunahme der OD_{590nm} und der Menge des eingesetzten Gesamtproteins aus den Zellextrakten unmöglich machte (Abbildung 3.5).

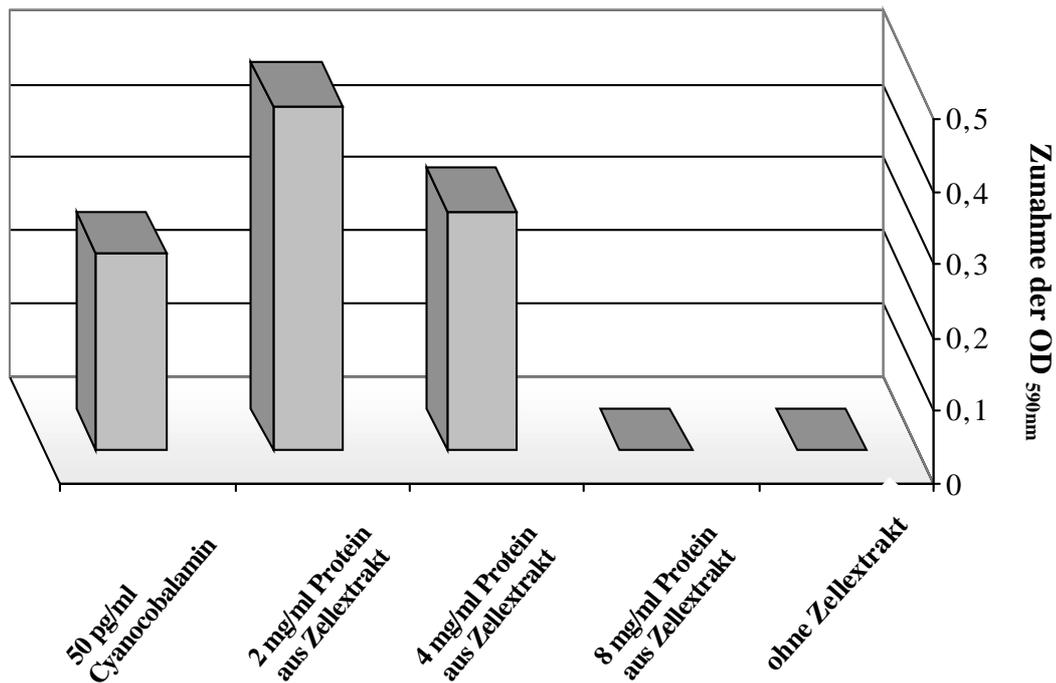


Abbildung 3.5: Einfluss der Konzentration des Zellextraktes aus *L. sanfranciscensis* TMW 1.52 auf das Wachstum von *L. delbrueckii* TMW 1.168. Dargestellt ist die absolute Zunahme der optischen Dichte von *L. delbrueckii* TMW 1.168 in VB₁₂AM nach 20 h bei 37°C mit verschiedenen Mengen Zellextrakt, berechnet als mg Protein aus Zellextrakt je ml Medium, aus *L. sanfranciscensis* TMW 1.52.

3.2.2 Charakterisierung von ISLsf1

Ein Ergebnis der Genomsequenzierung war, dass im Genom von *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T trotz der geringen Größe, eine hohe Anzahl von IS-Elementen und Transposasen vorkommt (3.1.8). ISLsf1 wurde zur genaueren Charakterisierung ausgewählt. Für diesen Zweck wurde die Sequenz zunächst mit den Primern ISLsf1-invR3 und ISLsf1-invV1 (Tabelle 2.4E) mittels inverser PCR vervollständigt. Die Bindungspositionen der Primer sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

3.2.2.1 Einordnung von ISLsf1 in die IS30-Familie

Die Sequenzanalyse der Transposase von ISLsf1 und der flankierenden Sequenzen zeigte, dass ISLsf1 zu der IS30-Familie von IS-Elementen gehört. Das gesamte IS-Element ist 1055 bp lang und kodiert für ein einzelnes ORF umgeben von 32 bp langen inverted repeats (IR). Der größte Teil der Sequenz kodiert für das ORF, dessen Stop-Codon mit dem rechten inverted repeat (IRR) zusammenfällt (Abbildung 3.7). Durch die Insertion von ISLsf1 wurden keine direct repeats (DR) gebildet. Allerdings ist der AT-Gehalt in den jeweils flankierenden 45 bp mit $\geq 76\%$ sehr hoch. Der G+C Gehalt von ISLsf1 entspricht mit 37,7% ungefähr dem von *L. sanfranciscensis* (36-38mol%). IS30-Elemente haben zwei Promotoren. Vom schwachen Promotor wird direkt aus dem Genom transkribiert. Der

starke Promotor entsteht erst bei der Transposition, bei der IS30-Elemente zyklisieren und die -35er Region des IR-R direkt vor der -10er Region des linken IR (IRL) liegt. Bei *ISLsf1* waren beide Promotoren wiederzufinden und sind in Abbildung 3.7 eingezeichnet.

In den 32 bp langen IRs von *ISLsf1* gab es sieben nicht passende Basenpaare. Ein Vergleich dieser IRs mit denen anderer IS30-Elemente zeigte das eine hohe Homologie zu ihnen vorliegt (Abbildung 3.6). Die IRs der anderen IS30-Elemente wurde von Vaughan und de Vos [1995] übernommen.

<i>ISLsf1</i>	IRL	TGGTAGA	T	T	G	T	A	A	AATTT	A	A	G	T	T	G	A	A	C	A	TATT
	IRR	TGGCAGA	T	T	G	C	A	A	GAAAT	A	A	C	T	T	G	A	A	C	A	AATT
<i>IS1070</i>	IRL	GGTAGA	T	T	G	T	A	A	AATTT	A	A	A	C	C	G	A	A	C	A	CT
	IRR	GGTAGA	T	T	G	C	A	A	GAAT	T	A	A	C	C	G	A	A	C	A	CT
<i>IS611</i>	IRL	TGCCCTA	T	T	G	T	A	A	AATG	A	A	G	T	G	C	A	A	C	A	CA
	IRR	TCCCTAA	T	T	G	T	C	A	AGTC	A	A	G	T	G	C	A	A	C	A	AA
<i>IS30</i>	IRL	TGTAGA	T	T	C	A	A	T	TGGT	C	A	A	C	G	C	A	A	C	A	
	IRR	TGTAGA	T	T	C	T	T	A	CTGT	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	
<i>IS4351</i>	IRL	GCTGGAA	T	T	C	A	A	C	TTGC	A	A	A	T	G	C	A	A	C		
	IRR	CTTGAG	T	T	C	A	A	C	TTAT	A	A	A	T	G	C	A	A	C		
<i>IS1086</i>	IRL	GGCGGC	C	T	C	A	A	A	TCTG	A	A	G	T	G	C	A	A	C	A	CC
	IRR	GGCGGT	T	T	C	A	A	G	TGCG	A	A	G	C	G	C	A	A	C	A	CC
<i>ISAS2</i>	IRL	CGGGAA	T	T	C	A	G	A	TAAT	A	A	G	T	G	C	G	A	C	A	CTC
	IRR	CGCGAA	T	T	C	A	A	C	TTCG	A	A	G	T	G	C	G	A	C	A	CTC

Abbildung 3.6: Alignment von inverted repeats (IR) der IS30-Familie. Grau unterlegte Nukleotide deuten konservierte Nukleotide an

Das 295 bp lange ORF von *ISLsf1* zeigt Homologien zu anderen Transposasen von IS30-Elementen, wie aus *Pediococcus pentasaceus* (95%, ZP_00322405.1), *Lactococcus lactis* (45% für *IS1070*, Vaughan und de Vos, 1995), *Leuconostoc mesenteroides* (44% ZP_000629531), oder *L. brevis* BAD81050 (43%) wobei das C-terminale Ende homologer (50% für *IS1070*) war als das N-terminale (40% für *IS1070*). Auch der theoretische pI der Transposase von *ISLsf1* von 10,26 spricht für ein DNA-bindendes Protein. Das ORF enthält zudem das für IS30-Transposasen typische DD(33)E(R) Motiv.

```

          ISLsf1 -v1   -10   →                               -35
1  TGG TAG ATT GTA AAA TTT AAG TTG AAC ATA TTG GTG GAC AGA AAA ACC CAT AAA GGT CTT
    -10                                     rbs
61 TAA TGG TGT CAC CAC AAC ATT CCA CTA GAA AGA AGG ACC TTT ATG GGC ACC ACT ATT TTA
                                     M G T T I L
121 TCA TTT GAA GAC CGC GTT GTC ATC GAA ACA CTT CAT CAT GAA AAG CAC TCA CTT CAA TAT
    S F E D R V V I E T L H H E K H S L Q Y
181 ATT GCC GAT TAT TTA GGC TTT AGT AAA ACC ACT ATC TTT AAT GAG GTT CAT CGC TTA GCT
    I A D Y L G F S K T T I F N E V H R L A ISLsf1-invR3
241 GGT GAG TAT CAC GCA GTT AAG GCT CAA ACT GAC CAT GAA GTT AAA CTT AGT CAT CGT GGT
    G E Y H A V K A Q T D H E V K L S H R G
301 CGT AAA ACC ATC TTA ACG ACT AAC CTA AAG CGA TTG ATT GAA GAA AAA ATC AAG ATC CAA
    R K T I L T T N L K R L I E E K I K I Q
361 AAA TGG TCA ATT GAA CAA GTG GCT CAT GTA GTT AGA ATT GCC TAC AAA ACC ATC TAT AAC
    K W S I E Q V A H V V R I A Y K T I Y N
421 TGG ATT GAT CAG GGA CTA CTG GAT ATT AAT GTG ACT GAT TTA CCT GAC CAT GGT ATT CGT
    W I D Q G L L D I N V T D L P D H G I R
481 CGC AAA CGA GCT AAA GAA ACC CGT GGT AGT TTT AGT CAT GGA CGT TCC ATC GAA AAT CGT
    R K R A K E T R G S F S H G R S I E N R
541 CCA GCT GAA ATT TCT GAT CGT AAT ACT TCA GGT CAC TTC GAA GCT GAT ACA GTT TTA TCT
    P A E I S D R N T S G H F E A D T V L S
601 GGA AAA CGT AAA GGT CAA GCA GTA GCT ACG TTT GTC GAG CGT AAG AGT CGG CTT ACC ATC
    G K R K G Q A V A T F V E R K S R L T I
661 GTT AAA CGG CTT AAT GGA CGA GAT AGT ACT TCA ATG ACC AAG GCT ATT TTA GAA TTG GCT
    V K R L N G R D S T S M T K A I L E L A
721 AAC CAG TTA GGA GAT AAT CTC AAG ACC CTT ACT GTT GAC CAT GGG AAA GAA TTC GCC AAC
    N Q L G D N L K T L T V D H G K E F A N ISLsf1-R1
781 TAC AAT TTG ATT GAA GAA CAG GCC GGT GTT CCG CTG TAC TTT GCG CAC GCT TAT TCG CCA
    Y N L I E E Q A G V P L Y F A H A Y S P
841 CAT GAA CGA GGC AGT AAT GAA AAT CGC AAC CGA GTA CTA CGC CGC TTC ATT CCA AAG GTC
    H E R G S N E N R N R V L R R F I P K V
901 AAC CGA TTG ATG AGA TTA CCG ATG ATG AAT TGA TTC AAA TTA ACT GGT ATT TGA ATT CCC
    N R L M R L P M M N *
961 GAC CAC TCA AAT GTT TAA ATT GGC GAA CAC CGA TTG AGA TCT TTT TGC GTA ATC TGC GTT
    -35
1021 ACT AAA TTT GTT CAA GTT ATT TCT TGC AAT CTG CCA CAT ATT TAA AAA TAG

```

Abbildung 3.7: Nukleotidsequenz von ISLsfI und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz der Transposase. Die Nummerierung der Nukleotide beginnt beim ersten Nukleotid des linken inverted repeats. Inverted Repeats sind grau unterlegt. Shine Dalgarno-Sequenz (rbs) und die beiden potentiellen -10 bzw. -35 Promotorsequenzen sind unterstrichen. Das bei IS30-Elementen konservierte DD(33)E Motiv wurde wie die inverted repeats grau unterlegt. Die verwendeten Primer sind durch Pfeile eingezeichnet.

3.2.2.2 Ort der ISLsfI-Insertion und Transposaseaktivität

Um mit Southern-Hybridisierungen die Anzahl der ISLsfI-Kopien in *L. sanfranciscensis* DSM20451^T einschätzen zu können, wurde dessen genomische DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten. Eine der Restriktionsendonukleasen (*EcoRV*), hatte keine Erkennungsstelle innerhalb der ISLsfI spezifischen Gensonde (Synthesepimer ISLsfI_V1 und ISLsfI_R1, Tabelle 2.4F), die andere, *VspI*, schneidet einmal innerhalb dieser Gensonde (Abbildung 3.8).

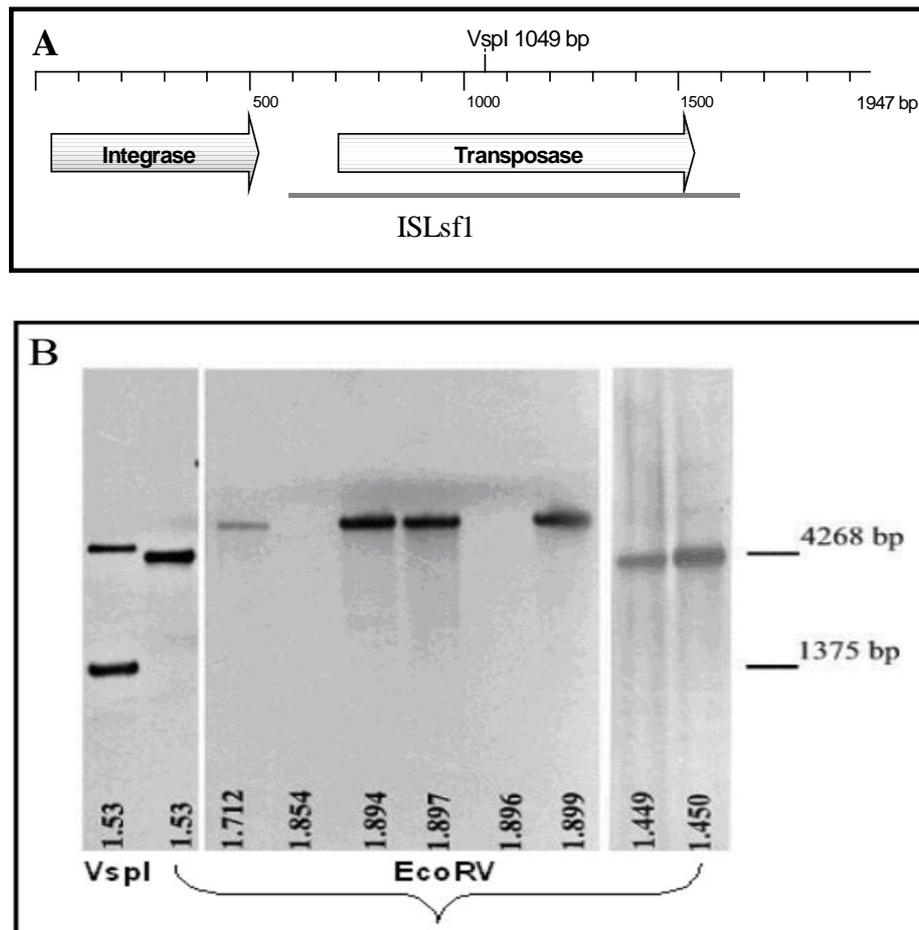


Abbildung 3.8: A) Insertion von ISLsfI ins Genom von *L. sanfranciscensis* DSM20451^T (TMW 1.53). B) Hybridisierung von *VspI* bzw. *EcoRV*-verdauter genomischer *L. sanfranciscensis* DNA mit einer spezifischen Sonde für das 1055 bp lange ISLsfI. Die Nummern geben die jeweilige TMW-Stammmnummer an (Tabelle 2.1)

Aus der Hybridisierung unter gering stringenten Bedingungen, mit dem *EcoRV*-Verdau resultierte nur eine Bande und, dazu korrespondierend, aus dem *VspI*-Verdau zwei Banden. Beides weist deutlich darauf hin, dass kaum mehr als eine ISLsfI-Kopien im Genom von *L. sanfranciscensis* DSM20451^T vorhanden ist. Die bekannten 300 bp downstream von ISLsfI sind weder auf Nukleotid noch auf Aminosäureebene zu bekannten Sequenzen homolog. Die Integrase, die 82 bp upstream des IS-Elements liegt, gehört zur Familie der Tyrosin-Rekombinasen. Innerhalb dieser 82 bp zwischen den Genen konnte keine Terminatorsequenz identifiziert werden.

Es existierte kein experimentelles System zum Nachweis der Transposaseaktivität in *L. sanfranciscensis*. Der ideale Abstand zwischen der -35 Region und -10 Region des bei der Transposition neu geformten Promotors war nicht bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit der Nachweis einer je nach Promotor veränderbaren Transposaseaktivität nicht geführt. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass das IS-Element transkribiert wird, wobei der Vorwärtsprimer auf dem IR-L lag (Abbildung 3.9).

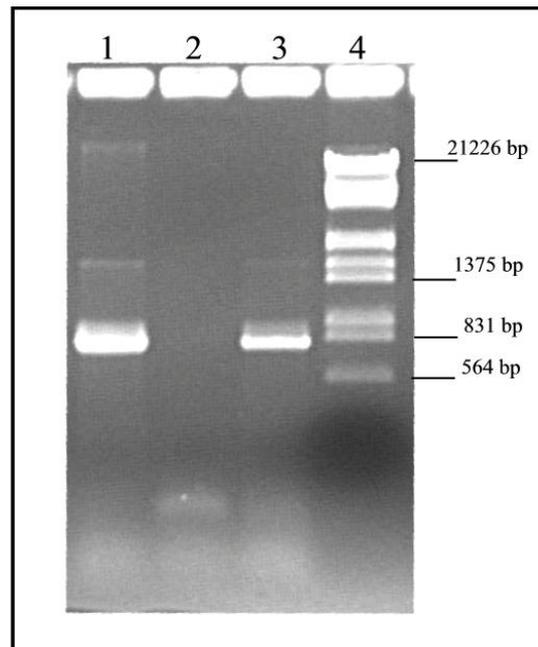


Abbildung 3.9: Transkription von ISLsfI in *L. sanfranciscensis* DSM20451^T. Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel der PCR mit den Primern ISLsf_V1 und ISLsf_R1: (1) genomische DNA, (2) mRNA oder (3) cDNA als Template. In Reihe (4) ist der Standard aufgetragen.

3.2.2.3 Vorkommen von ISLsfI

Die Anwesenheit von ISLsfI in anderen Milchsäurebakterien, vor allem anderen *L. sanfranciscensis*-Stämmen, wurde mittels PCR nachgewiesen und mit Southern-Blot-Hybridisierungen und Sequenzierungen stichprobenartig überprüft. Der Vorwärts-Primer der PCR, ISLsfI_V1 lag dabei auf dem linken IR, der Rückwärtsprimer ISLsfI-R1 auf dem ORF. Für die Southern-Blot-Hybridisierungen wurden die genomischen DNAs mit *EcoRV* verdaut und der DIG-markierten Sonde, für deren Synthese ebenfalls die Primer ISLsfI_V1 und ISLsfI_R1 verwendet wurden, hybridisiert. Tabelle 3.6 zeigt, dass ISLsfI in der Mehrheit der, aber nicht in allen, getesteten *L. sanfranciscensis*-Stämme vorkommt. Die Länge des *EcoRV*-Fragment, mit der die ISLsfI-spezifischen Sonde hybridisierte, unterscheidet sich dabei zwischen einigen Stämmen, wie beispielhaft in Abbildung 3.8 gezeigt wurde.

Tabelle 3.6: Vorkommen von ISLsfI in verschiedenen *L. sanfranciscensis*-Stämmen. Als Primer wurden ISLsfI-V1 und ISLsfI-R1 verwendet. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Länge von 820 bp.

<i>L. sanfranciscensis</i> Stamm			<i>L. sanfranciscensis</i> Stamm		
TMW	Herkunft	PCR-Produkt IS1070	TMW	Herkunft	PCR-Produkt IS1070
1.382	LTH 1730	-	1.631	Perugia (Ital.) E20	+
1.383	LTH 1728	-	1.636	Detmold/ Böcker Nr.2	+
1.385	LTH 1729	+	1.640	Detmold/ Böcker Nr.7	+
1.386	LTH 2583	- ¹	1.641	Detmold/ Böcker Nr.8	+
1.389	LTH 2593	- ¹	1.643	Detmold/ Böcker Nr.10	+
1.390	LTH 2592	-	1.710	Verona (Ital.) Sauerteigisolat B	+
1.391	LTH 2591	-	1.711	Verona (Ital.) Sauerteigisolat C	+
1.392	LTH 2590	+	1.712	Verona (Ital.) Sauerteigisolat D	+ ¹
1.393	LTH 2595	- ²	1.724	Verona (Ital.) 57G	+
1.395	LTH 2596	+	1.725	Verona (Ital.) S1	+
1.396	LTH 2597	-	1.73	ATCC 27653	+
1.449	LTH 2325	+ ¹	1.854	Lbsf-I/ BRS-Typ I	- ¹
1.450	ATCC 27651 ^T	+ ¹	1.894	ACA-DC 3362	+ ¹
1.52	LTH 2581	+ ¹	1.896	ACA-DC 3364	- ³
1.53	DSM 20451 ^T	+ ¹	1.897	ACA-DC 3365	+ ¹
1.54	LTH 1729	+ ¹	1.898	ACA-DC 3366	+ ¹
1.622	Italien/ Lac san 20	-	1.899	ACA-DC 3367	+ ¹

¹ bestätigt durch Southern Blot-Hybridisierungen

² Hybridisierung war positiv.

³ Es war zwar ein PCR-Produkt vorhanden, das aber war kleiner als erwartet (200 bp statt 820). Southern Blot-Hybridisierungen mit einer ISLsfI-spezifischen Sonde zeigten, das *L. sanfranciscensis* TMW 1.896 kein ISLsfI ähnliches IS-Element hat.

In keinem der anderen getesteten Milchsäurebakterien konnte ISLsfI nachgewiesen werden (Tabelle 3.7). Sowohl die PCR als auch Hybridisierungen waren in allen Fällen negativ. Eine Ausnahme bildeten *L. plantarum* TMW 1.38 und *L. brevis* 1.384. Beide Male führte die PCR zu schwachen Bande der erwarteten Größe. Die Sequenzierung dieser Banden und die Southern-Blot-Hybridisierung beider DNAs zeigte aber, dass auch diese beiden Stämme kein ISLsfI-homologes IS-Element haben.

Tabelle 3.7 Vorkommen von IS*l*I in anderen Milchsäurebakterien als *L. sanfranciscensis*. Als Primer wurden ISLsf1-V1 und ISLsf1-R1 verwendet. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Länge von 820 bp.

Stamm (TMW Nr.)			PCR-Produkt	Stamm (TMW Nr.)			PCR-Produkt
<i>L. acidophilus</i>	1.18	1.990	-	<i>L. lindneri</i>	1.88	-	-
<i>L. alimentarius</i>	1.11		-	<i>L. panis</i>	1.648	-	-
<i>L. amylolyticus</i>	1.487		-	<i>L. parabuchneri</i>	1.429	-	-
<i>L. amylovorus</i>	1.694		-	<i>L. paralimentarius</i>	1.256	-	-
<i>L. animalis</i>	1.19		-	<i>L. pentosus</i>	1.10	-	-
<i>L. brevisimilis</i>	1.122		-	<i>L. reuteri</i>	1.693	-	-
<i>L. brevis</i>	1.384 ^{1,2}	1.57	-	<i>L. rhamnosus</i>	1.1186	-	-
<i>L. buchneri</i>	1.75		-	<i>L. suebicus</i>	1.44	-	-
<i>L. casei</i>	1.14	1.15	-	<i>L. viridescens</i>	1.70	-	-
<i>L. curvatu</i>	1.167	1.7	-	<i>Lactococcus lactis</i>	1.1085	-	-
<i>L. farciminis</i>	1.68		-	<i>L. species</i>	1.342	-	-
<i>L. fructosus</i>	1.198		-	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2.6	-	-
<i>L. helveticus</i>	1.1176		-	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2.8	-	-
<i>L. johnsonii</i>	1.189		-	<i>Pediococcus damnosus</i>	2.4	-	-
<i>L. kandleri</i>	1.20		-	<i>Pediococcus claussenii</i>	2.340	-	-
<i>L. plantarum</i>	1.25	1.38 ^{1,2}	1.64	-	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.1	-
	1.708			-	<i>Weissella paramesenteroides</i>	2.85	-
<i>L. pontis</i>	1.397	1.675	1.85	-	<i>Leuconostoc lactis</i>	2.330	-
<i>L. salivarius</i>	1.695	1.805		-	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.48	-

¹PCR war positiv für *L. plantarum* TMW 1.38 und *L. brevis* 1.384. Die Sequenzierung der Bande und nachfolgender Southern Blot zeigten, dass keiner der beiden Stämme dieses IS-Element besitzt.

² bestätigt durch Southern Blot-Hybridisierungen

3.3 Einfluss von Hochdruck auf das Transkriptom

Die Erhöhung des Umgebungsdrucks in den subletalen Bereich führt zu weitreichenden Veränderungen in der Zelle. Diese Veränderungen reichen von der Abnahme der Membranfluidität, über die Beeinträchtigung von Transportprozessen und der Proteinbiosynthese bis zur Hemmung der Zellteilung. Diese globalen Auswirkungen auf zelluläre Prozesse erfordern globale Analysen der hochdruckinduzierbaren Genregulation. Der hier gewählte Ansatz einer Transkriptomstudie mit shot-gun-Mikroarrays entspricht dieser Anforderung. Aus je sechs Übernachtkulturen von *L. sanfranciscensis* wurde RNA nach einer subletalen Hochdruckbehandlung (45 MPa/ 30 min/ 30°C) isoliert, in cDNA umgeschrieben und markiert (2.3.4.2, 2.8.1). Je zwei markierte cDNAs wurden gepoolt und mit ebenfalls markierter cDNA der Vergleichsbedingung (0,1 MPa, 30°C) auf dem Mikroarray hybridisiert (2.8.2). In den insgesamt drei Hybridisierungen mit dem shot-gun-Array wurden „Dye-swaps“ integriert, so dass das Risiko einer farbstoffbedingten Fehlinterpretation der Daten minimiert wurde. Die Daten des shot-gun-Mikroarrays wurden mit einem zweiten Array und Real-Time-PCR verifiziert (2.7.3, 2.8.4). Die 48 identifizierten hochdrucksensitiven Gene bzw. Operons wurden 2-4fach induziert bzw. reprimiert. Real-Time-PCR-Daten konnten die Veränderungen in der Transkriptmenge qualitativ bestätigen. Hingegen war der absolute Wert der Abnahme bzw. Zunahme eines Transkript bei Real-Time-PCRs im allgemeinen höher als der, der sich aus der Mikroarrayanalyse ergab (Tabellen 3.8 und 3.9).

3.3.1 Identifizierung eines nichtdruckregulierten Referenzgens

Insgesamt waren die Fluoreszenzverhältnisse von 750 der 2000 Spots nach Berücksichtigung von Hintergrundfluoreszenz und minimaler Fluoreszenzintensität reproduzierbar auswertbar. Ein zentrales Ziel der Mikroarrayanalyse war die Identifizierung eines nichtdruckregulierten Referenz-gens („housekeeping Gen“). Die Kenntnis eines Referenzgens vereinfacht nicht nur die Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese, sondern ermöglicht z.B. auch die mikroarrayunabhängige Transkriptanalyse einzelner Gene mit Northern-Blots oder Real-Time-PCRs. Das nichtdruckregulierte Referenzgen sollte zudem konstitutiv exprimiert werden und idealerweise in nur einer Kopie im Genom vorliegen.

Als potentiell nichtdruckregulierte Referenzgene wurden zunächst Genfragmente der Maltosephosphorylase, Phosphoglukomutase, Acetatkinase bzw Phosphotransacetylase. auf den Array aufgetragen (2.7.1). Die Normalisierung der Daten, bei der das mittlere Verhältnis aller Fluoreszenzintensitäten bei 532 nm und 635 nm gleich 1,0 gesetzt wurde, zeigte das keines dieser Gene unter subletalen Hochdruckbedingungen als Referenzgen herangezogen werden kann. Die Gene der Maltosephosphorylase und Phosphoglukomutase waren induziert, das der Phosphotransacetylase reprimiert, die anderen drei zumindest schwach reguliert (weniger als 2fach). Das Sequenzieren von

Spots, deren Fluoreszenzintensitätenverhältnis dem Mittleren -also 1,0- entsprach, zeigte, dass das Gen der Phosphoketolase auf Transkriptionsebene nicht reguliert ist. Nach vollständiger Sequenzierung und anschließender Southern-Blot-Hybridisierung mit *xpk* als Sonde zeigte sich zudem, dass nur eine Kopie im Genom von *L. sanfranciscensis* vorliegt (Abbildung 3.10).

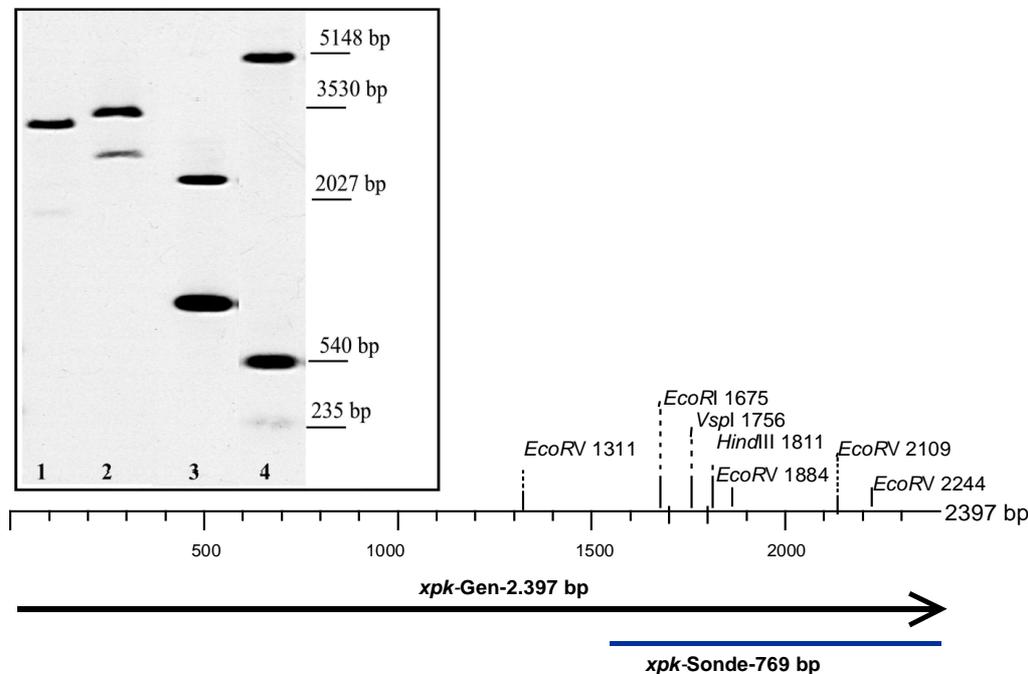


Abbildung 3.10: Southern-Blot-Hybridisierung der *xpk*-spezifischen Sonde. Genomische DNA von *L. sanfranciscensis* wurde mit *EcoRI* (Bande 1), *HindIII* (Bande 2), *VspI* (Bande 3) oder *EcoRV* (Bande 4) verdaut. Die Lage der Sonde und der Schnittstellen in *xpk* sind eingezeichnet.¹

3.3.2 Optimierung der Versuchsbedingungen

Bei der Optimierung der Versuchsbedingungen für die Mikroarrayanalyse, die sich an den bereits bestimmten subletalen Drücken orientierte (vergleiche Abschnitt 1.4), stellte sich heraus, dass aus Zellen, die einem Druck von 80 MPa für 30 min ausgesetzt wurden, die Isolierung von RNA zu nur ca. einem Zehntel der RNA-Menge führte, die aus Zellen nach einer Druckbehandlung von 45 MPa für 30 min und der unbehandelten Kontrolle isoliert werden konnte. Da eine potentielle Beeinträchtigung der Transkription durch Hochdruck vermieden werden sollte, wurde 45 MPa als Druck für die Mikroarraystudie gewählt.

¹ Der Southern-Blot wurde von mir angefertigt, die Hybridisierung und Detektion der Sonde von Sebastian Hörmann durchgeführt.

3.3.3 Auswertung der Mikroarrays

Tabelle 3.8: Auswertung des Mikroarrays 1: In ribosomale Prozesse involvierte Gene und allgemeine Streßgene, die durch Hochdruck reguliert werden. Die Veränderung der Expression unter Hochdruck wurde mit Mikroarrayhybridisierungen und/oder Real-Time-PCRs bestimmt. Die mit der Real-Time-PCR erhaltenen Ergebnisse wurden gegen das Referenzgen Phosphoketolase normalisiert (AJ586560).

Gen oder Operon	Genprodukt	Identität zur Akzessionsnummer (AC-Nr.)	Induktion			AC-Nr.
			MA 45 ^a	RT 45 ^b	RT 80 ^c	
STRESSANTWORT						
<i>hsp60</i>	GroEL	ACQ93GO7(75%)	2.9	2.9±0.8	2.8±0.4	AY922321
<i>clpL</i>	ATP-abhängige Clp Protease	AAD 34338 (55%)	2.1	4.2±0.5	15.2±2.3	AY912122
<i>guaA</i>	GMP-Synthetase	ACO85192 (66%)	3.0	n.d.	n.d.	AY912128
<i>gyrA</i>	DNA -Gyrase, A Untereinheit	ACQ89OK3 (65%)	2.0	n.d.	n.d.	AY912125
<i>ppK</i>	Polyphosphatkinase	ACQ88YD2 (99%)	2.5	n.d.	n.d.	AY912130
<i>ppx</i>	Exopolyphosphatase	ACQ88YD1(98%)	2.3	n.d.	n.d.	AY912130
<i>orf1</i>	Hypothetisches Protein (ähnelt DEAD ATP-abhängiger RNA-Helikase)	ACQ88Z45 (73%)	3.9	n.d.	n.d.	AY912129
<i>pepO</i>	Endopeptidase	AL935254 (60%)	2.4	n.d.	n.d.	AY917120
TRANSLATIONSFAKTOREN UND RIBOSOMALE PROTEINE						
<i>rplK</i>	ribosomales Protein L11	ACQ88YX0 (82%)	2.7	n.d. ^d	n.d.	AY912111
<i>rplF</i>	ribosomales Protein L6	ACQ88XX1 (66%)	2.1	n.d.	n.d.	AY912116
<i>rpsB /tsf</i>	ribosomales Protein S2 und Translationselongationsfaktor tsf	ACP34831 (71%)	2.2	n.d.	n.d.	AY912117 AY912118
<i>tuf</i>	Elongationfaktor TU	ACQ8KMR6 (83%)	2.2	1.9±0.2	1.8±1.0	AY912112 AY912119
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	ACQ88XY8 (80%)	-2.5	-3.3±0.0	1.2±0.1	AY912120
<i>lepA</i>	GTP-bindender Translationselongationsfaktor	NP_785542.1 (65%)	n.d.	0,89	4,0	-
<i>prfB</i>	Peptidketten-release Faktor 2	AE017202 (70%)	-2.5	n.d.	n.d.	AY912121
<i>prfC</i>	Peptidketten-release Faktor 3	ACCP000023 (65%)	1.0	1.0±0.2	1.1±0.3	AY917120
<i>infB</i>	Translationsinitiationsfaktor 2	ACCP000023_334 (65%)	n.d.	4.5±3.85 ^e	4.5±4.9	AY912123
<i>hisS</i>	Histidyl-tRNA-synthetase	ACQ88VQ7_1447 (45%)	2.5	n.d.	n.d.	AY912113
<i>orf2</i>	GTPase unbekannter Funktion	ACQ88WT7 (96%)	2.9	3.3±0.3	n.d.	AY912115
tRNA-MODIFIZIERENDE PROTEINE						
<i>trmA</i>	tRNA-methyltransferase, trmA Familie	ACQ73EJ5 (55%)	2.0	n.d.	n.d.	AY912114
<i>gidA</i>	Glukose inhibiertes Zellteilungsprotein	ACQ88RX6 (80%)	2.3	2.5±0.7	2.7±0.4	AY912127
<i>thdf/trmE</i>	tRNA modifizierende GTPase	ACQ88RX5 (61%)	n.d.	1.4±0.2	1.9±0.6	AY912124
<i>trmA</i>	tRNA-Methyltransferase, trmA-Familie	ACQ73EJ5 (55%)	2.0	n.d.	n.d.	AY912114

^a MA - xfache Induktion Mikroarray-45 MPa-30 min;

^c RT 80 - xfache Induktion Real-Time-PCR -80 MPa-30 min

^e Real-Time-PCRs für *infB* waren nur in geringem Umfang reproduzierbar, unter Hochdruck war *infB* aber immer induziert. Diese Induktion schwankte zwischen 2,0-8,3fach.

^b RT 45 - xfache Induktion Real-Time-PCR -45 MPa-30 min

^d n.d. - nicht untersucht

Tabelle 3.9: Auswertung des Mikroarrays 2: Weitere durch Hochdruck regulierte Gene. Die Veränderung der Expression unter Hochdruck wurde mit Mikroarrayhybridisierungen und zum Teil auch durch Real-Time-PCRs bestimmt. Die mit der Real-Time-PCR erhaltenen Ergebnisse wurden gegen das Referenzgen Phosphoketolase normalisiert (AJ586560).

Gen oder Operon	Genprodukt	Identität zur AC-Nr.	Induktion	
			MA 45 ^a	RT 45 ^b
ZENTRALER INTERMEDIÄRER METABOLISMUS UND ENERGIEMETABOLISMUS				
<i>cps1d</i>	Glykosyltransferase	ACQ88XM0 50%	2,8	2,9
<i>rbsK</i>	Ribokinase	AAK64290 65%	2,8	16,11
<i>gntK</i>	Glukonatkinase	ACQ81MZ1 57%	2,4	3,3
<i>mapA</i>	Maltosephosphorylase	AJ22430 100%	2,1	n.d.
<i>pgmA</i>	Phosphoglukomutase	AJ22430 100%	2,0	n.d.
<i>pta</i>	Phosphotransacetylase	AB035800 100%	-2,0	n.d.
<i>ppk</i> und <i>ppx</i>	siehe Tabelle 3.8			
WEITERE				n.d.
<i>pbp2b</i>	Penicillinbindendes Protein 2b	ACQ88V78 49%	2,0	n.d.
<i>orf3</i>	Dextransucrase (Fragment)	ACQ8G9Q2 38%	-2,5	n.d.
<i>orf4</i>	Transportprotein (Saccharose)	ACQ88SA2 74%	3,3	n.d.
<i>orf5</i>	Aminosäurepermease	ACQ833B7 70%	2,6	n.d.
<i>atmE</i>	ABC Transporter, Permease Protein	ACQ7CE88 43%	2,2	n.d.
<i>ptr2</i>	Di-/Tripeptidtransporter	ZP_00322952 57%	2,2	n.d.
<i>mvaK2</i>	Phosphomevalonatkinase	ACQ9FD67 39%	2,1	n.d.
<i>dapB/asd</i>	Dihydrodipicolinatreduktase	NC4567.1 64%	2,0	n.d.
	Aspartatsemialdehyddehydrogenase	NZAAA002000002 80%		
<i>orf6</i>	Membranprotein (vorausgesagtes)	NP_349421 44%		n.d.
			2,3	
<i>orf7</i>	Transportprotein	ACQ88YM4 62%	2,0	n.d.
UNBEKANNTE FUNKTION				
<i>orf8</i>	Protein DEGV-Familie	ACQ88VV07 37%	2,1	n.d.
<i>orf9-orf18</i>	keine Homologie		2,0 bis 2,9	
<i>orf19</i> und <i>orf20</i>	keine Homologie		-2 und -2,5	

^a MA45 - xfache Induktion Mikroarray-45 MPa-30 min;

^b RT 45 - xfache Induktion Real-Time-PCR -45 MPa-30 min

Von den 750 auswertbaren Spots, waren 48 hochdruckreguliert. Die meisten dieser hochdruckregulierten Gene war mehr als 2fach induziert (42 Spots); nur knapp 1% war mindestens 2fach reprimiert (6 Spots). Die detaillierten Ergebnisse der Transkriptomanalyse sind in den Tabellen 3.8 und 3.9 dargestellt. Die Klassifizierung der hochdruckregulierten Gene (Tabelle 3.10) ergab, dass Gene, deren Funktion nicht genau aufgeklärt ist, die größte dieser funktionalen Gruppen stellt.

Tabelle 3.10: Funktionelle Klassifizierung Hochdruckinduzierter und reprimierter Gene (45 MPa/30 min)

Die Klassifizierung basiert auf der COGs-Datenbank.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/palox.cgi?fun=all>).

Funktion	%	Anzahl
Unbekannte Funktion	33	16
Proteinsynthese und -abbau	21	10
Zentraler intermediärer Metabolismus	10	5
Transport	10	5
zelluläre Reaktionen	6	3
Energie Metabolismus	6	3
Zellhülle	4	2
DNA und Purin/Pyrimidin Metabolismus	4	2
Aminosäurebiosynthese	2	1
Fettsäurebiosynthese	2	1

Die funktionale Klassifizierung deutete aber auch darauf hin, dass ribosomale Prozesse eine zentrale Rolle in der Reaktion auf subletalen Hochdruck spielen. 21% der hochdruckregulierten Gene waren der Kategorie Proteinbiosynthese und -abbau zuzuordnen (Tabelle 3.10). Auch die drei am stärksten induzierten Gene -ein nicht näher charakterisiertes, mit einem DEAD-ATP-abhängigen Helikase-Motiv (ORF1), *hsp60* und eine GTPase unbekannter Funktion (ORF2)- sind alle in ribosomale Prozesse involviert [de la Cruz, 1999; Tanner and Linder, 2001; VanBogelen and Neidhardt, 1990]. Unter den bereits charakterisierten GTPasen sind Era und EngA diejenigen mit der höchsten Homologie zu ORF2. Auch die konservierten GTPase Domänen G1 bis G4 sind homologer zur Era-Familie als zu anderen Familien [Caldon et al., 2001], mit der Ausnahme, dass in ORF2 diese GTPase-Domänen, wie in YjeQ von *E. coli* permutiert sind [Daigle et al., 2002]. Abbildung 3.11 zeigt ein Alignment zwischen ORF2 mit Era, den beiden GTPase-Domänen von EngA und YjeQ.

Domäne		G4	
ORF2- <i>L. sanfranciscensis</i>	AY912115	115-VGNPILVVGKVDL	-129
Era- <i>E. coli</i>	P58070	114-EGKAPVILAVNKVDN	-128
EngA1- <i>E. coli</i>	NP_417006	121-SREKPTFLVANKTDG	-135
EngA2- <i>E. coli</i>	NP_417006	324-NSGRSLVIVVKNWDG	-338
YjeQ- <i>E. coli</i>	BAB38563	137-LQIEPIIVL-NKIDL	-150

	G1	G2	G3
ORF2	175-RDVYVVGVTNVGKSTLINQIIHQASGQEQV---ITTSKFP	GGTTLDMIKIPLDDG---HDL	IDTPGVIHA-237
Era- <i>E. coli</i>	9-GFIAIVGRPNVGKSTLLNKLKGQK-----ISITSRKAQT	TRHRIVGIHTEGAYQAIYVDT	PGLHME-69
EngA1- <i>E. coli</i>	16-PVVALVGRPNVGKSTLFNRLRTR-----DALVADFP	GLTRDRKYGRAEIEGREFIC	IDTGGIDGT-76
EngA2- <i>E. coli</i>	216-IKLAIVGRPNVGKSTLTNRILGEE-----RVVYDMP	GGTTRDSIYIPMERDGREYVL	IDTAGVVRK-276
YjeQ- <i>E. coli</i>	195-RISIFAGQSGVGKSSLLNALLGLQKEILTNDVSDNS	GLGQHTTAAARLYHF---PHGGDV	LDSPGVREF-260

Abbildung 3.11: Aminosäuresalignment der konservierten Regionen der GTPase Domänen (G1-G4) von ORF2 (Tabelle 3.8) von *L. sanfranciscensis* mit drei bereits charakterisierten und an der Translation beteiligten GTPasen. Die Reihenfolge der vier Domänen orientiert sich an denen von ORF2 und zur YjeQ-Familie zählenden Proteinen, sodass die Reihenfolge der Domänen in Era und EngA vertauscht ist. Die Nummern kennzeichnen die Positionen des ersten und des letzten Restes der korrespondierenden Proteinsequenz des jeweiligen Blocks. Konservierte Aminosäuren wurden grau unterlegt. EngA1 und EngA2 sind die beiden GTPase Domänen des selben EngA Proteins.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die zentrale Rolle der Translation sich auch auf transkriptionaler Ebene widerspiegelt, wurden Transkriptionsverhältnisse weiterer Translationfaktoren und GTPasen mit Real-Time-PCR bestimmt (Tabelle 3.8, *thdf*, *lepA*, *infB*). Interessanterweise war *hisS* die einzige druckinduzierbare tRNA-Synthetase, obwohl DNA-Fragmente mindestens acht weiterer tRNA-Synthetasen auf den Array aufgetragen wurden (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Hochdruckregulation von tRNA-Synthetasen nach 30 minütiger Inkubation bei 45 MPa

Gen	Genprodukt	Induktion (45 MPa/ 30 min)
<i>argS</i>	Arginine-tRNA Ligase	0,90
<i>asnS</i>	Asparagine-tRNA Ligase	1,10
<i>cysS</i>	Cysteine-tRNA-Ligase	0,70
<i>hisS</i>	Histidin-tRNA-Ligase	2,50
<i>ileS</i>	Isoleucine-tRNA-Ligase	1,30
<i>lysS</i>	Lysine-tRNA Ligase	0,70
<i>metS</i>	Methionine-tRNA-Ligase	1,30
<i>pheT</i>	Phenylalanine-tRNA Ligase, β -Untereinheit	1,00
<i>valS</i>	Valine-tRNA Ligase	0,80

Neben Genen, deren Produkte in ribosomale Prozesse involviert sind, wurde eine Reihe von Stressgenen induziert (Tabelle 3.5-A). Darunter waren Gene für Proteine, die durch Hitze (*hsp60*, *clpL*), Kälte (*gyrA*, *infB*), aber auch Säure (*guaA*) oder Aminosäuremangel (*ppk*) reguliert werden. Auch Gene die für Proteine des Energie- und zentralen intermediären Stoffwechsels kodieren, wurden durch Hochdruck reguliert.

3.3.4 Einfluss der mRNA-Stabilität auf hochdrucksensitive Genexpression

Das Transkriptionsprofil von *L. sanfranciscensis* unter subletalen Hochdruck unterscheidet sich von dem bei atmosphärischem Druck (3.3.3). Diese Unterschiede können entweder durch Veränderungen in der Regulation der Transkription oder veränderte mRNA-Stabilitäten entstehen. Der Einfluss der mRNA-Stabilität kann durch Zugabe von Transkriptionsblockern wie Rifampicin und damit Ausschalten der Regulation der Transkription als Einflussfaktor bestimmt werden.

Die MIC von Rifampicin für *L. sanfranciscensis* lag sowohl bei atmosphärischen Druck, als auch Hochdruck bei 3 µg/ml. RNA wurde aus Kulturen in der exponentiellen Phase bei 0,1 bzw. 45 MPa mit und ohne Zugabe von Rifampicin in dieser Konzentration isoliert. Dabei wurde Rifampicin erst während der Hochdruckbehandlung zum Medium gegeben (2.10.3). Das nichtdruckregulierte Gen *xpk* wurde zur Normalisierung der Daten verwendet, wobei vorausgesetzt wurde, dass das Blocken der Transkription keinen Einfluss auf die *xpk*-mRNA-Stabilität bei 0,1 MPa hat.

Unter dieser Voraussetzung hat auch die Hochdruckbehandlung (45 MPa/ 30 min) mit Zusatz von Rifampicin keinen Einfluss auf die *xpk*-mRNA-Stabilität (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Einfluss von Hochdruck auf die *hsp60*-mRNA-Stabilität. Rifampicin wurde in der minimalen inhibitorischen Konzentration (3 µg/ml) eingesetzt. Die mit der Real-Time-PCR erhaltenen Ergebnisse wurden gegen das Referenzgen Phosphoketolase normalisiert.

Gen	0,1 MPa/ 30 min mit Rifampicin	45 MPa/ 30 min ohne Rifampicin	45 MPa/ 30 min mit Rifampicin
<i>xpk</i>	definiert als nicht reguliert	1,0	+ 0,8
<i>hsp60</i>	+ 2,6	+ 2,9	- 5,9

Die *hsp60*-mRNA wird schon allein durch Blockieren der Transkription stabilisiert (0,1 MPa/ 30 min Rifampicin). Hingegen kann die erhöhte *hsp60*-Transkriptmenge unter Hochdruck nicht auf eine Stabilisierung der mRNA zurückgeführt werden. Die Zugabe von Rifampicin und anschließende Hochdruckbehandlung führten vielmehr zur Destabilisierung der *hsp60*-mRNA (Tabelle 3.12)..

3.3.5 Vergleich von subletalen Hochdruck und Hitzeschock

Tabelle 3.13 zeigt die Induktionsverhältnisse von Genen, die sowohl unter Hochdruck, als auch auf dem Screening-Array bei Hitzeschock (42°C/10 min) reproduzierbar auswertbar waren.

Tabelle 3.13: Vergleich der Genexpression in *L. sanfranciscensis* bei subletalem Hochdruck und Hitzeschock. Proben aus beiden Bedingungen wurden jeweils cDNA der Vergleichsbedingung (0.1MPa/ 30°C) und dem Verifizierungsarray hybridisiert. Die Mikroarraydaten wurden gegen das Referenzgen Phosphoketolase normalisiert (AJ586560).

Gen(e)	Genprodukt(e)	Induktion	
		45 MPa/30 min	42°C/ 10 min
ORF1	DEAD-RNA-Helikase	3,9	-1,6
<i>hsp60</i>	GroEL	2,9	5,9
ORF2	GTPase unbekannter Funktion	2,9	1,0
<i>rbk</i>	Ribokinase	2,8	2,0
<i>cps1D</i>	Glykosyltransferase	2,8	1,1
<i>ORF10</i>	hypothetisches Protein 3-3a	2,6	1,1
<i>ppk</i>	Polyphosphatkinase	2,5	1,0
<i>gntK</i>	Glukonatkinase	2,4	-1,2
<i>ppx</i>	Exopolyphosphatase	2,3	1,0
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor TU	2,2	1,1
<i>gidA</i>	Glukose inhibiertes Zellteilungsprotein	2,2	1,1
ORF12	Hypothetisches Protein 2230	2,2	-1,1
<i>ptr2</i>	Di-/Tripeptide ABC transporter	2,2	-1,2
<i>clpL</i>	clpL	2,1	2,7
<i>mapA</i>	Maltosephosphorylase	2,1	-1,3
<i>rplF</i>	Ribosomales Protein L6	2,1	-1,4
<i>dapB/asd</i>	Dihydrodipicolinatreduktase und Aspartatsemialdehyddehydrogenase	2,0	2,9
<i>pgmA</i>	Phosphoglukomutase	2,0	1,4
<i>trmA</i>	tRNA-Methyltransferase, trmA Familie	2,0	1,0
<i>adh-P</i>	Alkoholdehydrogenase P	1,7	1,0
<i>uvrA</i>	Excinuklease ABC, Untereinheit A	1,5	-1,2
ORF 22	hypothetisches Protein (= Ip_0038)	1,4	1,9
<i>maA/rnh</i>	Maltose-O-acetyltransferase und Ribonuklease H	1,4	1,8
ORF21/ <i>rplK</i>	HP 1992 UND ribosomales Protein L11	1,3	1,1
<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	1,3	1,0
<i>mraY</i>	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	1,2	1,0
<i>argH</i>	Argininosuccinatlyase	1,2	-1,1
<i>glyA</i>	Serinhydroxymethyltransferase	1,2	-1,1
<i>dnaJ</i>	Hitzeschockprotein DnaJ	1,1	2,0
<i>pheB/ dapE</i>	ACT domänen Protein: Chorismatmutase und Succinyldiaminopimelate desuccinylase	1,1	1,1
<i>dnaK</i>	Chaperone Protein DnaK	1,0	2,0
<i>mleP</i>	Malatpermease und ISLsf6 <i>orfB</i>	1,0	1,1
<i>xpk</i>	Phosphoketolase	1,0	1,0
<i>lysS</i>	Lysin-tRNA-Ligase	-1,1	1,2
<i>mleS</i>	malolaktisches Enzym	-1,1	1,2
<i>glnp2</i>	Glutamat-ABC-transporter	-1,1	1,1
<i>atpD</i>	F ₁ F ₀ -ATPase beta Untereinheit	-1,1	1,0
<i>rpoB</i>	RNA-Polymerase, β-Untereinheit	-1,4	1,7
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	-2,5	-1,5

Über die Genregulation unter Hochdruck ist -verglichen mit anderen Stressbedingungen- nur sehr wenig bekannt. Ein Vergleich der Transkriptomveränderungen unter subletalen Hochdruck mit denen von Zellen nach einem Hitzeschock (42°C/ 10 min) erleichtert nicht nur die Interpretation der Hochdruckmikroarraydaten. Vielmehr kann über die Veränderung des Transkriptionsprofils nach einem Hitzeschock über die Zuverlässigkeit der RNA-Aufbereitung (Verfälschung der Transkriptmengen) und des Mikroarrays geurteilt werden.

Die Zuverlässigkeit des shot-gun Mikroarrays selbst stand ausser Frage. Die erhaltenen Transkriptomveränderungen konnten bereits mit Real-Time-PCR und dem Verifizierungsarray bestätigt werden. Zu überprüfen blieb die Qualität der RNA-Aufbereitung. Aus diesem Grunde wurde die Hitzeschock-RNA und die der Vergleichsbedingung (0,1 MPa, 30°C) mit dem Verifizierungsarray hybridisiert. Das Experiment wurde einmal mit einem integrierten „dye-swap“ wiederholt. Die Daten wurden mit *xpk* normalisiert. Als in anderen Milchsäurebakterien hitzeschockinduzierbare Gene waren Fragmente von *dnaK*, *dnaJ*, *hsp60* und *clpL* gespottet. Alle vier Gene waren auch nach den Daten des Hitzeschock-Mikroarrays induziert und hatten die Qualitätskontrolle damit bestanden (Tabelle 3.13).

Die Ergebnisse des Verifizierungsarrays erlauben gleichzeitig einen Einblick in Gemeinsamkeiten und Unterschiede hitze- und hochdrucksensitiver Genregulation. Schon aus der geringen Anzahl an Genen dieses Arrays ist zu erkennen, durch Hitzeschock und subletalen Hochdruck unterschiedliche Gene reguliert werden, beide Stressantworten aber wie erwartet überlappen. So werden z.B. *hsp60*, *clpL*, oder das Gen der Ribokinase sowohl durch Hitzeschock, als auch durch Hochdruck induziert. Gene des *dnaK*-Operons (*dnaK/ dnaJ*) hingegen werden durch Hochdruck nicht reguliert. Real-Time-PCRs bestätigten die Nichtregulation des *dnaK*-Operons nach 30 minütiger Hochdruckbehandlung bei 45 MPa (Abbildung 3.12).

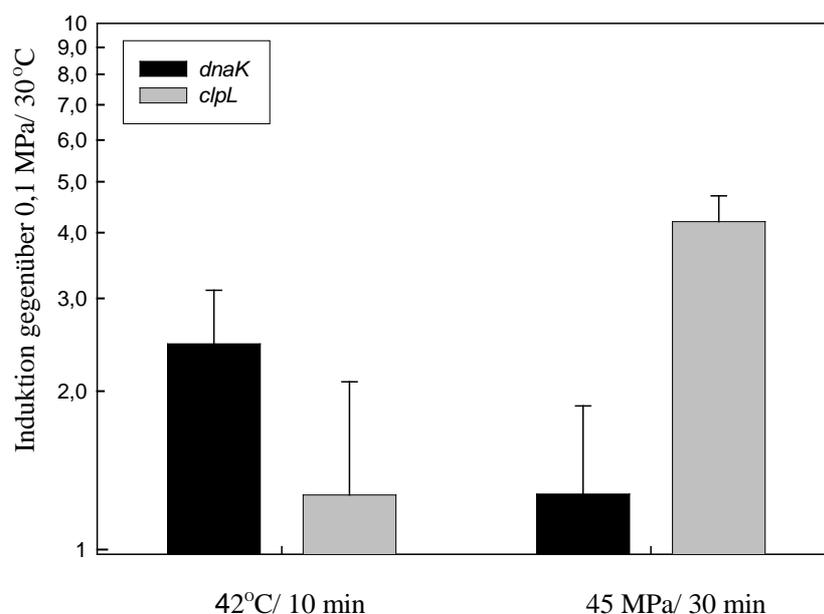


Abbildung 3.12: Vergleich der Induktion von *dnaK* und *clpL* durch subletalen Hochdruck (45 MPa/ 30min/ 30°C) und Hitzeschock (42°C/ 10 min). Die Real-Time-PCR-Daten wurden mit *xpk* normalisiert und stellen die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen dar.

Ergänzend sollte erwähnt werden, dass sich in Northern-Blot-Hybridisierungen mit genau denselben RNAs, die in Real-Time-PCR-Analysen eingesetzt wurden, das *dnaK*-Operon als hochdruckinduziert herausstellte.¹ Das am stärksten hochdruckregulierte Gen einer DEAD-RNA-Helikase -ein potentielles Kälteschockprotein- wurde nicht bei Hitzeschock reguliert.

¹ siehe Doktorarbeit von Sebastian Hörmann [Hörmann, 2006]. Die cDNA-Synthese und die Real-Time-PCR für *dnaK* und *clpL* wurden mit ihm gemeinsam durchgeführt.

3.4 Charakterisierung der Hochdruckmutante

Lactobacillus sanfranciscensis wurde für 25 Wachstumszyklen einem Druck von 50 MPa ausgesetzt. Direkt nach dem letzten Wachstumszyklus wurde die Hochdruckmutante mikroskopiert (Abbildung 3.13).

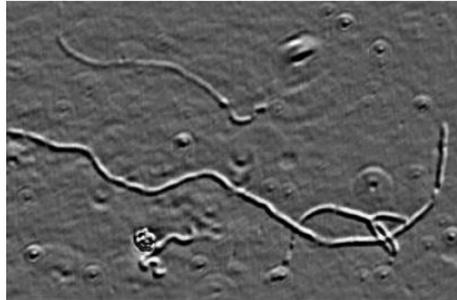


Abbildung 3.13: Mikroskopisches Bild der *L.sanfranciscensis* Hochdruckmutante direkt nach den 25 Hochdruckwachstumszyklen bei 50 MPa.

Es waren morphologische Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen (längere Zelle, bilden von Schleifen und Knoten), die sich jedoch bei längerer Inkubation bei atmosphärischen Druck zurückbildeten. Die isolierte Einzelkolonie wurde zur weiteren Charakterisierung vor jedem Experiment mindestens zweimal ohne weitere Hochdruckbehandlung überimpft, um sicher zu gehen, dass die beobachteten Unterschiede nicht auf Adaptationen, sondern Mutationen zurückzuführen sind.

Bevor die Hochdruckmutante näher charakterisiert wurde, wurde überprüft, ob es sich noch immer um *L. sanfranciscensis* DSM20451^T handelt. Ein Vergleich der sequenzierten 16S rDNA-Amplikons von Wildtyp und Mutante zeigte, dass beide identisch sind (Alignment nicht dargestellt).

3.4.1 Druckabhängiges Wachstum und Druckresistenz

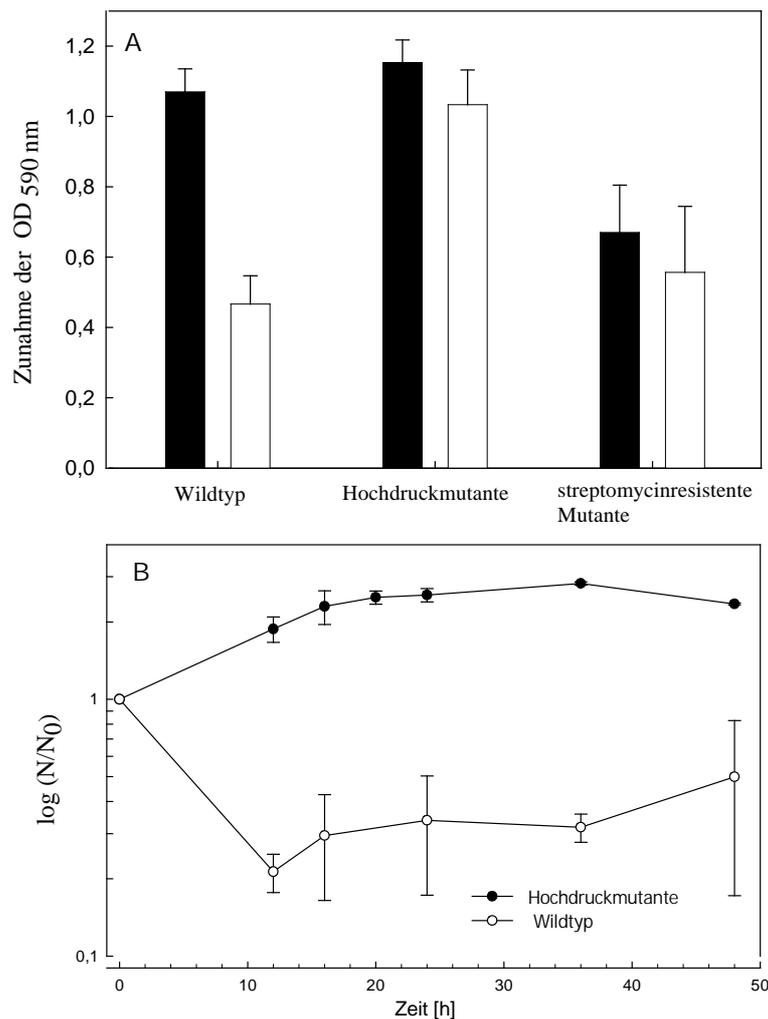


Abbildung 3.14: Druckabhängiges Wachstum von *L. sanfranciscensis* Wildtyp, Hochdruckmutante und streptomycinresistenter Mutante. Die OD_{590nm} wurde bei allen, jeweils viermal wiederholten, Versuchen auf 0,2 eingestellt.

- A) Zunahme der des *L. sanfranciscensis* DSM20451^T Wildtyps, der Hochdruckmutante und der streptomycinresistenten Mutante innerhalb von 15 h bei 30°C und 0,1 MPa (schwarze Balken) bzw. 50 MPa (weiße Balken).
- B) Veränderung der KBE von *L. sanfranciscensis* Wildtyp (○) und Hochdruckmutante (●) bei Inkubation bei 50 MPa. Ausgangskeimzahl lag jeweils bei $3,0\text{-}5,0 \times 10^7$.

Zunächst wurde überprüft, ob die Hochdruckmutante tatsächlich besser an Wachstum unter subletalen Hochdruck angepaßt ist, als der Wildtyp. Beide Stämme wurden in der frühen exponentiellen Phase geerntet, auf OD_{590nm}=0,2 eingestellt und für 15 h bei 30°C und 0,1 bzw. 50 MPa inkubiert. Die Zunahme der optischen Dichte der Mutante unter Hochdruck innerhalb dieser Zeit war um mehr als das doppelte höher als die des Wildtyps, obwohl beide Stämme unter atmosphärischen Druck vergleichbare Zunahmen der OD aufwiesen (Abbildung 3.14A). Als weiterer Vergleich diente eine streptomycinresistente Mutante von *L. sanfranciscensis*, mit einem MIC von 1000 µg/ml für Streptomycin (Wildtyp-MIC_{Streptomycin}=7,8µg/ml). Das Wachstum der streptomycinresistenten Mutante

wurde, ähnlich wie bei der Hochdruckmutante, durch die Erhöhung des Drucks kaum beeinflusst (Abbildung 3.14A).

Wurde statt der OD die Veränderung der KBE bei 50 MPa bestimmt (Abbildung 3.14B), wurde die erhöhte Drucktoleranz der Hochdruckmutante noch deutlicher. Während die Anzahl der lebensfähigen Zellen des Wildtyps zunächst abnimmt, war die Hochdruckmutante zum Wachstum bei 50 MPa fähig.

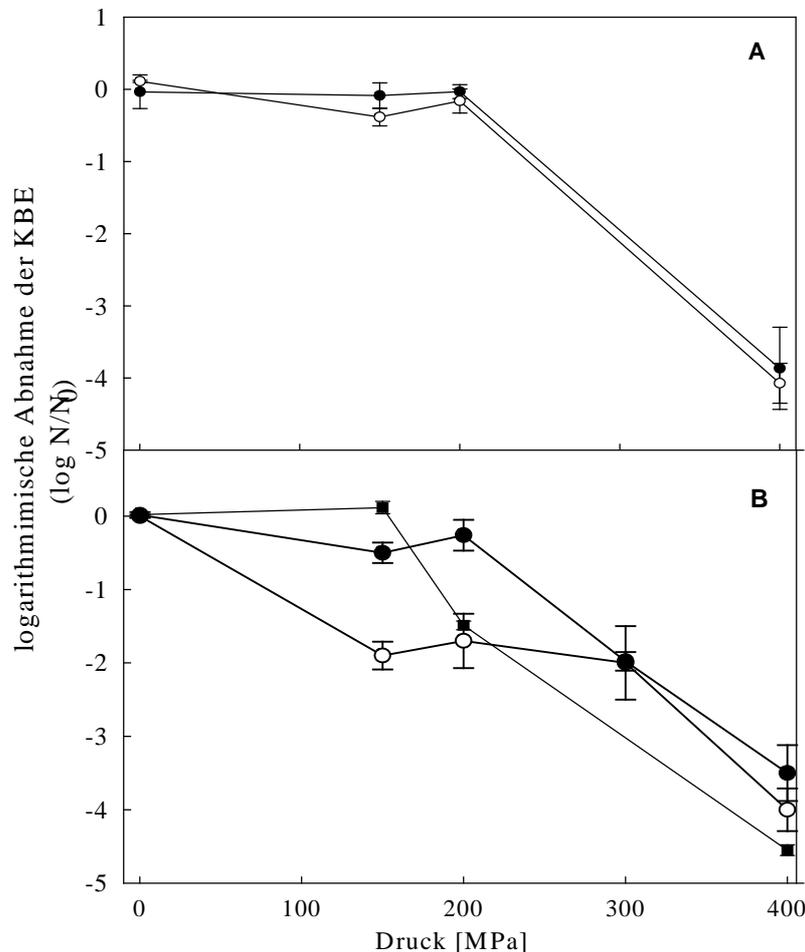


Abbildung 3.15: Abnahme der KBE des *L. sanfranciscensis* Wildtyps (○), der Hochdruckmutante (●) und der streptomycinresistenten Mutante (■) in mMRS4 mit (A) und ohne (B) Magnesium-Mangan-Lösung nach 30minütiger Hochdruckbehandlung bei 30°C. Die Anzahl der KBE vor der Hochdruckbehandlung lag zwischen $5,6 \times 10^7$ und $1,2 \times 10^8$. Die Daten stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen dar.

In mMRS4 gab es keinen Unterschied zwischen den Druckresistenzen von Wildtyp und Hochdruckmutante. Beide Stämme wiesen keine Reduktion der KBE nach 30minütiger Hochdruckbehandlung bis zu 200 MPa auf (Abbildung 3.15-A). Unter Magnesium-Mangan (Mg-Mn) limitierenden Bedingungen (mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung) waren hingegen deutliche Unterschiede zwischen beiden Stämmen zu beobachten (Abbildung 3.15-B). Bei 150 und 200 MPa, Drücke die für den Wildtyp bereits letal waren, war die Überlebensfähigkeit der Hochdruckmutante besser. Die streptomycinresistente Mutante war bei 150 MPa ebenso druckresistent wie die Hochdruckmutante, allerdings nahm die KBE bereits bei 200 MPa deutlich ab. Daraufhin sollte festgestellt werden, ob die

erhöhte Hochdruckresistenz der Mutante auf eine höhere Resistenz gegenüber Mg-Mn-limitierenden Bedingungen zurückzuführen sein könnte. Dafür wurden sowohl Wildtyp als auch Hochdruckmutante nach dem Wachstum in mMRS4, in mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung überimpft und zwei aufeinanderfolgende Wachstumszyklen mit einem Spektrophotometer verfolgt (Abbildung 3.16).

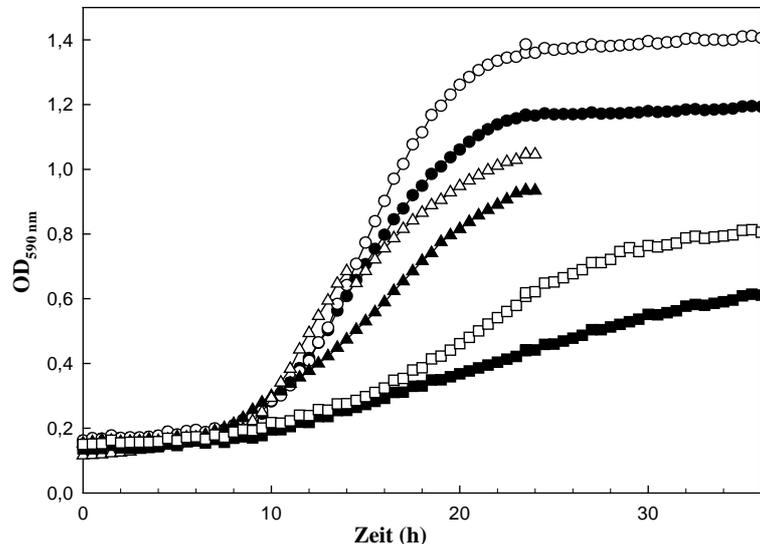


Abbildung 3.16: Einfluss der Mg-Mn-Limitierung auf das Wachstum der *L. sanfranciscensis* Hochdruckmutante (weiße Symbole) und des Wildtyps (schwarze Symbole) bei 0,1 MPa und 30°C. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Die Abbildung zeigt repräsentative Wachstumskurven in mMRS4 (○,●), in mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung nach dem 1.Überimpfen (◻,▲) und in mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung nach dem 2.Überimpfen (◻,■).

Es ist kein Unterschied in der Reaktion auf Mg-Mn limitierende Bedingungen zwischen Wildtyp und Hochdruckmutante nach den ersten Überimpfen zu erkennen (Abbildung 3.16). Jedoch nimmt nach dem zweiten Überimpfen in mMRS4 ohne Mg-Mn-Lösung die Wachstumsrate des Wildtyps stärker ab, als die der Hochdruckmutante.

3.4.2 Temperaturabhängiges Wachstum

Das Wachstum der Hochdruckmutante bei atmosphärischem Druck war stärker von der Temperatur abhängig, als das des Wildtyps (Tabelle 3.14). Bei der für *L. sanfranciscensis* optimalen Wachstumstemperatur von 30°C haben beide Stämme vergleichbar lange Lag-Phasen. Die maximale Wachstumsrate der Hochdruckmutante ist bei dieser Temperatur 1,5mal höher als die des Wildtyps. Bei 25°C haben beide Stämme vergleichbare maximale Wachstumsraten. Allerdings war, im Vergleich zum Wildtyp, die Lag-Phase der Hochdruckmutante 1,5fach so lang. Eine Erhöhung der Temperatur um 5°C auf 35°C hatte keine Auswirkung auf die Dauer der Lag-Phase des Wildtyps. Die Mutante konnte bei dieser Temperaturerhöhung nicht mehr wachsen.

Tabelle 3.14: Temperaturabhängige Wachstumsraten des *L. sanfranciscensis* TMW 1.53 Wildtyps und der Hochdruckmutante

Temperatur	maximale Wachstumsrate [Δ -OD/h]		Dauer der lag phase [h]	
	Wildtyp	Mutante	Wildtyp	Mutante
30°C	0.066±0.010	0.100 ±0.013	8.3±1.6	8.8±1.15
25°C	0.051±0.002	0.053±0.016	9.9±0.9	16.0±1.0
35°C	0.022±0.003	- ^a	10.0±0.5	> 100 ^b

^a Kein Wachstum nach 100 h.

^b Messung wurde nach 100 h beendet.

3.4.3 2-D-Gele für Wildtyp und Hochdruckmutante bei 80 MPa

Es sollte festgestellt werden, ob unter Hochdruck, aber auch atmosphärischen Druck zwischen Wildtyp und Mutante Unterschiede in der Expression von Proteinen auftreten. Gele wurden nur von einem (Mutante 0,1MPa; Wildtyp 80 MPa), maximal zwei (Mutante 80 MPa) unabhängig voneinander gewonnenen Proteinextrakten angefertigt. Kontrollgele (Wildtyp, 0,1 MPa) wurden von Sebastian Hörmann zur Verfügung gestellt. Die hieraus gewonnen Ergebnisse dienen daher nur als qualitativer, nicht quantitativer Anhaltspunkt. Sowohl unter Hochdruck (80 MPa/ 30 min) als auch atmosphärischem Druck waren deutliche Unterschiede im Proteom zwischen Mutante und Wildtyp zu erkennen. Die 2-D-Gele unter Hochdruckbedingungen sind in Abbildungen 3.18 dargestellt. Möglicherweise unterschiedlich expremierte Spots wurden markiert. Dabei wurden die Färbeintensitäten berücksichtigt.

Isoelektrischer Punkt

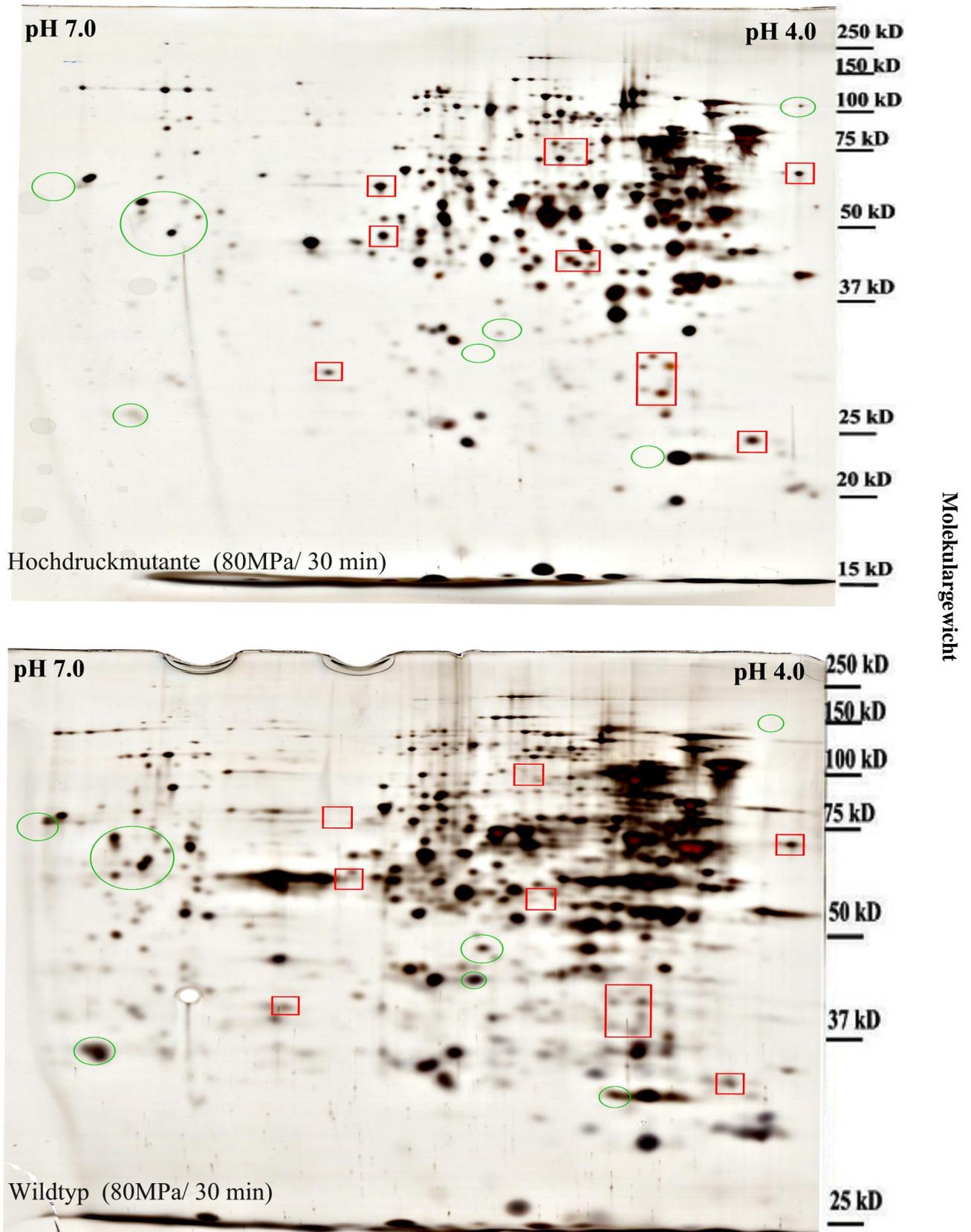


Abbildung 3.17: 2D-Gele cytoplasmatischer Proteine des *L. sanfranciscensis* Wildtyps und der Hochdruckmutante nach jeweils 30 minütiger Inkubation bei 80 MPa. Proteine, die in der Mutante stärker () oder schwächer (○) expremiert wurden sind markiert.

3.4.4 Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika

Sowohl das Ribosom, als auch die Zellhülle zählen zu den Hauptwirkungsstellen von Antibiotika. Gleichzeitig gelten sie als zwei der primären Ziele von Hochdruck. Die Annahme, dass eine Mutation, die zum piezotoleranteren Wachstum der Mutante führt, innerhalb ribosomaler oder zellhüllenbiosynthetischer Prozesse stattgefunden hat, liegt nahe. Veränderungen in Resistenzen gegenüber Antibiotika könnten in diesem Fall Aufschluss über den Ort der Mutation geben. Veränderungen im Inhibitionshofdurchmesser von mehr als 10% wurden als Resistenzab- bzw. Resistenzzunahme gewertet, ebenso wurden Veränderungen in den Fähigkeiten spontane Resistenzen zu bilden, berücksichtigt. Innerhalb der Antibiotika, die einen anderen Angriffsort hatten, als das Ribosom (Tabelle 3.15) wurden Veränderungen v.a. bei solchen beobachtet, die mit der Zellwandbiosynthese interferieren. Insbesondere stiegen die Empfindlichkeiten gegenüber Vancomycin und Teicoplanin an, die beide der Vancomycingruppe der Glykopeptidantibiotika zuzuordnen sind.

Tabelle 3.15: Empfindlichkeit des *L. sanfranciscensis* Wildtyps und der Hochdruckmutante gegenüber verschiedenen, nicht ribosomalen Antibiotika.

Antibiotikum ^a	Durchmesser Inhibitionshof (mm) ^b	
	Wildtyp	Mutante
<i>Resistenzabnahme</i>		
Vancomycin (Zw)	10.7±0.8 ^c	24.8± 0.8
Teicoplanin (Zw)	14.6±0.6 ^c	23.6±1.5
Ampicillin (Zw)	32.5±0.6	35.5±0.6
Piperacillin (Zw)	36.8±0.7	44.7±0.6
Polymyxin (Zm)	11.3±0.5	14.8±0.5
<i>Kein Effekt</i>		
Amoxicillin (Zw)	40.0±0.0	42.3±1.5
Cefozolin (Zw)	20.0±0.0	18.0±0.0
Meropenem (Zw)	39.5±0.5	39.8±0.8
Ciprofloxacin (Gyr)	40.3±0.6	42.7±0.7
Enrofloxacin (Gyr)	19.8±0.4	21.5±1.8
Trimethoprim (Fol)	6.0±0.0	6.0±0.0

^a Die Abkürzungen in Klammern geben den Wirkungsort des jeweiligen Antibiotikums an. ZW-Zellwand; ZM-Zellmembran; Gyr-Gyrase-Inhibitor; Fol-Folsäurebiosyntheseinhibitor.

^b Der Durchmesser des Testplättchens mit der Antibiotikallösung beträgt 6 mm. Damit entspricht ein Durchmesser des Inhibitionshofes von 6mm keiner hemmenden Wirkung.

^c Nur die Hochdruckmutante bildet spontane Resistenzen aus, aber nicht innerhalb des Hemmhofdurchmessers des Wildtyps.

Bei den meisten der getesteten ribosomalen Antibiotika traten Unterschiede in den Resistenzen der Hochdruckmutante und des Wildtyps auf (Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16: Empfindlichkeit des *L. sanfranciscensis* Wildtyps und der Hochdruckmutante gegenüber verschiedenen ribosomalen Antibiotika

Antibiotikum	Durchmesser Inhibitions-hof (mm) ^a		beeinflusste Funktion
	Wildtyp	Mutante	
<i>Resistenzabnahme</i>			
Kasugamycin	6.7±0.8	14±0.7	Initiation (binden der fMet-tRNA)
Tetracyclin	20.2±0.3	26.2±0.3	aa-tRNA·EF-TU·GTP-Bindung
Puromycin	20.2±0.3	25.5±1.0	Elongation
Erythromycin	41.0±0.7	46.8±0.9	Elongation
<i>Resistenzzunahme</i>			
Kanamycin	13.0±0.0	11.5± 1.0 ^b	Translation accuracy
Paromomycin	8.4±0.8	11.9±0.2 ^b	Translation accuracy
Tobramycin	15.7±0.4	16.9±1.0 ^b	Translation accuracy
Spectinomycin	15.0±0.7	11.4±0.5	Translokation (EF-G·GTP- interaction)
Spiramycin	24.8±0.4	20.5±1.0	Bilden der Peptidbindung
Streptomycin	27.8±0.4 ^c	25.2±0.4	Translation accuracy
<i>Kein Effekt</i>			
Amikacin	20.4±0.5	20.4±0.5	Translation accuracy
Gentamycin	14.0±0.0	15.3±0.6	Translation accuracy
Neomycin	15.0±0.0	15.6±0.5	Translation accuracy

^a Der Durchmesser des Testplättchens mit der Antibiotikallösung beträgt 6 mm. Damit entspricht ein Durchmesser des Inhibitions-hofes von 6 mm keiner hemmenden Wirkung.

^b In der Inhibitionszone waren nur bei der Mutante einzelne resistente Kolonien sichtbar.

^c In der Inhibitionszone waren nur beim Wildtyp einzelne resistente Kolonien sichtbar.

Ein gemeinsamer Wirkungsort (ribosomale Proteine, Helix in 16S rRNA usw.) von Antibiotika, bei denen eine Resistenzzunahme oder -abnahme auftrat, war nicht zu erkennen. Allerdings veränderte sich nur im Fall von Aminoglykosiden die Fähigkeit spontanresistente Kolonien zu bilden. Bei Kana-, Paromo- und Tobramycin gab es nur bei der Mutante einzelne resistente Kolonien innerhalb des Inhibitions-hofes. Bei Streptomycin ging die Fähigkeit zur Bildung dieser spontanen resistenten Kolonien zwar verloren, allerdings wuchs die Mutante so nah an das Plättchen heran, wie die resistenteste Streptomycinspontanmutante des Wildtyps (Abbildung 3.18).

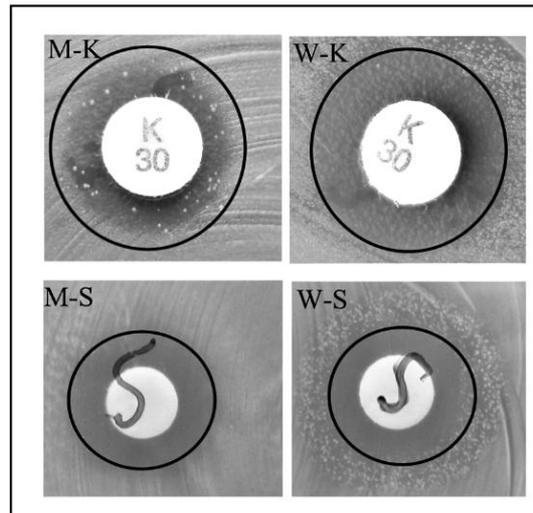


Abbildung 3.18: Inhibitionshöfe und spontanresistente Kolonien für Kanamycin (M-K; W-K) und Streptomycin (M-S; W-S) für die *L. sanfranciscensis* DSM20451^T Hochdruckmutante (M-S; M-K) und den Wildtyp (W-S; W-K) auf mMRS4 nach 24stündiger Bebrütung bei 30°C.

3.4.5 *ssrA* Sequenz von *L. sanfranciscensis* DSM 20451^T

Abgesehen von den Fällen, in denen spontane Resistenzen auftraten, waren Unterschiede in den Resistenzen gegenüber ribosomalen Antibiotika eher gering und nicht auf einen gemeinsamen Wirkungsort zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen wurden von de la Cruz und Vioque [2001] in einer *ssrA*-Deletions-Mutante von *Synechocystis* sp. gemacht.

Das *ssrA*-Gen kodiert für tmRNA, die mRNAs aus angehaltenen Ribosomen ersetzt und mit einem Proteolyse-Tag markiert, und so das Ribosom wieder funktionsfähig macht (siehe 1.2.2). Um zu überprüfen, ob eine hochdruckinduzierte Mutation in der Regulation des *ssrA*-Gens oder des Gens selbst die Ursache für die Veränderungen in Antibiotikaresistenzen darstellt und möglicherweise entscheidend für druckabhängiges Wachstum ist, wurde die Expression des Gens mit Northern Blot im Wildtyp und der Hochdruckmutante bestimmt. Die *ssrA*-Sequenz in *L. sanfranciscensis* war unbekannt und wurde durch PCR mit den von Schönhuber et al. [2001] abgeleiteten Universalprimern L11 und L12 und anschließender Sequenzierung bestimmt (Abbildung 3.19). Die so erhaltene *ssrA*-Sequenz aus *L. sanfranciscensis* ist zu 96% mit der aus *L. plantarum* CNRZ211 (AF375576) homolog. Der Proteolyse-Tag AKNNNNSYALAA**, der an unvollständig translatierte Proteine angehängt wird, ist identisch mit dem anderer Laktobazillen, wie *L. plantarum* oder *L. brevis* (Tabelle 3.17).

```

1   ACGGATTTCGACAGGTATGGTTCGTGCCTGAACTGCACTTCGTACTGCGATGCGTTAAATC
    Primer L11
61  GTCAGTTTAAATTATAACTGCAAAAAATAATAACAATTCCTACGCCTTAGCTGCCTAATA
                                A K N N N N S Y A L A A **
121 AGTAGTCGACGTAGATCCAACCTAATCTTGTCCATGGATTAGATTTGGGTCCTAAATTAAA
181 TGGACTTACGCTTTTATACTCCCATCTGAAGTATGAAGAAGAGATTAACCAGATTAGCTT
241 TTCATATTAGCCTTGATTAATGGCGTCATGATTAGTGAAGTAAATGATTAGTCTATGA
301 GGTAGACGTTTCAGGTGGCGACATAGCTCGGATCGCGGGTTCGACTCCC
                                Primer L12

```

Abbildung 3.19: Partialsequenz des *ssrA*-Gens von *L. sanfranciscensis* DSM20451^T. Das Gen wurde mit den Universalprimern L11 und L12 (unterstrichen) amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenz startet/endet je ca. 5 bp vor dem potentiellen Ende/Anfang des Gens. Der Proteolyse-Tag, der an aus dem Ribosom gelöste mRNAs gehängt wird, ist fett markiert.

Tabelle 3.17: Vergleich der Sequenz des Proteolyse-Tagsequenz aus *L. sanfranciscensis* mit den bekannten Proteolyse-Tags anderer Laktobazillen und *E. coli* (Quelle: <http://psyche.uthct.edu/dbs/tmRDB/tmRDB.html>)

	Proteolyse-Tag der tmRNA
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	AKNNNNSYALAA**
<i>Lactobacillus brevis</i>	AKNNNNSYALAA**
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CNRZ211	AKNNNNSYALAA**
<i>Lactobacillus sakei</i>	ANNNNSYAVAA*
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ANNENSYAVAA*
<i>Lactobacillus casei</i>	AKNENSYALAA**
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ANNENSYAVAA*
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ANNKNSYALAA*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain NCFM	ANNKNSYALAA*
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	ANNKNSYALAA*
<i>Escherichia coli</i>	ANDENYALAA**

3.4.6 Induktion der tmRNA

Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA aus Wildtyp und Hochdruckmutante bei 0,1 MPa und nach jeweils 30minütiger Hochdruckbehandlung bei 50 MPa isoliert. Spezifische Sonden für *ssrA* und das Referenzgen *xpk* wurden mit demselben Northern-Blot gleichzeitig hybridisiert. Abbildung 3.21-A zeigt, dass *ssrA* bei 0,1 MPa bei der Hochdruckmutante deutlich stärker transkribiert wurde als beim Wildtyp. Die 30minütiger Hochdruckbehandlung bei 50 MPa induzierte auch *ssrA* im Wildtyp selbst. Doch auch im Vergleich zum Wildtyp unter Hochdruck ist die Transkription in der Mutante bei atmosphärischen Druck stärker. Eine annähernde Quantifizierung der gegen mit *xpk* normalisierten

ssrA-Transkription ist in Abbildung 3.21-B dargestellt. Demnach ist in der Mutante ca. die 3,5fache tmRNA-Menge des Wildtyps enthalten.

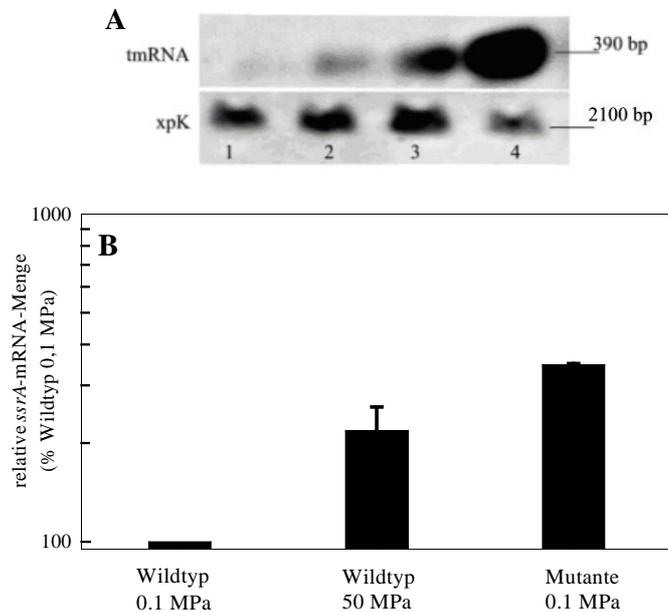


Abbildung 3.20: Northern-Blot-Analyse der tmRNA-Expression.

- A) Von jeder Probe wurden gleiche Mengen RNA im Gel aufgetrennt. Die Membranen wurden gleichzeitig mit tmRNA- und *xpk*-spezifischen Sonden hybridisiert. Wildtyp: 0,1 MPa(1), 50 MPa/ 30 min(2); Hochdruckmutante: 0,1 MPa(3), 50 MPa/ 30 min (4).
- B) Quantifizierung der Northern Blot-Hybridisierungssignale als *ssrA*-Expression im Verhältnis zu *xpk* mit Image Master II. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.4.7 Untersuchung weiterer Gene, in denen Mutationen wahrscheinlich sind

Neben Veränderungen der tmRNA-Expression kämen auch Mutationen in Genen ribosomaler Proteine oder rRNA-Sequenzen als Ursache für die veränderten Empfindlichkeiten gegenüber ribosomalen Antibiotika in Frage. Besonders auffällig war das Verhalten gegenüber Aminoglykosiden bezogen auf die Fähigkeit spontan Resistenzen ausbilden zu können. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen der ribosomalen Proteine S4, S5 und S12, deren Beitrag zur Ausbildung von Streptomycinresistenzen bereits in Literatur umfassend beschrieben wurde [Wilson et al., 2004] beschrieben wurde und das PCR-Produkt aller 16S rRNA-Operons von Wildtyp und Hochdruckmutante miteinander verglichen. Unterschiede zwischen den Sequenzen beider Stämme konnten nicht beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Im Fall der 16S rRNA, von der es in *Lactobacillus sanfranciscensis* mindestens sieben Kopien gibt (Abbildung 3.2) wären Unterschiede in einer dieser Kopien der Gesamtsequenz aller Operons nicht zu erkennen. Die zusätzliche Klonierung des 16S rDNA-PCR-Produktes und anschließender Auswahl einer repräsentativen Anzahl von Klonen zur Sequenzierung des Sequenzabschnitt der 16S rDNA, in denen die meisten Mutationen, die zu Aminoglykosidresistenzen führen, auftreten (bp 942-1542) sollte hier Aufklärung bringen. Unterschiede zu den Sequenzen des

Wildtyp (Abschnitt 3.4) konnten auch mit diesem Ansatz nicht erkannt werden. Das Alignment der 16S rDNA-Sequenzen der einzelnen Klone mit der Sequenz des Wildtyps ist im Anhang dargestellt (Anhang 7.4).

Zusätzlich wurde das gesamte 16S rDNA-Amplikon mit 35 verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Es gab keine Unterschiede zwischen den Restriktionsmustern von Wildtyp und Hochdruckmutante.

3.5 Aktivierung von IS-Elementen und Transposasen durch Hochdruck

3.5.1 Induktion der Transkription von IS-Elementen durch Hochdruck

IS-Elemente und Transposons werden in Bakterien unter verschiedenen Stressbedingungen aktiviert. Hingegen ließ sich keine Publikation finden, die die Induktion und Aktivierung dieser Elemente durch Hochdruck untersucht. Nachdem *xpk* als nichtdruckreguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen identifiziert werden konnte (Abschnitt 3.3.1) und damit zur Normalisierung von Expressionsdaten herangezogen werden kann, wurde eine mögliche Hochdruckinduktion von Transposasen/ IS-Elementen in *L. sanfranciscensis* durch Real-Time-PCR überprüft. Als Versuchsbedingungen wurden 30minütige Hochdruckbehandlungen bei einem subletalen Druck von 45 MPa bzw. 80 MPa im Vergleich zum atmosphärischen Druck gewählt. Zum Zeitpunkt der Durchführung des Versuchs waren sieben Transposasen bzw. IS-Elemente so weit sequenziert, dass aus den Sequenzen Primer für die Real-Time-PCRs abgeleitet werden konnten. Erst später stellte sich heraus das zwei der getesteten Transposasen (Transposase A und B), Bestandteile des gleichen IS-Elements, ISLsf6 sind. Für zwei der IS-Elemente, ISLsf2 bzw. ISLsf3 wurde zwar mit genomischer DNA als Template ein Fluoreszenzsignal erhalten, eine Transkription beider Elemente war aber weder bei 0,1 MPa noch unter den gewählten Hochdruckbedingungen nachweisbar. Die mit der Transkription des Referenzgens *xpk* normalisierten Transkriptionsverhältnisse der anderen fünf IS-Elemente/ Transposasen sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

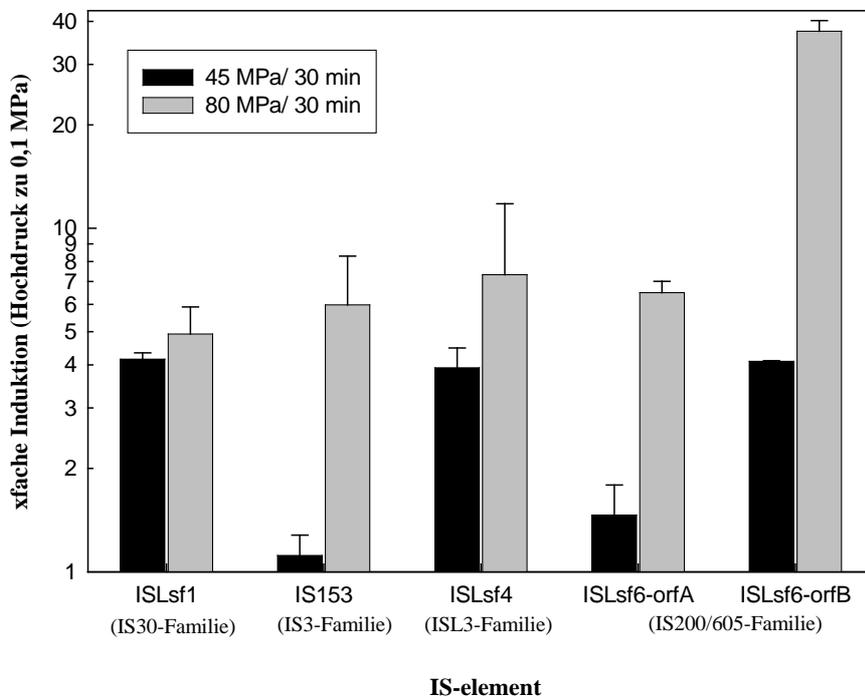


Abbildung 3.21: Induktion der Transkription von IS-Elementen/ Transposasen durch eine Hochdruckbehandlung von *L. sanfranciscensis* bei 45 MPa/30 min (schwarze Balken) bzw. 80 MPa/30 min (graue Balken) in Relation zum atmosphärischen Druck. 45 MPa 30 min. Die mit der Real-Time-PCR erhaltenen Transkriptionsverhältnisse wurden mit den Transkriptionsverhältnissen des Referenzgens *xpk* normalisiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Durch die 30minütige Hochdruckbehandlung bei 45 MPa wurde die Transkription von ISLsf1, ISLsf4 und das Transposase B ähnliche Gen (*orfB*) von ISLsf6 induziert. Eine Erhöhung des Druckes auf 80 MPa führte auch zur druckinduzierbaren Transkription der für IS153 und des Transposase A ähnlichen Gens (*orfA*) von ISLsf6. In allen Fällen, außer für ISLsf1 brachte diese Erhöhung des Drucks auch eine stärkere Transkription der IS-Elemente/ Transposasen mit sich. Interessanterweise waren *orfA* und *orfB*, beide Bestandteile desselben IS-Elements (ISLsf6) unterschiedlich stark induziert.

3.5.2 Hochdruck begünstigt IS-Element vermittelte chromosomale Umstellungen

Eine stärkere Transkription von Transposasen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass IS-Elemente springen [Taddei et al., 1997]. Um zu überprüfen, ob Hochdruck nicht nur die Transkription der IS-Elemente, sondern auch ihre Mobilität erhöht, wurde *L. sanfranciscensis* wie in 2.7.3 beschrieben für 1 bzw. 25 Wachstumszyklen bei 50 MPa und -zum Vergleich- 0,1 MPa inkubiert. Danach wurde aus einzelnen Kolonien genomische DNA isoliert, mit *EcoRV* bzw. *VspI* verdaut und mit DIG-dUTP markierten Sonden von insgesamt 9 IS-Elementen/Transposasen -IS1, IS153, ISLsf1, ISLsf2, ISLsf3, ISLsf4, den Transposasen A und B von ISLsf6 und den Transposasen H1- hybridisiert¹. Die Hybridisierungsergebnisse sind, ausser für IS1 in Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23 dargestellt.

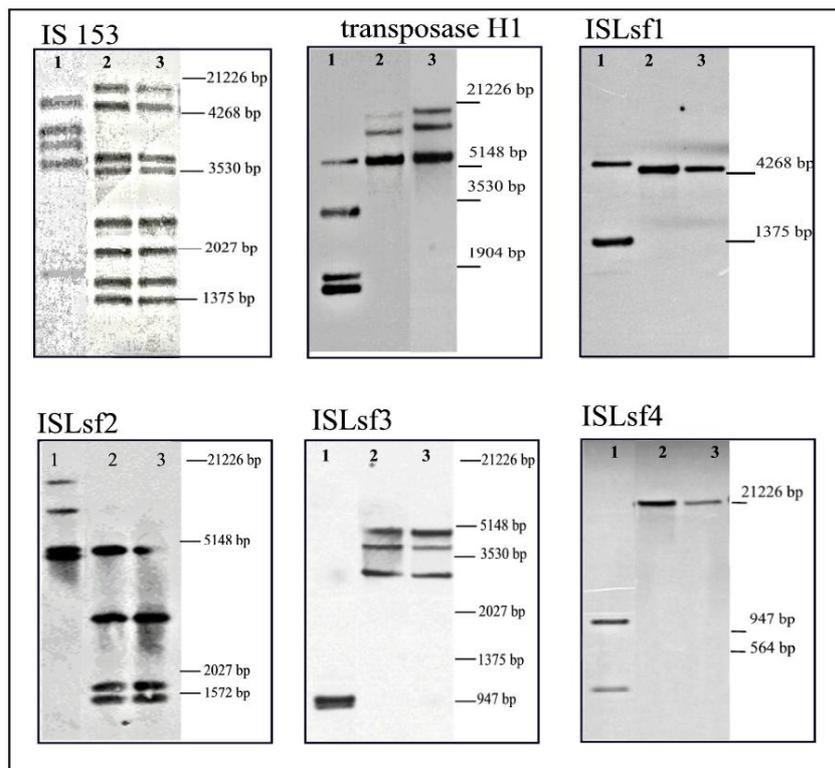


Abbildung 3.22: Southern-Blot-Hybridisierung mit spezifischen Sonden mobiler DNA-Elemente aus *L. sanfranciscensis*: Hybridisierung von *VspI* bzw. *EcoRV*-verdauter genomischer *L. sanfranciscensis* DNA mit

¹ Tabelle 3.3 gibt nähere Informationen zu den einzelnen mobilen DNA-Elementen.

Als Primer zur Synthese der Gensonden wurden die in Tabelle 2.4-F angegebenen Primer verwendet.

spezifische Sonden für die jeweiligen IS-Elemente/ Transposasen. (1) *VspI*-Verdau *L. sanfranciscensis* aus Gefrierkultur, (2) *EcoRV*-Verdau *L. sanfranciscensis* aus Gefrierkultur, (3) *EcoRV*-Verdau nach 25 Wachstumszyklen bei 50 MPa. Die Hybridisierung im Fall der Hochdruckmutante mit *EcoRV*-verdauten DNAs aus 16 verschiedenen Einzelkolonien durchgeführt. Es war kein Unterschied zwischen den Hybridisierungsmustern dieser Einzelkolonien zu erkennen. Die Abbildung zeigt jeweils das Ergebnis einer repräsentativen Hybridisierung.

Für *IS153*, *ISLsf1*, *ISLsf2*, *ISLsf3*, *ISLsf4* und den Transposasen H1 und H2 war auch nach 25 Wachstumszyklen bei 50 MPa noch keine Veränderung im Hybridisierungsmuster gegenüber dem Wildtyp erkennbar (Abbildung 3.22).

Hingegen deuten die Southern-Blot-Hybridisierungen mit *orfB* bzw. *orfA* von *ISLsf6* als Sonde auf eine hochdruckinduzierte chromosomale Umordnung hin (Abbildung 3.23). In allen Hybridisierungen mit genomischer DNA aus Kolonien nach einem Wachstumszyklus (insgesamt 10 Kolonien) oder 25 Wachstumszyklen (insgesamt 40 Kolonien) Wachstum unter Hochdruck fehlte im Vergleich zum Wildtyp ein 5.3-kb *EcoRV* bzw. 1.9-kb-*VspI*-Fragment (gekennzeichnet durch Pfeil I). Klone, die aus einer zweiten *L. sanfranciscensis* Ausgangskultur nach einem Wachstumszyklus bei 50MPa isoliert wurden, wiesen das gleiche, veränderte Hybridisierungsmuster auf. Diese Veränderung konnte in keinem der repräsentativ ausgewählten Klone nach Wachstum bei 0,1 MPa beobachtet werden.

Weitere Veränderungen im Hybridisierungsmuster von *orfB* aus *ISLsf6* mit *EcoRV* verdauter DNA traten entweder sowohl nach Wachstum bei 50 MPa als auch bei atmosphärischem Druck auf (Pfeil II) oder wurden, wie die Insertionen, die mit Pfeil III und IV markiert sind, nur in einzelnen Kolonien nach dem Hochdruckwachstum beobachtet. Die weitere Arbeit konzentrierte sich wegen der Reproduzierbarkeit und dem Auftreten in allen Hochdruckkolonien auf die mit Pfeil I markierte chromosomale Umordnung.

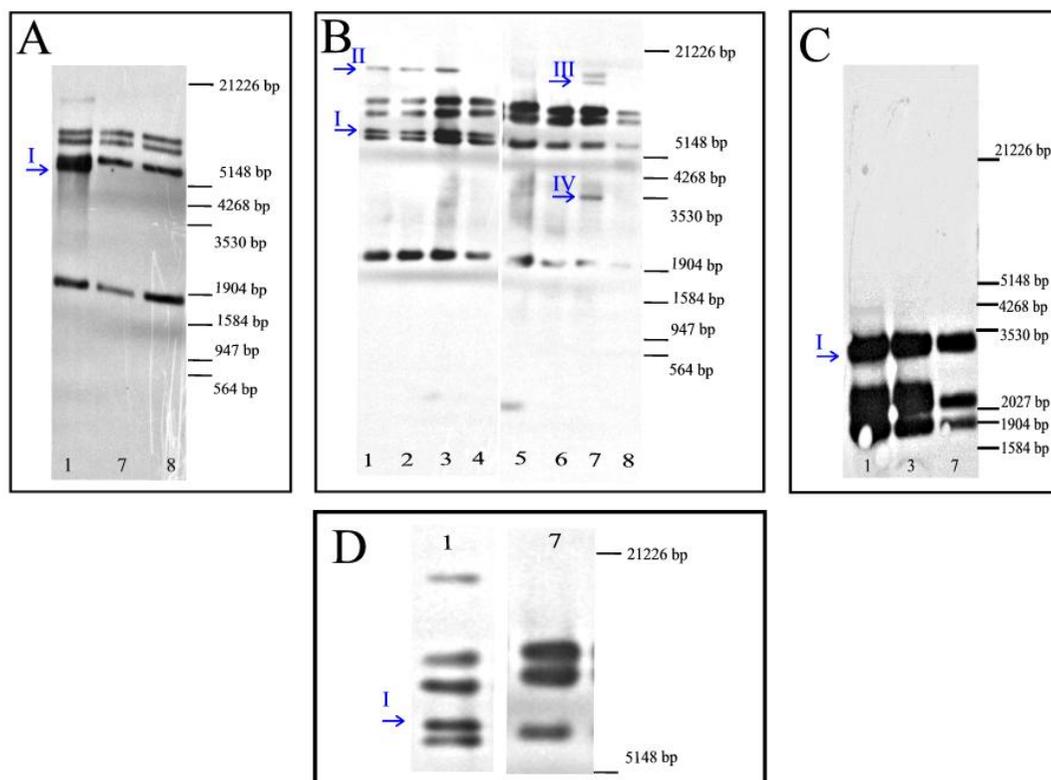


Abbildung 3.23: Southern-Blot-Hybridisierung mit ISLsf6 spezifischen Sonden: Hybridisierung von *VspI* bzw. *EcoRV*-verdauter genomischer DNA des *L. sanfranciscensis* Wildtyp und der Hochdruckmutanten (25 Wachstumszyklen bei 50 MPa) mit spezifischen Sonden für *orfA* oder *orfB* von ISLsf6. Pfeile I bis IV weisen auf Unterschiede im Hybridisierungsmuster hin.

- A) Hybridisierung der *EcoRV*-Verdaus mit einer Transposase-A-spezifischen Gensonde
- B) Hybridisierung der *EcoRV*-Verdaus mit einer Transposase-B-spezifischen Gensonde
- C) Hybridisierung der *VspI*-Verdaus mit einer Transposase-B-spezifischen Gensonde
- D) Ausschnittsvergrößerung aus B für Reihe 1 und Reihe 7

(1) *L. sanfranciscensis* direkt aus Gefrierkultur, (2) nach 1 Wachstumszyklus bei 0,1MPa, (3/4) nach 25 Wachstumszyklen bei 0,1 MPa, (5/6) nach 1 Wachstumszyklus bei 50 MPa (7/8) nach 25 Wachstumszyklen. Die Hybridisierung im Fall mit *EcoRV* verdauten DNAs nach 25 Wachstumszyklen bei 50MPa wurde mit 20 verschiedenen Einzelkolonien durchgeführt. Die Abbildung zeigt jeweils das Ergebnis repräsentativer Hybridisierungen. *L. sanfranciscensis* wurde in einem zweiten unabhängigen Versuch ein weiteres Mal für 1Wachstumszyklus einem Druck von 50MPa ausgesetzt. Das Hybridisierungsmuster war das gleiche.

3.5.3 Charakterisierung von ISLsf6 und Insertionsstellen



Abbildung 3.24: A) Aufbau von ISLsf6. ORFs sind als Kästen eingezeichnet. Pfeile geben die Richtung der Transkription an. Die Streifen in *orfA* und *orfB* geben die Lage der Sonden an, die mit *EcoRV* bzw. *VspI* verdauter genomischer DNA hybridisiert wurde. Erkennungssequenzen beider Restriktionsendonukleasen sind ebenfalls eingezeichnet. Potentielle -10 und -35 Promotorbereiche für *orfB* sind unterstrichen. Vermutliche Start- und Stoppcodons beider ORFs sind fett gedruckt und in die Aminosäuresequenz übersetzt.

B) Repeats in den Termini von ISLsf6. Fette Großbuchstaben heben DR, eingekästelte Bereiche palindromische Bereiche hervor.

ISLsf6 gehört zur Familie der IS200/605 Elemente. Es ist 1856 bp lang und besteht aus zwei aufeinanderfolgenden, aber nicht überlappenden ORFs (*orfA* und *orfB*, Abbildung 3.24A), die beide für potentielle Transposasen kodieren. ORFA besteht aus 116 Aminosäuren, die zu 52% homolog zu ORFA von ISfae4 aus *Enterococcus faecium* (AAM09847) ist. ORFB von IS605 aus *Enterococcus faecium* (AAM09847) weist mit 46% die höchste Homologie zu ORFB von ISLsf6 (392 Aminosäuren) auf. Beide ORFs scheinen unabhängig voneinander transkribiert zu werden. Der vermutliche Promotorbereich für *orfB* ist in Abbildung 3.24-A eingezeichnet.

In der terminalen ISLsf6-Region konnten zwei DR aber keine längeren IR Bereiche fixiert werden. Beide DRs einer terminalen Region bilden palindromische Sequenzen (Abbildung 3.24-B).

Gemeinsamkeiten zwischen den bisher identifizierten Insertionsbereichen gibt es nicht. Im Fall der Malatpermease entstand durch die Insertion ein 2 bp langes DR (AT, Abbildung 3.26).

A) Upstream von ISLsf6	
Malatpermesae	ACCAGTTTCGAT ttttatccataaattggcgagaataacccccacttcgacaagtgggggatgaatcgctc
ORF-II	CTTTTAAATAA ttttatccataaattggcgagaataacccccacttcgacaagtgggggatgaatcgctc
IS605-1	ACGCTTGGTTGA ttttatccataaattggcgagaataacccccacttcgacaagtgggggatgaatcgctc
Malatpermesae	cttaaagcacgatagtgctttttcttttgcgctatgggtatatttagtatatgttaaaggaatcgtggtgataacaATG _{orfA}
ORF-II	cttgaagcacgatagtgctttttcttttgcactatgggtatatttagtatatgttaaaggatcgtggtgataacaATG _{orfA}
IS605-1	cttaaagcacgatagtgctttttcttttgcgctatgggtatatttagtatatgttaaaggatcgtggtgataacaATG _{orfA}
B) Downstream von ISLsf6	
NTP Pyrohydrolyase	_{orfB} TAA gtatgcatggttcccagaatctcccacttcaagcgtcaagccgtaggcttagctaagtgggagtagttcaa TAGACCATCG
IS605-2	_{orfB} TAA gtatgcatggttcccagaatctcccacttcaagcgtcaagccgtaggcttagctaagtgggagtagttcaa TTACATCTAT
nr4	_{orfB} TAA gtatgcatggttcccagaatctcccacttcaagcgtcaagccgtaggcttagctaagtgggagtagttcaa TTACAGCTAT
Multiple drug transporter	_{orfB} TAA gtatgcatggttcccagaatctcccacttcaagcgtcaagccgtaggcttagctaagtgggagtagttcaa TATGGCAACT
Malatepermease	_{orfB} TAA gtatgcatggttcccagaatctcccacttcaagcgtcaagccgtaggcttagctaagtgggagtagttcaa ATGTCAGTGG

Abbildung 3.25: Flankierende Regionen von ISLsf6. Die terminalen Regionen von ISLsf6 selbst sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Unterschiede in den Sequenzen zwischen den terminalen Regionen wurden grau unterlegt. Start bzw. Stop von *orfA* bzw. *orfB* sind in helleren Großbuchstaben, die jeweils ersten 10 bp der flankierenden Sequenzen selbst in fetten Großbuchstaben dargestellt.

Da in den *ISLsf6*-spezifischen Sonden selbst weder *EcoRV* noch *VspI* Schnittstellen waren, deutet deren Hybridisierung mit dem Southern Blot (Abbildung 3.23) darauf hin, dass mindestens sechs Kopien von *ISLsf6* im Genom von *L. sanfranciscensis* vorhanden sind. Um das chromosomale Ereignis nachvollziehen zu können, auf dem der beobachtete Verlust des 5.3-kb *EcoRV* bzw. 1.9-kb *VspI*-Fragments hinweist (Pfeil I, Abbildung 3.23), wurden flankierende Sequenzen mit inverser PCR identifiziert. Es konnten drei flankierende Regionen upstream und drei flankierende Regionen downstream von *ISLsf6* identifiziert werden (Abbildung 3.26).

<u>Upstream</u>	<u>Downstream</u>
→ Malatpermease	→ Malatpermease
→ zweite Kopie von ISLsf6	→ zweite Kopie von ISLsf6
→ 252 bp mit einem 54 Aminosäuren langen Ende eines ORFs ohne Homologie zu Datenbankeinträgen (<i>orf-II</i>)	→ potentielle NTP-pyrohydrolyase
	→ potentieller Transkriptionsregulator
	→ 23S rRNA Methyltransferase
	→ Multiple Drug Transporter

Abbildung 3.26: Bisher identifizierte flankierende Sequenzen upstream und downstream von ISLsf6.

PCRs mit einem Primer in *ISLsf6* und einem in den jeweiligen flankierenden Sequenzen, zeigten das *orf-II* upstream und dem multiple drug transporter Gen (*mdr*) downstream alle identifizierten flankierenden Sequenzen auch nach dem Wachstum unter subletalen Hochdruckbedingungen noch vorhanden waren (Abbildung 3.27).

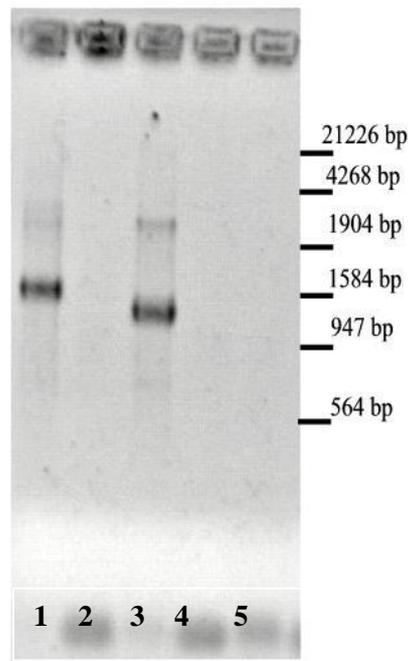


Abbildung 3.27: Flankierende Regionen der von der Transposition betroffenen ISLsf6-Kopien
Agarosegel der PCR-amplifizierten genomischen DNA aus

Bande 5) dem *L. sanfranciscensis* Wildtyp

Bande 1, 3) *L. sanfranciscensis* nach 25 Wachstumszyklen bei 0,1 MPa

Bande 2, 4) *L. sanfranciscensis* nach 25 Wachstumszyklen bei 50 MPa

Die Primer für Bande 1 und 2 waren IS6_{flank_V} und ISLsf6_orfA_R, für Bande 3 und 4) ISLsf6_orfB_V und mdr_R, für Bande 5) IS6_{flank_V} und mdr_R.

Sowohl *orf-II*, als auch *mdr* können dem Verlust des Hybridisierungssignals, der durch Pfeil I in Abbildung 3.23 markiert wird zugordnet werden. Die durch Pfeil II markierte Umordnung (ca. 18000 bp) kommt nicht in Frage. Eine PCR mit der DNA von Bande 4 in Abbildung 3.23 und einem Primer in ISLsf6 und einem in *orf-II* oder *mdr* immer noch PCR-Produkte für beide flankierende Sequenzen ergibt. Der Verlust des ca. 18000 bp langen Fragments war aber schon aufgetreten.

Hingegen können *mdr* und *orf-II* nicht der selben ISLsf6-Kopie zugeordnet werden. Eine PCR mit einem Vorwärtsprimer in *orf-II* und einem Rückwärtsprimer in *mdr* führte auch im Wildtyp von *L. sanfranciscensis* zu keinem PCR-Produkt (Abbildung 3.27).

4 Diskussion

4.1 Genomsequenzierung

Eine der möglichen Strategien zur Sequenzierung von Genomen beginnt mit der shot-gun-Klonierung und Sequenzierung von kleineren DNA-Fragmenten. Die verbleibenden Lücken zwischen den Contigs werden dann durch die Sequenzierung von BAC-Klonen oder Multiplex-PCR-Produkten geschlossen [z.B. Pridmore et al., 2004]. Der Grundstein für die Genomsequenzierung von *L. sanfranciscensis* DSM 20451^T wurde in dieser Arbeit mit 2500 Sequenzierungen der shot-gun-Genbank gelegt. Die gewählte Fragmentgröße von 900-1800bp ergab sich aus einem weiterem Ziel dieser Arbeit; der Konstruktion eines Mikroarrays für *L. sanfranciscensis*. Längere Fragmente hätten die Wahrscheinlichkeit steigen lassen, dass mehr als ein bis zwei ORFs pro gespottetes Fragment vorhanden sind und die Aussagekraft des Mikroarrays beeinträchtigt.

Die erreichte ca. 24% Abdeckung des Genoms von *L. sanfranciscensis* liegt dabei unter Berücksichtigung nicht auswertbarer Sequenzierreaktionen im Rahmen der erwarteten theoretischen Abdeckung nach den zur Verfügung stehenden 2500 reads. Nimmt man, abgeleitet von Klaenhammer et al. [2002] und Altermann et al. [2004] für Milchsäurebakterien eine durchschnittliche Länge von ca. 930 bp pro ORF und einen Anteil proteinkodierender Sequenzen von ca. 90% an, beträgt der Anteil der ansequenzierten ORFs an allen zu erwartenden ORFs im Genom von *L. sanfranciscensis* 42%.

Die zu diesem Zeitpunkt noch geringe Abdeckung des Genoms ermöglicht eine klassische Diskussion der Genomsequenzierungsergebnisse von *L. sanfranciscensis* noch nicht, denn:

- 1) Die Gewichtung der einzelnen funktionellen Klassen kann sich noch zu(un)gunsten anderer verschieben. Theoretisch ist mehr als die Hälfte aller ORFs noch nicht einmal ansequenziert. Die Einteilung der identifizierten potentiellen ORFs wurde anhand der Homologien nach Datenbankabgleichen mit BLASTX- vorgenommen. Es ist daher noch nicht auszuschliessen, dass z.B. das 3' und 5'Ende des selben Proteins zwei unterschiedlichen Proteinen zugeordnet wurde.
- 2) über Pseudogene kann noch keine Aussage gemacht werden. Leserahmenverschiebungen können auch auf Sequenzierfehlern beruhen und der Leserahmen nur ansequenzierter, in Anhang 7.1 aufgelisteter Gene könnte in der fehlenden Sequenz unterbrochen sein. Die Klassifizierung und Auflistung der potentiell proteinkodierenden Gene von *L. sanfranciscensis* (Tabelle 3.1; Anhang 7.1) ist unter diesem Vorbehalt zu betrachten. So wurde z.B. ein potentielles Teichonsäurebiosyntheseprotein (*tagB3*) identifiziert, ohne das Teichonsäuren in der Zellwand von *L. sanfranciscensis* vorkommen [Weiss und Schillinger, 1984]. Die Annahme, das es sich hier um ein Pseudogen handelt, liegt nahe.

Das Problem der Überannotation liegt allerdings auch in vollständig sequenzierten Genomen vor, wenngleich es dann eher auf die falsche Annotation von bestimmten Orphans als intakte Gene zurückzuführen ist [Mira et al., 2002; Skoovgard et al., 2001].

Allgemeine Aussagen, ob z.B. sich bestimmte biosynthetische Eigenschaften aus den Sequenzen ableiten oder nicht ableiten lassen könnten oder die Regulatoren von *L. sanfranciscensis*, so wie die der bereits sequenzierten Laktobazillen, v.a. der RpiR- und GntR-Familie angehören [Pridmore et al., 2004] sind damit nicht möglich.

Nichtsdestotrotz, wesentliche mit dieser Phase der Sequenzierung verbundene Ziele wurden mit der vorliegenden Arbeit bereits erreicht. So ist die Datenmenge z.B. ausreichend, um gezielt Contigs zu schliessen und Sequenzdaten von Genen in konservierten Genombereichen ohne zeitaufwändiges Ableiten degenerierter Primer und Durchführen inverser PCRs zu schliessen (beispielsweis erhalten der Sequenz von *clpP* nach Abschluß dieser Arbeit).

Auch legte die Sequenzierung die Grundlage, einzelne Eigenschaften von *L. sanfranciscensis*, wie die Vitamin-B₁₂-Biosynthese (Abschnitt 3.2.1) oder das proteolytische System [Vermeulen et al., 2005] genauer zu charakterisieren. Die hohe Anzahl von Transportern für Aminosäuren bzw. Peptide (Anhang 7.1, Abschnitt 3.1.4) lässt sich mit der Auxotrophie für eine Reihe von Aminosäuren erklären, die wiederum auf die proteinreichen Umweltbedingungen zurückzuführen sein könnte [Pridmore et al., 2004; Bolotin et al. 2001]. *L. sanfranciscensis* gilt unter den Milchsäurebakterien des Sauerteigs, als dasjenige mit der höchsten Aktivität von Amino-/ Di- und Tripeptidasen [Gobbetti et al. 1996].

So, wie das proteolytische System für die Bildung von Aromastoffen im Sauerteig mitverantwortlich ist, beeinflussen Exopolysaccharide dessen Textur. Neben der bereits charakterisierten Levansukrase konnten weitere möglicherweise exopolysaccharidbildende Proteine identifiziert werden (Abschnitt 3.1.6).

L. sanfranciscensis verfügt, wie *Lactococcus lactis* über *hemK*, einer Protoporphyrinogenoxidase, die an den letzten Schritten der Hämbiosynthese beteiligt ist [Bolotin et al., 2001]. Ebenso ungewöhnlich ist das Vorliegen von zwei Genen für CtsR-Regulatoren (Abbildung 3.1). Fraglich bleibt, ob beide Regulatoren aktiv sind.

Die Anzahl der verschiedenen Typen von IS-Elementen in *L. sanfranciscensis* ist höher als die in anderen bisher sequenzierten Laktobazillen [Klaenhammer et al., 2002; Tabelle 3.3]. Während für *L. sanfranciscensis* bisher mindestens 13 IS-Typen -acht verschiedene IS-Elemente und fünf Transposasen, bei denen eine Einordnung als IS-Element noch nicht möglich war, aus sieben Familien- eindeutig identifiziert werden konnten, waren es bei den anderen Laktobazillen zwischen zwei und sechs verschiedenen IS-Typen. Selbst die acht verschiedenen IS-Typen von *Lactococcus lactis* MG1363 sind einer geringeren Anzahl an IS-familien zuzuordnen als die aus *L. sanfranciscensis* [Klaenhammer et al., 2002]. Die nach Klaenhammer et al. [2002] in Laktobazillen am häufigsten

vorkommenden IS-Familien, IS3, ISL3 und IS30, sind auch im Genom von *L. sanfranciscensis* vertreten (Tabelle 3.3). Allein der IS3-Familie sind vier verschiedene IS-Elemente aus *L. sanfranciscensis* (ISLsf2, ISLsf3, ISLsf5, IS153) zuzuordnen (Tabelle 3.3).

L. sanfranciscensis verfügt über mindestens sieben 16S rRNA-Operons (Abschnitt 3.1.7.1). Ungewöhnlicher als die hohe Anzahl an Operons -ca. 30% aller bisher vollständig sequenzierten Bakterien haben mehr als sechs Operons- und die Nukleotidunterschiede zwischen ihnen ist die Anzahl der verschiedenen Operons; mindestens fünf der mindestens sieben Operons unterscheiden sich voneinander (Anhang 7.3) [Arcinas et al., 2004].

4.2 Charakterisierung einzelner Gene

4.2.1 Vitamin-B₁₂-Biosynthese

Der Nachweis, dass *Lactobacillus reuteri* Cobalamine synthetisieren kann [Taranto et al., 2003] und die Existenz eines Cobyrynsäuresynthasegens (*cobQ*) im Genom von *L. sanfranciscensis* DSM20451 waren der Anlaß verschiedene *L. sanfranciscensis*-Stämme und andere Sauerteigspezies auf ihr Vitamin-B₁₂-Synthesevermögen zu screenen.

Cobalamine können nicht vom Menschen selbst synthetisiert werden, sondern müssen durch die Nahrung aufgenommen werden [Biesalski und Grimm, 1999]. Sie bestehen aus einem zentralen Cobaltatom mit sechs Liganden. Vier der Liganden sind die Pyrrole des Corrin-Ringes, eines das Nukleotid Dimethylbenzimidazol. Der sechste Ligand natürlich vorkommender Cobalamine ist entweder ein Hydroxy- (Vitamin B₁₂), Methyl- (Methylcobalamin) oder 5'-Desoxyadenosyl- (Desoxyadenosylcobalamin)-Rest. Bei künstlich synthetisierten Cobalamin bildet ein Cyanidrest diesen Liganden [Michal et al., 1999a; Abbildung 7.5.1].

Es werden zwei alternative Stoffwechselwege, ein aerober und ein anaerober, unterschieden, die Uroporphyrinogen III in Cobalamin überführen (Abbildung 7.5.1). Der wesentliche Unterschied zwischen beiden ist der Zeitpunkt des Einbaus des Cobaltatoms. Der komplette aerobe Cobalamin-Biosyntheseweg wurde für *Pseudomonas denitrificans* exemplarisch aufgeklärt. Der anaerobe Weg, von z.B. *Salmonella typhimurium* weist noch Unsicherheiten auf [Raux et al., 1996; Roth et al., 1996; Scott und Roessner, 2002].

Die von der Cobyrynsäuresynthase CobQ charakterisierte Reaktion von Adenosylcobyrynatdiamid zu Adenosylcobyrynathexaamid ist in beiden Stoffwechselwegen dieselbe (Abbildung 7.5.1)

Neben *cobQ* wurde ein Gen für eine Tetrapyrrolmethylase. Tetrapyrrolmethylasen sind an den Methylierungen zwischen Precorrin 2- bzw. Cobalt-Precorrin 2 und Precorrin 5- bzw. Cobalt-Precorrin 5 beteiligt [Scott und Roessner, 2002; Roth et al., 1996]. Beide Gene *-cobQ* und das der Tetrapyrrolmethylase- sind in anderen Mikroorganismen, die Cobalamine synthetisieren können, wie *S. Typhimurium*, *Bacillus megaterium* und *P. denitrificans* in Operons organisiert [Raux et al., 1996; Raux et al., 1998; Roth et al., 2002]. In *L. sanfranciscensis* sind in der Umgebung dieser beiden Gene, keine weiteren Cobalaminbiosynthesegene vorhanden (Abbildung 3.3). Das wirft die Frage auf, ob beide Gene nicht nur Überbleibsel eines kompletten B₁₂-Biosyntheseweges sein könnten. Die Transkription von *cobQ* in *L. sanfranciscensis* spricht zumindest dafür, dass dieses für ein aktives Enzym kodiert (Abbildung 3.4). Eine endgültige Antwort würde eine Überexpression, Aufreinigung und Charakterisierung des Proteins liefern. Das Substrat, Adenosylcobyrynatdiamid, allerdings ist nicht kommerziell zu erwerben und müßte mit, für die Zielsetzung dieser Arbeit, zu hohem Aufwand aus Vitamin-B₁₂-Biosynthese-positiven Mikroorganismen isoliert oder nach der Methode von Weissbach et al. [1959] hergestellt werden.

Auch die Bioassays mit *Lactobacillus delbrueckii* als Indikatorstamm sprechen dafür, dass einige *L. sanfranciscensis*-Stämme zur Cobalaminsynthese fähig sind (Tabelle 3.5). Auch wenn es sich bei dem *L. delbrueckii*-Assay um eine offizielle Referenzmethode handelt (Official Methods of Analysis of AOAC International) [Horwitz, 2000], ist dieser Assay mit Unsicherheiten verbunden. *L. delbrueckii* kann, wenn Desoxyribonukleotide als Vorstufen vorliegen, Cobalamine selbst bilden [zitiert nach Taranto et al., 2003]. Es ist nicht auszuschließen, dass in den Zellextrakten der Stämme, die das Wachstum von *L. delbrueckii* ermöglichten, diese Desoxyribonukleotide in erhöhten Konzentrationen vorlagen und kein Cobalamin gebildet wurde. Die sichere Aussage, dass ein Stamm cobalaminbiosyntheseaktiv ist, erfordert Bioassays mit weiteren Vitamin-B₁₂-auxotrophen-Stämmen, die an verschiedenen Stellen ihres eigentlich vorhandenen Cobalaminbiosyntheseweges Mutationen aufweisen [vergleiche z.B. Taranto et al., 2003]. Auch die Abhängigkeit des Wachstums *L. delbrueckii* von der Konzentration des Zellextraktes erschwert die Interpretation des Bioassays (Abbildung 3.5).

Der Versuch Stämme auf ihr Vitamin-B₁₂-Synthesevermögen durch ihre Fähigkeit zum Wachstum auf dem B₁₂-freien Assaymedium zu screenen, scheint auf den ersten Blick eine geeignete und einfache Methode zu sein. Fehlendes Wachstum muss allerdings nicht fehlendes Vitamin-B₁₂-Biosynthesevermögen bedeuten, sondern könnte aber auch auf die Limitierung anderer Substanzen zurückzuführen sein. Kritisch sollte auch stimmen, dass 15 von 22 getesteten Stämmen auf dem VB₁₂AM wachsen konnten und somit zur Cobalaminbiosynthese fähig sein sollten (Tabelle 3.5). In anderen Studien, wie der von Albert et al. [1980] war keine der zwölf getesteten Laktobazillen in der Lage, meßbare Mengen an Cobalaminen zu bilden.

Die Hinweise dieser Studie auf die cobalaminbildende Eigenschaft von *L. sanfranciscensis* zeigen, eine detailliertere Beschäftigung mit dieser potentiellen Fähigkeit, sinnvoll ist und soll als beispielhafter Beleg dienen, aus der shot-gun-Sequenzierung des Genoms bereits jetzt praktisch verwendbare Resultate hervorgehen.

4.2.2 ISLsfI

ISLsfI gehört zu der Familie der IS30-Elemente. Typisch für IS30-Elemente ist eine Gesamtlänge von 1000-1.200 bp, die für ein ORF flankiert von 20-30 bp langen IRs kodieren. Das für Transposen von IS30 –Elementen konservierte katalytische DD(33)E(R) Motiv [Chandler und Mahillon, 2002], war auch im transposasehomologen ORF vom ISLsfI wiederzufinden. Der basische pI des ORF (pI=10,26) spricht ebenfalls für ein DNA-bindendes Protein. Während andere Transposasen dieser IS-Familie bei ihrer Transposition die Wirts-DNA so zerschneiden, dass 2-3bp lange DRs entstehen [Review: Chandler und Mahillon, 2002], gab es keine DRs die ISLsfI flankieren. Das Fehlen solcher DRs läßt sich durch homologe Rekombinationen zweier IS-Elemente mit unterschiedlichen DR oder als Folge angrenzender Deletionen durch duplikative intramolekulare Transposition erklären [Turlan und

Chandler, 1995; Weinert et al., 1983]. Die bevorzugte Insertion in AT-reiche Regionen ($\geq 76\%$) wurde bereits bei anderen IS30-Elementen beobachtet [Vaughan and de Vos, 1995; Dong et al., 1992].

Die Transkription von IS30 Transposase wird im allgemeinen von einem schwachen Promotor gesteuert [Chandler und Mahillon, 2002], dessen -35 Region bei ISLsfI direkt auf das zu folgen scheint, gesteuert.

Wie die IS1, IS3, IS256 oder ISL3-Familien bilden auch IS30-Elemente während ihrer Transposition sogenannte „circle-junctions“, in denen IRR und IRL des IS-Elements miteinander verknüpft werden [Turlan und Chandler, 1995; Polard et al., 1996; Duval-Valentin et al., 2001, Lyon et al., 1987; Kallastu et al., 1998]. Es entsteht ein starker Promotor, dessen -35 Region im IRR und die -10 Region im IRL liegt. Durch diesen stärkeren Promotor kann mehr Transposase gebildet werden, die die Integration des IS-Elements stimuliert [Olasz et al., 1993; Duval-Valentin et al., 2001]

Die -35 Promotorregionen in den Termini von IS-Elementen können auch die Transkription nachfolgender Gene beeinflussen [Boyen et al., 1978; Jaurin und Normak, 1983; Olliver, 2005; Saedler et al., 1974; Treves et al., 1998]. Für ISLsfI in *L. sanfranciscensis* spielt diese Eigenschaft keine Rolle, in den 800 bp, die downstream von ISLsfI sequenziert wurden, gibt es keine kodierende Region.

Die Transpositionsaktivität von Transposasen in der Nähe oder im IS-Element selbst ist effizienter, als die die von Transposasen gleicher Art ausgeübt wird, die in einem anderen Bereich des Genoms kodiert werden [Review, Chandler und Mahillon, 2002]. Kiss et al. [2003] konnten zeigen, dass ortsspezifischer Rekombinasen gegen IS30-DDE-Transposasen austauschbar sind. Auch für ISLsfI muss erst nachgewiesen werden, dass das ORF des IS-Elements und nicht die Integrase upstream von ISLsfI für mögliche Transpositionereignisse verantwortlich ist.

BLAST-Datenbankrecherchen zeigten nur geringe Homologie zu bereits sequenzierten IS-Elementen. Am ähnlichsten war ISLsfI zu IS1070 von *Lactococcus lactis* (45%). Mit Southern-Hybridisierungen und PCR-Screening sollte untersucht werden, ob ISLsfI spezifisch für *L. sanfranciscensis* ist. ISLsfI kam in der Mehrzahl der getesteten *L. sanfranciscensis*-Stämme und keinen anderen Milchsäurebakterien vor. Erst vor kurzem, während des Zusammenschreibens der Arbeit, war ein zu 95% homologes IS30-Element aus *Pediococcus pentasaceus* (ZP_00322405.1) in den Datenbanken zu finden.

Das Vorkommen von ISLsfI in unterschiedlichen EcoRV-Fragmenten zeigt, dass nicht davon, dass nicht von einer für alle *L. sanfranciscensis*-Stämme gleichen Insertionssequenz ausgegangen werden kann. Die geringe Kopiezahl (höchstens eine Kopie pro Stamm) spricht nicht unbedingt gegen die Aktivität von ISLsfI, das im übrigen in *L. sanfranciscensis* DSM20451^T transkribiert wird, sondern kann auch ein Zeichen hoher Sequenzspezifität sein.

4.3 Einfluss von Hochdruck auf das Transkriptom

4.3.1 Bewertung des Mikroarrays

Der Shotgun-Mikroarray lieferte zuverlässige Daten über die hochdrucksensitive Genexpression in *L. sanfranciscensis*, die mit Real-Time-PCRs verifiziert werden konnten und bereits bekannten Proteomstudien übereinstimmten [Drews et al., 2002, Scheyhing et al., 2002].

Die vier generellen Fehlerquellen von Mikroarrayanalysen -biologische, technische, farbstoff- und mikroarraybedingte Schwankungen- wurden weitestgehend durch Poolen von Proben, Häufigkeit der Hybridisierungen, „Dye-swaps“ und doppelten Spotten der Probe auf jeden einzelnen Array ausgeschlossen [Bowtell und Sambrook, 2002]. Unspezifische Hybridisierungen wären durch die Anwesenheit von Alien-DNAs auf dem Mikroarray erkannt worden.

Die eher geringen Induktionsverhältnisse (-2,5 bis +3,9fach) sind systembedingt. Mit Mikroarraystudien werden generell Induktionsverhältnisse niedriger als 10fach und nur in Ausnahmefällen auch höhere Induktionsverhältnisse gemessen [Conway und Schoolnik, 2003]. Vergleiche dieser Induktionsverhältnisse mit denen aus Real-Time-PCRs und Northern-Blot-Hybridisierungen zeigten, dass mit Mikroarrays gemessene Zu-/Abnahmen von Transkripten oft 2-10fach zu gering waren [Review, Conway und Schoolnik, 2003]. In dieser Arbeit wurde die gleiche Beobachtung gemacht (Tabellen 3.8 und 3.9).

Der hier gewählte Ansatz der Shot-gun-Mikroarray-Technologie hat gerade im Fall von Mikroorganismen, deren Genomsequenz nicht bekannt ist, einige Vorteile im Vergleich zu konventionellen Mikroarrays. Die Produktion von Shot-gun-Mikroarrays ist innerhalb eines kürzeren Zeitraums realisierbar und zudem kosteneffizienter, denn nur Gene, die unter den betrachteten Bedingungen differentiell reguliert werden, müssen sequenziert werden. Dennoch können aus den Shot-gun-Array-Daten wertvolle Einblicke in die Genregulation gewonnen und Arbeitshypothesen abgeleitet werden. Diese Daten können dann gezielt überprüft und erweitert werden, entweder mit einem zweiten Array, auf dem gezielt bestimmte Gene gespottet wurden oder Real-Time-PCRs und Northern Blots. Die in dieser Studie gewonnenen Mikroarraydaten und Ergebnisse der Real-Time-PCR spiegeln Hochdruckeffekte auf transkriptionaler Ebene wieder, die schon zuvor *in vitro*, auf physiologischer Ebene oder in Proteomstudien beobachtet wurden.

Bei der Interpretation der Mikroarraydaten muss bedacht werden, wenngleich in der folgenden Diskussion nicht mehr ausdrücklich erwähnt, dass Änderungen im Transkriptom zwar in vorangegangenen Studien mehrheitlich auf das Proteom zu übertragen waren, aber nicht vorausgesetzt werden können [Eymann et al., 2002; Hommais et al., 2001; Yoshida et al., 2001]. Ebenso wenig ist ein zuverlässiger Rückschluss auf genregulatorische Mechanismen möglich, denn zwischen mRNA-Stabilisierung und transkriptioneller Regulation kann in der vorliegenden Studie nicht unterschieden werden, wie posttranslatorische Mechanismen oder die Bedeutung der Proteolyse für die

Genregulation nicht berücksichtigt werden [Conway und Schoolnik, 2003; Jenal und Hengge-Aronis, 2003].

4.3.2 Identifizierung eines nichtdruckregulierten Gens

Das Wissen über hochdrucksensitive Genexpression ist gering. Shotgun-Mikroarrays liefern wertvolle Einblicke die Genregulation unter Hochdruck, decken allerdings, wie hier, praktisch oft nur einen Teil des Genoms ab. Die Analyse der Expressionsverhältnisse von einzelnen Genen, die nicht auf dem Shotgun-Mikroarray vertreten waren, kann erforderlich werden. Zudem kann der Vergleich einzelner hochdruckregulierter Gene mit der Genregulation anderer Stressbedingungen für die Aufklärung möglicher Regulationsmechanismen entscheidend sein. Liegen präzise Fragestellungen vor, sind Northern-Blot-Hybridisierungen oder Real-Time-PCRs oft zeit- und kostengünstiger.

In beiden Fällen wird die Expression von Genen meist relativ zu sogenannten housekeeping-Genen quantifiziert. Eine wichtige Voraussetzung eines Housekeeping-Gens ist die konstitutive Expression auf gleichem Niveau unter allen analysierten Bedingungen. Gene, die essentiell für Erhalt der Zellfunktion sind, wie z.B. solche für Enzyme der Glykolyse oder ribosomale Untereinheiten sind ideale Kandidaten. Die tatsächliche Nichtregulation potentieller Housekeepinggene muss, bevor sie zur relativen Quantifizierung eingesetzt werden, unter den gewählten Bedingungen verifiziert werden. Ribosomale rRNAs kommen für die Normalisierung in Real-Time-PCRs nicht in Frage. Sie kommen in wesentlicher höherer Kopiezahl als mRNAs vor und würden ein Verdünnen der cDNA für optimale Amplifizierungsbedingungen erfordern. Unterschiede in den cDNA-Verdünnungstufen zwischen Referenz- und Zielgen führen zu nichtidentischen Experimentbedingungen, durch z.B. Verdünnen von Inhibitoren. Gerade ribosomale Prozesse werden zudem durch Hochdruckbehandlung inhibiert; eine Nicht-Regulation ribosomaler Gene ist nicht vorauszusetzen.

Die Identifizierung eines Housekeepinggens, das nicht druckreguliert war und das Potential besitzt, auch unter anderen Stressbedingungen nicht reguliert zu werden, war eine der zentralen Aufgaben der Mikroarrayanalyse. Im Vorfeld ins Auge gefaßte Kandidaten, wie Maltosephosphorylase, Phosphoglukomutase bzw. Phosphotransacetylase, erwiesen sich als druckreguliert. Das Sequenzieren der DNA-Fragmente von Spots mit einem Fluoreszenzverhältnis von 1,0 zeigte, dass das Gen der Phosphoketolase *xpk* nicht druckreguliert ist. Die Phosphoketolase spaltet das im Pentosephosphatzyklus entstandene D-Xylose-5-Phosphat zu Acetylphosphat und D-Glyzeraldehyd-3-Phosphat (und H₂O) [Michal, 2006b]. Das Gen der Phosphoketolase *xpk* erfüllt damit alle Voraussetzungen, um als Referenzgen zur Normalisierung von Mikroarraydaten, Northern Blots oder Real-Time-PCRs eingesetzt zu werden. Es ist nicht hochdruckreguliert und wird dennoch konstitutiv exprimiert. Die Beteiligung an einem zentralem Stoffwechselweg läßt vermuten, das es auch unter anderen Stressbedingungen nicht reguliert wird. Die Möglichkeit *xpk* als Referenzgen für Hitze- und

Kältestress in *L. sanfranciscensis* verwenden zu können, wurde dann später auch durch Northern-Blots bestätigt [Hörmann, 2006].

4.3.3 Hochdruckeffekte auf ribosomale Prozesse

Überleben unter Stressbedingungen erfordert eine Vielzahl zellulärer Reaktionen. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, wie Bakterien Stress wahrnehmen. Nicht nur die Membran [Beney und Gervais, 2001; Russel et al., 1995], sondern auch das Ribosom [VanBogelen und Neidhardt, 1990] werden als Sensoren für verschiedene Stressbedingungen diskutiert. So beeinträchtigen hohe Temperaturen die Genauigkeit der Translation und erfordern die Induktion von molekularen Chaperonen und Proteasen, während Kälte vorübergehend die Translationsinitiation inhibiert und damit die Kapazität des Proteinsyntheseapparates senkt [Friedman et al., 1969; Broeze et al., 1978; VanBogelen und Neidhardt, 1990; Farewell und Neidhardt, 1998]. Antibiotika können sowohl die Genauigkeit, als auch die Kapazität der Translation beeinflussen [Wilson, 2004]. Aminosäurelimitierungen wirken sich zuerst auf die Beladung der tRNAs aus, wodurch vom Ribosom die „stringent response“ vermittelt wird [Emilsson und Kurland, 1999; Iskakova et al., 2004; Mechold und Malke, 1997].

Eine der primären Auswirkungen von subletalen Hochdruck auf zelluläre Prozesse betrifft ebenfalls das Ribosom. Durch den Einfluss von subletalen Hochdruck verändert sich die Konformation des Ribosoms. Diese Konformationsänderung wird auf die 30S-Untereinheit zurückgeführt [Pope et al., 1975; Smith et al., 1975], inhibiert die Bindung von aa-tRNAs ans Ribosom und resultiert daher in einer Verringerung der Kapazität der Translation [Schwarz und Landau, 1972a]. Hochdruckinduzierte Veränderungen im Transkriptionsprofil von *L. sanfranciscensis* weisen darauf hin, dass die Zelle versucht dieser Kapazitätsabnahme entgegenzuwirken, indem (a) Translationsfaktoren, (b) Gene die an der Regulation der Translationsgenauigkeit beteiligt sind und -in Bezug auf das Ribosom-Sensor-Modell- (c) Stressgene reguliert werden.

4.3.3.1 Regulation von Translationsfaktoren

Die ribosomale Proteinbiosynthese wird in drei Phasen unterteilt: Initiation, Elongation und Termination. Es wurden hochdruckinduzierte Veränderungen in den Transkripten von Translationsfaktoren aller drei Phasen untersucht. Die Inhibierung der aa-tRNA-Bindung an die ribosomale A-Seite spielt eine zentrale Rolle bei der hochdrucksensitiven Proteinbiosynthese [Schwarz und Landau, 1972b]. Diese zentrale Rolle wird auch im Transkriptionsprofil der Translationsfaktoren von *L. sanfranciscensis* reflektiert.

Die Gene der Translationselongationsfaktoren (EF) Tu und Tsf wurden induziert. Die Induktion von EF-TU durch hydrostatischen Hochdruck wurde bereits auf Proteinebene von *L. sanfranciscensis* nachgewiesen [Drews, 2002]. Beide EF sind an der Bindung der aa-tRNA an das Ribosom beteiligt.

Auch die Tatsache das Gene für Translationfaktoren, deren Produkte an der Translokation oder Termination beteiligt sind, entweder nicht reguliert (*prfC*) oder reprimiert (*fusA*, *prfB*) wurden, deutet auf eine limitierende Reaktion vor der Translokation hin. Das Gen des EF-G (*fusA*) wurde bei einer Erhöhung des Drucks auf 80 MPa nicht mehr reprimiert.

Bei Drücken oberhalb von 80 MPa werden, zumindest in *E.coli* nicht nur ribosomale Prozesse, sondern dann auch die Transkription inhibiert wird [zitiert nach Bartlett, 2002, Review]. Eine Veränderung der hochdruckinduzierten Genexpression war daher zu erwarten.

Das Gen des Translationsinitiationsfaktors InfB wurde bei 45 MPa induziert. InfB bindet die Initiations-tRNA f_{Met} und GTP an das Ribosom. Die Induktion von *infB* scheint eine generelle zelluläre Reaktion auf eine Verringerung der Translationskapazität, wie z.B. im Fall von Kälteschock [Friedman et al., 1969; Broeze et al., 1978; Farewell und Neidhardt, 1998], von Ribosomen zu sein. Außerdem konnte von Caldas et al. [2000] eine Wirkung von InfB als molekulares Chaperon nachgewiesen werden.

Auch zeigte sich in den Transkriptionsverhältnissen, dass, wie bereits *in vitro* nachgewiesen, nicht die Beladung der tRNA mit Aminosäuren und damit Aminosäuremangel, der limitierende Schritt der Proteinbiosynthese unter Hochdruck ist [Schwarz und Landau, 1972a]. Eine ungenügende Beladung würde eine „stringent response“ auslösen, durch die auch tRNA-Synthetasen induziert werden [Steiner und Malke, 2000]. Hingegen wurde von den neun tRNA-Synthetase-Genen, die auf jeden Fall auf den Array gespottet wurden, nur das Gen der Histidyl-tRNA-Synthetase unter Hochdruck reguliert (Tabelle 3.11).

4.3.3.2 Regulation der Translationsgenauigkeit

Hochdruck beeinflusst die Genauigkeit der Translation. Bereits Hardon und Albright [1974] konnten *in vitro* zeigen, das der Einbau nichtpassender Aminosäuren mit steigenden hydrostatischen Druck bis zu 30 MPa reduziert wird. Oberhalb von 30 MPa war die Menge der insgesamt verbrauchten Aminosäuren so gering, das eine zuverlässige Bestimmung der Einbau-Rate nichtpassender Aminosäuren nicht möglich war. Die Tatsache, das dieser Effekt *in vitro* beobachtet wurde, spricht gegen eine spezifische, hochdruckinduzierte Regulation der verbesserten aa-tRNA-Auswahl und für die Hypothese, das dieser Effekt eine Konsequenz der hochdruckinduzierten Konformationsänderung ist, gerade weil die ribosomale Konformation ein kritischer Faktor der Genauigkeit der Translation ist. Hardon und Albright [1974] hatten in ihrer Arbeit lediglich den Einbau von Lysin anstelle der passenden Aminosäure Phenylalanin untersucht. In diesem Fall hatte die induzierte Konformationsänderung den beschriebenen positiven Effekt auf die Translationsgenauigkeit. Betrachtet man jedoch die Induktion von Hitzeschockproteinen und der Vielzahl von Genen, deren Produkte dem Auftreten und den Folgen von Translationsfehlern in *L. sanfranciscensis* entgegenwirken, kann man nur zu dem Schluss kommen, dass die Konformationsänderung die

Auswahl der passenden Aminosäure negativ beeinflusst. Gene für Translationsfehler reduzierende Proteine waren vor allem solche für ribosomale Proteine und GTPasen. So ist z.B. das ribosomale Protein Rps2 (2,2fach induziert) essentiell für die Inkorporation von Rps1 in die 30S ribosomale Untereinheit [Moll et al., 2001]. Rps1 wiederum beeinflusst die Codon-abhängige Auswahl der passenden aa-tRNA [Potapov und Subramanian, 1992]. Eine Induktion ribosomaler Proteine als Reaktion auf subletalen Hochdruck wurde bereits von Welch et al.[1993] im *E. coli*-Proteom beobachtet.

Die hochdruckinduzierten GTPasen ThdF/TrmE und GidA haben ebenfalls Einfluss auf die Translationsgenauigkeit. Beide GTPasen sind an Modifikationen von tRNAs beteiligt, die +1 und +2 Leserahmenwechsel reduzieren [Bregeon et al., 2001; Urbonavicius et al., 2001]. TrmE baut 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in die wobble Position bestimmter tRNAs ein. Damit wird sowohl das Erkennen dieser tRNAs von den jeweiligen tRNA-Synthetasen, als auch die Codon-Anticodon-Wechselwirkung verbessert [Krüger et al., 1998; Krüger und Sørensen, 1998; Cabedo et al., 1999].

4.3.3.3 Stressproteine

Hochdruck induziert sowohl Gene, deren Produkte als Hitzestressproteine (Hsp60, ClpL, Ppk, Ppx), Kälteschockproteine (InfB, GyrA, ORF1) oder Säurestressproteine (GuaA) beschrieben (Tabellen 3.8 und 3.9), aber auch an anderen Stressreaktionen beteiligt sind [Gualerzi et al., 2003; van de Guchte et al., 2002; Rao und Kornberg, 1996; Shiba et al., 2000]. Die gleichzeitige Induktion von Hitze und Kälteschockproteinen durch Hochdruck in *L. sanfranciscensis* scheint zunächst paradox zu sein, wurde aber bereits von Welch et al. [1993] in *E. coli* beobachtet. Dieser Zusammenhang zwischen stressinduzierter Beeinträchtigung ribosomaler Prozesse und der Induktion von Kälte- oder Hitzestressproteinen wurde bereits von VanBogelen und Neidhardt [1990] diskutiert. Ihre Hypothese kann, mit einigen Ergänzungen, auch auf Hochdruckstress übertragen werden.

Die Gemeinsamkeit zwischen Kälteschock und Hochdruck liegt in der Verringerung der translationalen Kapazität [Schwarz und Landau, 1972a, Friedman et al., 1969; Broeze et al., 1978; Farewell und Neidhardt, 1998]. Kälteschock reduziert vorübergehend die Anzahl der Polysomen und inhibiert die Initiation der Translation. Die induzierte Kälteschockreaktion überführt kälteempfindliche, inaktive Ribosomen in kälteresistente, aktive. Die Folge ist die Erhöhung der Anzahl der Polysomen und damit der Translationskapazität [Thieringer et al., 1998]. Die genaue Funktion des möglichen Kälteschockgens *orf1*, das in *L. sanfranciscensis* am stärksten durch Hochdruck induziert wurde ist nicht bekannt. Im allgemeinen sind ATP-abhängige DEAD-RNA-Helikasen wie Orf1 am RNA-Metabolismus beteiligt. Dazu gehören sowohl die Prozessierung von RNA, als auch deren Transport, Abbau, Translation oder ribosomale Funktionen [de la Cruz et al., 1999; Tanner und Lindner, 2001]. Vor allem die Regulation der mRNA-Stabilität ist in Zusammenhang mit Kälteschock und reduzierter Translationskapazität wichtig. DEAD-Helikasen

gehören auch zu den ribosomenassoziierten Kälteschockproteinen, die Ribosomen in die beschriebene kälteresistente Form überführen [Thieringer et al., 1998]. Neben den beschriebenen Kältstressgenen, wurde im Proteom von *L. sanfranciscensis* ein weiteres Csp Kältstressprotein hochdruckreguliert [Drews et al., 2002]. Die beiden induzierten Gene für die Hitzeschockproteine GroEL und ClpL sind molekulare Chaperone und wurden ebenfalls auf Proteinebene von *L. sanfranciscensis* induziert [Hörmann et al., 2006].

4.3.3.4 Zusammenfassung: Auswirkung auf ribosomale Prozesse

Der primäre von Hochdruck induzierte Effekt besteht in der Veränderung der ribosomalen Konformation. Diese Konformationsänderung inhibiert die aa-tRNA-Bindung [Schwarz und Landau, 1972b] und beeinflusst die konformationsabhängige Auswahl der passenden tRNA. Daraus resultiert eine niedrigere Proteinsyntheserate [Albright, 1969] und ein häufigeres Auftreten translationaler Fehler, wie für andere Stressarten wie Antibiotika, die die ribosomale Bindestelle beeinträchtigen, beschrieben wurde [Melancon et al., 1992]. Aus diesem Grund stellt die gleichzeitige Hochdruckinduktion von Kälte -und Hitzestressgenen als sekundärer Hochdruckeffekt keinen Widerspruch dar. Die Reduktion der translationalen Genauigkeit führt zur Induktion von molekularen Chaperonen (ClpL, GroEL, EF-TU, InfB) oder Proteasen (PepC, PepO), während die Abnahme der Proteinsyntheserate Kälteschockgene induziert. Abbildung 4.1 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

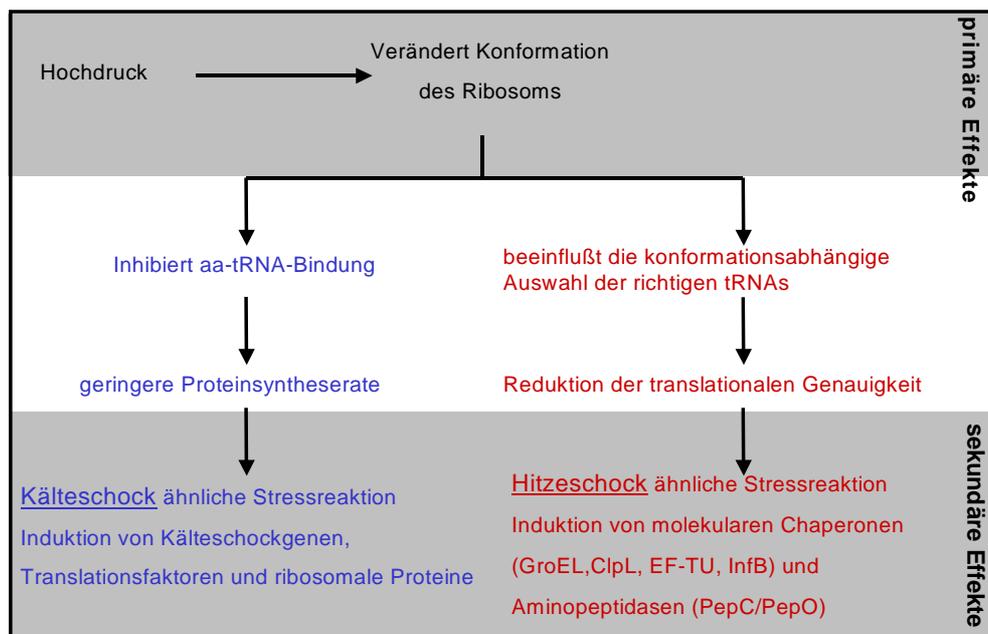


Abbildung 4.1: Induktion von Kälte- und Hitzeschockgenen durch subletalen Hochdruck in *L. sanfranciscensis* angelehnt an das Ribosom-Sensor-Modell von VanBogelen und Neidhardt [1990]

4.3.4 GTPasen und andere druckregulierte Gene

Bei 33% aller der hier als hochdruckreguliert identifizierten Gene (bzw. 46% der davon in ihrer Funktion charakterisierten) handelt es sich um Gene, die für Proteine kodieren, die Reaktionen katalysieren, die direkt vom GTP-Gehalt oder GTP:GDP-Verhältnis abhängen. Die Auswirkungen von Hochdruck auf den GTP/ GDP-Gehalt der Zelle konnten in dieser Arbeit noch nicht bestimmt werden. Die GTP:GDP-Abhängigkeit anderer bereits charakterisierter Hochdruckeffekte weist jedoch darauf hin, dass im GTP:GDP-Verhältnis eine Ursache der veränderten Genexpression unter Hochdruck zu suchen sein könnte. Es wird z.B. die unter Hochdruck inhibierte Zellteilung auf die GTPase FTSZ zurückgeführt [Ishii et al., 2004]. Der Polymerisierungsgrad von FTSZ-Polymeren hängt vom GTP:GDP Verhältnis ab; liegt viel GDP in der Zelle vor, zerfallen FTSZ-Polymere [Huecas, 2004]. Die Zellteilung wird inhibiert.

Die Bedeutung des Phosphat und Guaninflusses wurde bereits für die Säurestressreaktion von Laktokokken beschrieben. Die GMP-Synthetase *GuaA* ist an der Synthese von GMP aus XMP involviert und beeinflusst in *Lactococcus lactis* die Reaktion auf Säurestress [Duwat, 1999]. *GuaA* konnte im Transkriptom von *L. sanfranciscensis* unter Hochdruck als induziert identifiziert werden (Tabelle 3.8).

Die Aktivitäten von Polyphosphatkinase (PPK) und Exopolyphosphatase 3 (PPX3) haben Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *E. coli* bei Hitze-, osmotischen, oxidativen Stress, aber auch beim Eintreten in die stationäre Phase [Rao und Kornberg, 1995]. PPX verbessert durch das Übertragen des terminalen Polyphosphatrestes unter ATP-Bildung auf dADP die Energieversorgung der Zelle. PPK katalysiert u.a. die reversible Reaktion von $\text{polyP}_{n+} + \text{GDP} \leftrightarrow \text{polyP}_{n-1} + \text{GTP}$ und greift damit auch in den GTP-Kreislauf und die Aktivität von GTPasen ein [Tzeng und Kornberg, 2000].

Auch die Auswirkungen von Hochdruck auf die Zusammensetzung der Zellmembran spiegeln sich in der Mikroarrayanalyse wider. So konnte das für die Phosphomevalonatkinase kodierende Fettsäurebiosynthesegen *mvak2* als induziert identifiziert werden. Die Beeinflussung des Kohlenstoffmetabolismus durch Hochdruck, ist an den Induktionen von *pgmA* (Phosphoglukomutase), *map* (Maltosephosphorylase), *gntK* (Glukonatkinase) und *cps1d* (Glykosyltransferase) und der Repression eines Fragments eines Dexransukrasegens und des Phosphotransacetylasegens zu erkennen.

4.3.5 Vergleich mit den Proteomdaten

Der in der Proteomstudie von *L. sanfranciscensis* verwendete Druck von 80 MPa [Hörmann et al., 2006] wurde aufgrund der potentiellen Beeinträchtigung der Transkription bei diesem Druck nicht für die Transkriptomstudie verwendet (Abschnitte 1.2.1 und 3.3.2). Es ist daher nur ein Vergleich zwischen dem Proteom nach einer Stunde bei 80 MPa und dem Transkriptom nach 30 min bei 45 MPa bzw. einigen wenigen Real-Time-PCR-Daten bei 80 MPa nach 30 min möglich. Vergleicht man beide

Bedingungen auch mit den Proteomdaten von Drews et al. [2002; Abschnitt 1.4], sind sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zwischen Proteom und Transkriptom zu erkennen.

Induziert werden sowohl im Transkriptom als auch im Proteom ClpL, GroEL, eine Ribokinase, der Elongationsfaktor TU und Aminopeptidasehomologe. Unterschiede zwischen Transkriptom und Proteom sind für die GMP-Synthetase GuaA und DnaJ zu beobachten. GuaA wird im Transkriptom dreifach induziert, im Proteom jedoch reprimiert [Tabelle 3.8, Drews et al., 2002]. DnaJ wird im Proteom induziert [Hörmann et al., 2006], die Mikroarrayanalyse ergab, ebenso wie Real-Time-PCRs für *dnaK*, dass das *dnaK*-Operon nicht durch Hochdruck reguliert wird (Tabelle 3.13, Abbildung 3.12). Obwohl in Real-Time-PCR und darauffolgenden Hybridisierung von Northern Blots mit *dnaK*-spezifischen Sonden die selben mRNA-Proben eingesetzt wurden, zeigten Northern-Blots eine Induktion von *dnaK* durch Hochdruck an [Hörmann, 2006].

Probleme mit der reversen Transkription von *dnaK*-mRNA könnten eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse für *dnaK* im Transkriptom liefern, erscheint aber unwahrscheinlich. Für Hitzeschock war der Nachweis der Induktion von *dnaK* nicht nur mit Northern-Blot-Hybridisierungen, sondern auch mit Real-Time-PCR und Mikroarrayanalyse möglich.

4.3.6 Einfluss der mRNA-Stabilität auf die Genexpression unter Hochdruck

Neben der Regulation der Transkription hat auch die Stabilität eines Transkripts Einfluss auf die mRNA-Menge eines Gens. Angesichts des langfristigen Ziels, Gemeinsamkeiten hochdruckinduzierbarer Promotoren zu identifizieren, ist es wichtig zwischen beiden Mechanismen unterscheiden zu können. Antibiotika, die gezielt die Transkription blockieren, wie Rifampicin und Rifamycin für Prokaryoten oder Actinomycin für Eukaryoten, werden zur Eliminierung des Einfluss einer transkriptionellen Regulation eingesetzt [Ng et al., 2003]

Bereits Kaarniranta et al. [1993] haben durch die Zugabe von Actinomycin zu einer chondrozytischen Zelllinie feststellen können, dass Unterschiede in den Transkriptionsprofilen unter atmosphärischen und Hochdruckbedingungen auch auf veränderte mRNA-Stabilitäten zurückzuführen sind. Demnach sinkt unter Hochdruck die mRNA-Stabilität schwach transkribierter, hochdruckreprimierter Gene, während steigende mRNA-Stabilitäten nur vereinzelt Einfluss auf die Transkriptmenge haben. So führten sie z.B. die erhöhte *hsp60*-mRNA unter Hochdruck v.a. auf steigende mRNA-Stabilitäten zurück.

Hingegen war eine erhöhte mRNA-Stabilität nicht der Grund für mehr *hsp60*-mRNA unter Hochdruck in *L. sanfranciscensis*. Im Gegenteil, Hochdruck scheint die Stabilität dieser mRNA eher negativ zu beeinflussen.

Auch zeigt der hier durchgeführte Versuch, dass Real-Time-PCRs, oder auch Northern-Blots nicht dazu geeignet sind, mRNA-Stabilitäten zu untersuchen, weil immer die Voraussetzung getroffen werden muss, dass die mRNA-Stabilität des Referenzgens- hier *xpk*- nicht allein durch Zugabe des

Transkriptionsblockers verändert wird. Ob diese Voraussetzung haltbar ist bleibt offen. Ein genomweiter Ansatz (Mikroarrayanalyse) würde hier Abhilfe schaffen.

Doch auch mit genomweiten Ansätzen bliebe die Frage offen, ob Unterschiede in den mRNA-Stabilitäten nicht auch auf die Zugabe des Transkriptionsblockers und nicht nur den Hochdruckstress zurückzuführen sind. Am Beispiel der *hsp60*-mRNA von *L. sanfranciscensis* wurde deutlich, dass die mRNA schon bei atmosphärischen Druck durch Rifampicin stabilisiert wird (Tabelle 3.13), was die Interpretation der Hochdruckdaten erschwert. Kaarniranta et al. [1993] haben die Möglichkeit der Erhöhung der mRNA-Stabilität allein durch Actinomycin nicht untersucht und deren Veränderungen nur auf Hochdruck zurückgeführt, was den hier durchgeführten Versuchen zufolge nicht haltbar ist. Gerade wenn Zellen plötzlich Stress (hier subletalen Hochdruck) ausgesetzt werden, ist die Neusynthese von Proteinen essentiell für die Zelle [Scheyhing et al., 2004].

Ein weiteres Problem, das bei zukünftigen Studien der mRNA-Stabilität unter Hochdruck gelöst werden muss, ist eher technischer Natur. Es muss eine Möglichkeit gefunden werden, den Transkriptionsblocker ohne Unterbrechung der Hochdruckbehandlung und damit Verfälschung des Transkriptionsprofils zu der Kultur zu geben.

4.4 Charakterisierung der Hochdruckmutante

Die Charakterisierung der Hochdruckmutante zeigte, dass sie sich in Bezug auf temperaturabhängiges Wachstum, der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika und der Regulation der tmRNA-Expression vom *L. sanfranciscensis* Wildtyp unterscheidet. Diese Veränderungen hängen eng zusammen und können alle mit Veränderungen in ribosomalen Prozessen der Mutante erklärt werden. Um sicherzustellen, dass die beobachteten Veränderungen der Hochdruckmutante auf Mutationen und nicht Adaptationen zurückzuführen sind, wurde sie vor jedem Versuch zweimal ohne erneute Inkubation unter Hochdruck überimpft (Abschnitt 2.11.1).

4.4.1 Wachstumscharakteristika

Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Hochdruckmutante und Wildtyp konnten sowohl unter Hochdruck, als auch unter atmosphärischem Druck beobachtet werden. Während für die Hochdruckmutante bei 50 MPa sowohl die OD als auch die KBE bei 50 MPa anstieg, nahmen die KBE für den Wildtyp unter Hochdruck ab (Abbildung 3.14). Der gleichzeitige leichte Anstieg der OD der Wildtypkultur bei 50 MPa erscheint zunächst widersprüchlich, könnte aber durch die Zunahme der Filamentösität überlebender Zellen erklärt werden. Weiterhin denkbar wäre, dass der Wildtyp zwar auch unter Hochdruck wächst, die neuen Zellen aber nicht überlebensfähig sind.

Das veränderte Wachstumsverhalten unter Hochdruck, zeigt, dass die Hochdruckbehandlung (50 MPa/ 25 Wachstumszyklen) Mutation(en) ausgelöst hat. Das veränderte Wachstumsverhalten unter atmosphärischem Druck weist auf den Ort der Mutation(en) hin.

Die Temperaturabhängigkeit des Wachstums der Hochdruckmutante war deutlich ausgeprägter als die des Wildtyps. Bei der für *L. sanfranciscensis* optimalen Wachstumstemperatur von 30°C war die maximale Wachstumsgeschwindigkeit 1,5mal höher als die des Wildtyps. Erhöhte Wachstumsraten bei konstanter Temperatur werden auf eine höhere Anzahl aktiver Ribosomen bei unveränderter Translationselongationsrate zurückgeführt [Maaloe, 1979; Neidhardt et al., 1990]. Daraus kann geschlossen werden, dass die Hochdruckmutante bei atmosphärischen Druck und 30°C über mehr aktive Ribosomen verfügt als der Wildtyp.

Auch die verlängerte Lag-Phase der Mutante bei 25°C und ihre höhere Empfindlichkeit gegenüber Kasugamycin weisen auf das Ribosom als Mutationsort hin. Die Initiation der Translation ist sowohl der Wirkungsort von Kasugamycin [Kozhak und Nathans, 1972; Wilson, 2004], als auch der Grund für verlängerte Lag-Phasen bei niedrigen Temperaturen [Friedman et al., 1971]. Beides weist darauf hin, dass bei der Mutante die Regulation der zellulären Reaktion auf die Inhibierung der Translationsinitiation gestört ist.

4.4.2 2D-Gele bei 80 MPa/ 30 min

In Proteomstudien sollte festgestellt werden, ob unter Hochdruck (80 MPa/ 30 min), aber auch atmosphärischen Druck zwischen Wildtyp und Hochdruckmutante Unterschiede in der Expression von Proteinen auftreten. Weder unter den Proteinen die bei 80 MPa bei beiden Stämmen unterschiedlich expremiert wurden, noch bei den bei 0,1 MPa unterschiedlich expremierten, wurden Übereinstimmungen zu hochdruckregulierbaren Proteinen aus *L. sanfranciscensis* [Hörmann et al., 2006] gefunden. Die verbesserte Hochdrucktoleranz der Hochruckmutante ist damit nicht direkt auf bereits identifizierte hochdruckregulierbare Gene aus *L. sanfranciscensis* zurückzuführen. Dennoch zeigt das veränderte Expressionsmuster der Hochdruckmutante, dass Mutation(en), eventuell auch in der Regulation der Expression stattgefunden hat kann /haben können.

4.4.3 Empfindlichkeiten gegenüber Antibiotika

Die Hochdruckmutante zeigte gegenüber 2/3 der getesteten ribosomalen Antibiotika und einigen der Antibiotika, die auf Zellwandsynthese und Zellmembranpermeabilität wirken veränderte Empfindlichkeiten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Abnahme der Resistenz gegenüber Vancomycin und Teicoplanin kann auf die höhere Wachstumsrate der Mutante bei 30°C zurückgeführt werden (Tabelle 3.14), denn schnelleres Wachstum erhöht die Sensitivität gegenüber diesen Antibiotika [Eng et al., 1991].

Die Hochdruckmutante konnte im Gegensatz zum Wildtyp gegen die Aminoglykoside Kana-, Tobra- und Paromomycin spontanresistente Kolonien bilden. Diese Fähigkeit weist darauf hin, dass die Hochdruckbehandlung eine Mutation ausgelöst hat, die eine zweite Mutation, die dann zu den einzelnen resistenten Kolonien führt, erst ermöglicht. Hingegen ging die Fähigkeit spontan streptomycinresistente Kolonien auszubilden im Vergleich zum Wildtyp verloren. Dennoch war die Mutante resistenter gegenüber Streptomycin als der Wildtyp (MICs wurden bestimmt, sind aber nicht dargestellt). Gleichzeitig war ein streptomycinadaptierter *L. sanfranciscensis*-Stamm piezotoleranter als der Wildtyp. Ein Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Piezotoleranz ist damit, wie schon von McMahon und Landau vermutet [1982], offensichtlich. Dennoch müssen in der Hochdruckmutante und der streptomycinresistenten Mutante verschiedene Mutationen vorliegen, die ähnliche Auswirkungen haben. Die streptomycinresistente Mutante wuchs bei atmosphärischen Druck und 30°C schlechter als die Hochdruckmutante oder der Wildtyp und war nicht in dem Ausmaß der Hochdruckmutante piezotolerant.

In der Literatur werden fünf generelle Mechanismen angeführt, die Antibiotikaresistenzen vermitteln. Dazu gehören a) Transportprozesse, b) antibiotikamodifizierende Enzyme, c) rRNA Methylierungen, d) Nukleotidaustausch in Genen von rRNAs oder ribosomalen Proteinen und e) tmRNA Expression [Wilson, 2004; de la Cruz und Vioque, 2001]

Besonders häufig sind Streptomycinresistenzen auf Nukleotidaustausche in den Genen der 16S rRNA oder der ribosomalen Proteine S4, S5 und S12 zurückzuführen [Wilson, 2004]. Die erhöhte Streptomycinresistenz der *L. sanfranciscensis* Hochdruckmutante konnte nicht auf Veränderungen in diesen Genen zurückgeführt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.4.4 Funktion falschgefalteter Proteine in der Reaktion auf Hochdruckstress

In den letzten Jahrzehnten wurden immer wieder vereinzelt piezotolerante Mutanten verschiedener Bakterien und Hefen beschrieben [Aertsen et al., 2004; Fujii et al., 1996; Funaoka et al., 1965; Karatzas und Bennik, 2002; Robey et al., 2001; Marquis und Bender, 1980].

In nur wenigen Fällen konnte der molekulare Hintergrund charakterisiert werden, der in diesen Fällen immer auf eine veränderte Expression von Chaperonen oder ATP-abhängigen Proteasen und deren Regulatoren zurückzuführen war, wie z.B. die erhöhte Druckresistenz von *Listeria monocytogenes* auf eine Mutation im Gen des CtsR-Repressors; der CtsR-Repressor konnte nicht mehr an die Operatorsequenz binden und wurde daher überexprimiert [Karatzas und Bennik, 2002; Karatzas et al., 2003].

In *E.coli* MG1615 wurde die Expression der Hitzeschockproteine DnaK, GroEL, GroES, GrpE, ClpB verändert; in *E. coli* O157:H7 wurden globale regulatorische Elemente wie der Stressregulator sigma^S (*rpoS*) überexprimiert [Aertsen et al., 2004; Robey et al., 2001].

Diese Überexpression von Chaperonen, ATP-abhängigen Proteasen bzw. ihrer Regulatoren in Hochdruckmutanten weist darauf hin, dass die Akkumulation von nicht vollständig synthetisierten und falschgefalteten Proteinen ein generelles Problem für Zellen unter hydrostatischen Hochdruck darstellt. Intakte Proteine oder Enzyme werden bei diesen Drücken um die 50-100 MPa (eher) nicht in ihrer Struktur und Funktionsfähigkeit beeinträchtigt [Balny et al., 1989]. Die Ansammlung des Proteinabfalls ist vielmehr auf die nichtvollständige und fehlerhafte Translation unter Hochdruck zurückzuführen.

4.4.5 Funktion der tmRNA in der Reaktion auf Hochdruckstress

TmRNA (auch bekannt als SsrA oder 10Sa RNA) ist eine kleine, hochstrukturierte RNA, die sowohl in Bakterien, Chloroplasten, Mitochondrien, als auch Eukaryoten vorkommt [Williams, 2002]. TmRNA greift in die Translation bei deren Stillstand ein, um die mRNAs aus dem Ribosom zu lösen. Dabei wird das noch unvollständig translatierte Polypeptid mit einer bestimmten Aminosäuresequenz markiert und von ATP-abhängigen Proteasen, wie ClpAP oder ClpXP erkannt und abgebaut [Keiler et al., 1996; Withey und Friedman, 1999; Williams 2002, Abschnitt 1.2]. TmRNA leistet durch dieses Markieren einen wichtigen Beitrag zur Effizienz der Qualitätskontrolle der Proteinbiosynthese. Es wird vermutet, dass sich die Entscheidung nichtnative Proteine abzubauen oder ihnen mit Hilfe von

Chaperonen die Möglichkeit zu geben sich richtig zu falten aus dem Verhältnis der Verfügbarkeiten von Chaperonen und Proteasen ergibt [Wickner et al., 1999, Abbildung 1.2]. Im Fall der nichtvollständig synthetisierten und von der tmRNA aus dem Ribosom herausgelösten Polypeptide ist eine richtige Faltung kaum möglich. Wenn eine richtige Faltung nicht möglich ist und der Abbau nicht schnell genug eingeleitet wird, interagieren diese Polypeptide und bilden Aggregate, die andere zelluläre Funktionen stören können oder den Pool recyclefähiger Aminosäuren dezimieren [Wickner et al., 1999]. Ein Markieren dieser Polypeptide durch die tmRNA erleichtert das Erkennen durch Proteasen und ihren Abbau.

Die Charakterisierung einer *ssrA*-Deletionsmutante von *Synechocystis* sp., die ebenfalls andere Sensitivitäten als der Wildtyp gegenüber verschiedenen ribosomalen Antibiotika zeigte, bestätigte diese Funktion der tmRNA [de la Cruz und Vioque, 2001].

TmRNA wird im *L. sanfranciscensis* Wildtyp durch subletalen Hochdruck induziert (Abbildung 3.20). Hochdruck inhibiert die aa-tRNA-Bindung an das Ribosom [Schwarz und Landau, 1972a], wodurch die Peptidsyntheserate pro Ribosom sinkt [Albright, 1969]. Der Zustand eines pausierenden Ribosoms wird vorgetäuscht. Das scheinbare Pausieren des Ribosoms aufgrund dieser inhibierten aa-tRNA-Bindung aktiviert tmRNA [Roche und Sauer, 1999].

Eine Mutation in der tmRNA-Regulation, die zu erhöhten Mengen an tmRNA führt, könnte helfen die Akkumulation und Aggregation möglicherweise auch schädlicher Proteinfragmente unter Hochdruck zu verhindern und die Effizienz der Proteolyse erhöhen.

Die Entdeckung einer tmRNA-überexprimierenden piezotoleranten Mutante paßt zu dem in 4.3 diskutierten Ribosom-Sensor-Modell, denn die tmRNA markiert Proteinfragmente für die Proteolyse im Clp-Protease-System [Haebel et al., 2004]. Die Expression der proteolytischen Unterheit der Clp-Proteasen -ClpP-wird in Milchsäurebakterien mit dem Repressor CtsR reguliert [z.B. Vermanen et al., 2000; Chastanet und Msadek, 2003]. ClpL, ebenfalls über CtsR reguliert, wurde sowohl im Proteom, als auch im Transkriptom von *L. sanfranciscensis* induziert [Hörmann et al., 2006; Pavlovic et al., 2005]. Neben den beiden lange bekannten ATPase-Untereinheiten von Clp-Proteasen, ClpA und ClpX können auch ClpC und ClpL mit ClpP Proteasen bilden, wenn sie über ClpP-Bindestellen verfügen [Krüger et al., 2001; Ferretti et al., 2001; Frees und Ingmar, 1999].

Auch die Veränderungen der Antibiotikasensitivitäten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp können auf die erhöhte tmRNA-Menge zurückzuführen sein. Eine Deletion des tmRNA-Gens *ssrA* erhöhte in *Synechocystis* sp. die Empfindlichkeit gegenüber Aminoglykosiden [de la Cruz und Vioque, 2001]. Daraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, dass eine Überexpression der tmRNA die Resistenz gegenüber Aminoglykosiden erhöhen sollte, wie in der *L. sanfranciscensis* Hochdruckmutante für Kana-, Tobra-, Strepto- und Paromomycin gezeigt werden konnte (Tabelle 2.1). Die Überexpression der tmRNA könnte auch die gestiegene Resistenz gegenüber Spira- und Spectinomycin erklären [Vioque und de la Cruz, 1999].

Eine Mutation der tmRNA-Regulation liefert keine überzeugende Erklärung für die Inhibierung des Wachstums der Hochdruckmutante bei erhöhter Temperatur. Im Gegenteil, in *Bacillus subtilis* haben erhöhte Mengen von tmRNA das Wachstum unter erhöhten Temperaturen gefördert und nicht inhibiert [Muto et al., 2000].

Natürlich könnte auch eine Mutation, die den Eintritt der tmRNA in das Ribosom behindert, eine tmRNA-Überexpression erklären, die die Bindung von tmRNA an EF-TU verhindert, wie zum Beispiel Mutationen im tmRNA-Gen selbst oder dem des EF-TU. Das würde zwar, unter der Annahme, dass das temperaturabhängige Wachstum durch die tmRNA bei *L. sanfranciscensis* wie bei *B. subtilis* geregelt ist, das Wachstumsverhalten der Hochdruckmutante bei 35°C erklären. Eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Antibiotika, die ein Eingreifen der tmRNA erfordert und der Wachsumsvorteil unter Hochdruck wären dann aber nicht plausibel.

Es ist wahrscheinlicher, dass tmRNA einen anderen Einfluss auf das temperaturabhängige Wachstum von *L. sanfranciscensis* als von *B. subtilis* hat, oder sich (eine) zusätzliche Mutation(en) während der Hochdruckadaptation von *L. sanfranciscensis* durchgesetzt hat bzw. haben.

Der enge Zusammenhang zwischen Hochdruckbehandlung und Veränderungen der Antibiotikaresistenzen liefert neue Argumente in der Diskussion des Auftretens hochdruckresistenter Mutanten bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln [Aertsen und Michiels, 2004]. Dennoch, die relativ langen Inkubationszeiten bei den für eine mögliche Lebensmittelbehandlung relativ niedrigen Drücken und die Notwendigkeit eines Wachstums der Bakterien, damit die Mutation fixiert wird macht ein Auftreten antibiotikaresistenter Mutanten in Lebensmittelhochdruckbehandlungen unwahrscheinlich.

4.5 Aktivierung transposabler Elemente durch Hochdruck

4.5.1 Induktion der Transkription

Die Aktivierung der Transkription mobiler DNA-Elemente durch subletalen Hochdruck und daraus folgende chromosomale Umordnungen wurden *in vivo* in *L. sanfranciscensis* mit Real-Time-PCRs bzw. Southern-Blot-Hybridisierungen untersucht.

Bei vier von sechs untersuchten IS-Elementen konnte mit Real-Time-PCRs eine Transkription in *L. sanfranciscensis* nachgewiesen werden. Alle vier Elemente wurden durch die Erhöhung des Umgebungsdrucks in den subletalen Bereich (45 bzw. 80 MPa) auf Transkriptionsebene induziert. Allein die transkriptionelle Aktivierung von IS-Elementen kann, auch ohne darauffolgende Transposition, positive Effekte auf bakterielle Zellen haben [Hartl, 1983]. Zusätzlich sind diese transpositionsunabhängigen Effekte unabhängig von der Position der IS-Elemente im Genom [Hartl, 1983] und können daher nicht alleine auf die Induktion nachfolgender Gene zurückgeführt werden [Boyen et al., 1978; Jaurin und Normak, 1983; Olliver, 2005; Saedler et al., 1974; Treves et al., 1998]. Denkbar wäre z.B. eine generelle regulatorische Funktion von IS-Elementen oder Transposasen, die zu Überlebens- oder Wachstumsvorteilen führen.

Andererseits ist eine erhöhte Transkriptmenge mobiler DNA-Elemente ein Indiz für das vermehrte Auftreten transpositionaler Ereignisse [Taddei et al., 1998; Strøman et al., 2003]. Jedoch wiesen Southern-Blot-Hybridisierungen mit *EcoRV*-verdauter genomischer *L. sanfranciscensis*-DNA bei sieben von acht getesteten Transposasen/ IS-Elementen nicht auf chromosomale Umordnungen hin. Es sollte aber immer bedacht werden, dass nur 0,01% aller Mutationen in Bakterien deren Fitness verbessern und damit fixiert werden [Martiel und Blot, 2002]. Mutationen, die nicht weitervererbt werden, sind statistisch kaum zu erfassen. Zudem kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass auch diese sieben mobilen DNA-Elemente unter Hochdruck günstige Mutationen ausgelöst haben könnten. Dafür müßten nicht nur mehr Klone untersucht werden, sondern vor allem andere Restriktionsendonukleasen eingesetzt werden.

4.5.2 ISLsf6

IS-Elemente der IS200/605-Familie bestehen, wie ISLsf6 aus zwei ORFs, die beide Ähnlichkeit zu Transposasen zeigen [Mahillon und Chandler, 1998]. Die unterschiedliche transkriptionelle Induktion beider ISLsf6-ORFs durch subletalen Hochdruck könnte auf einen zweiten Promotor vor *orfB* zurückzuführen sein (Abbildung 3.24). Es konnte jedoch keine Terminatorregion hinter *orfA* identifiziert werden. Northern-Blot-Hybridisierungen könnten Aufschluß über die genauen Transkriptionsverhältnisse geben. Obwohl sowohl *orfA* als auch *orfB* Transposasen ähneln, konnte bisher nur für *orfA* eine Beteiligung an der Transposition von IS200/605-Elementen aus *Helicobacter pylori* in *E. coli* nachgewiesen werden [Kersulyte et al., 2000; Kersulyte et al., 2002].

Ein Grund für das Vorhandensein der zweiten möglichen Transposase *orfB* könnte eine wirtsspezifische Nutzung von entweder *orfA* oder *orfB* für die Transposition sein [Kersulyte et al., 2000]. Es ist also denkbar, dass auch OrfB allein oder gemeinsam mit OrfA in *L. sanfranciscensis* für die Transposition notwendig ist.

Die Termini von ISLsf6 hatten keine längeren IRs, dafür gab es zwei 7 bp bzw. 8 bp lange DRs, die gleichzeitig nicht perfekte IRs darstellen und die Angriffsstelle der Transposase anzeigen könnten (Abbildung 3.24). Nicht konservierte, nicht-perfekte IRs sind typisch für die IS200/605-Familie [Kersulyte et al., 2000 und 2002; Mahillon und Chandler, 1998]

4.5.3 chromosomale Umordnung

Trotz vielfältiger Versuche (Inverse PCRs, Ausschneiden und Klonieren der betroffenen Southern-Blot-Hybridisierungsbanden) konnte die chromosomale Umordnung, die zum Verlust der Hybridisierungsbande des 1.9-kb-*VspI* bzw. 5.3-kb *EcoRV* (Abbildung 3.23) führte, nicht detailliert aufgeklärt werden. Gleichwohl sprechen für die Abbildung 4.2 dargestellte Umordnung alle bisherigen Daten.

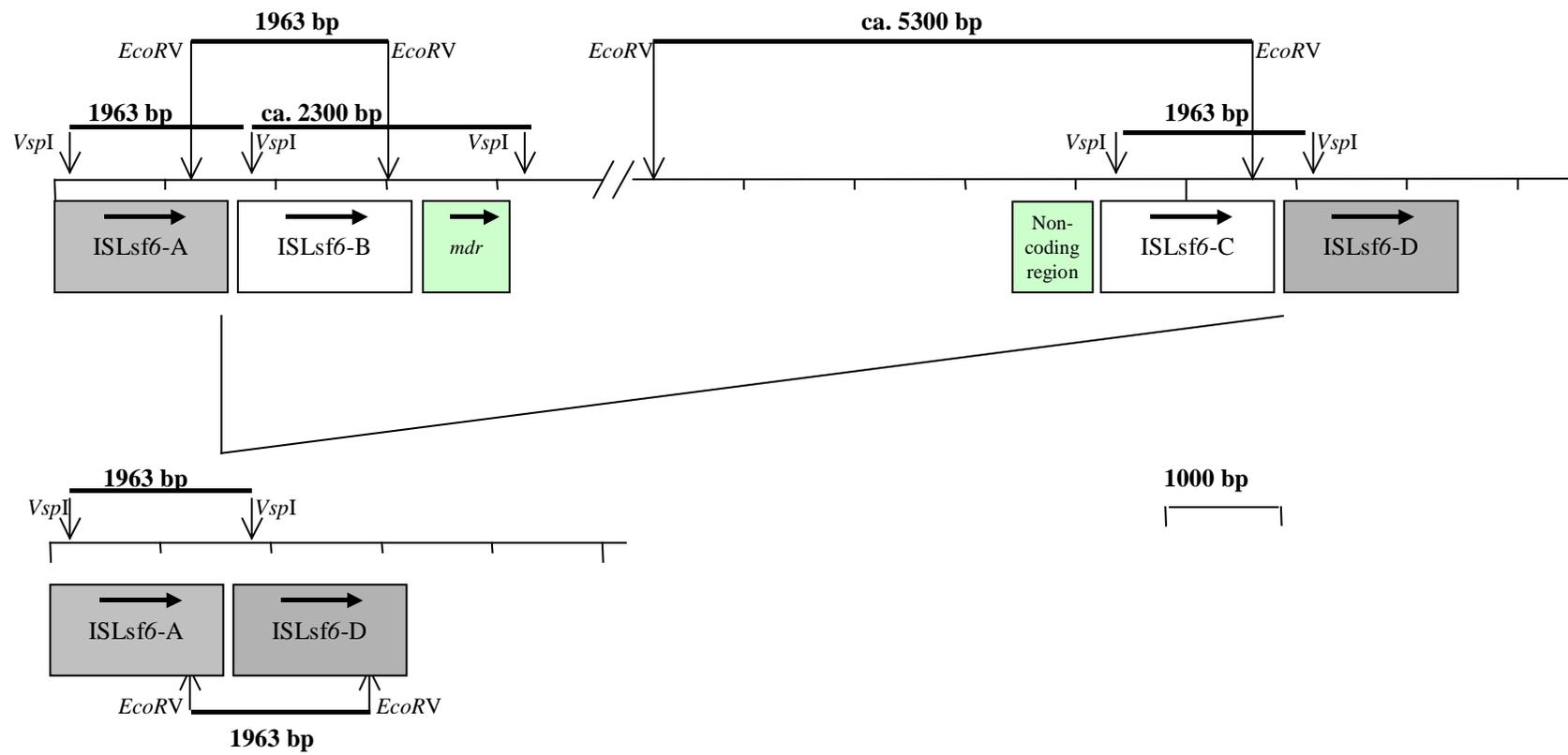


Abbildung 4.2: Möglicher Mechanismus der von *ISLsf6* vermittelten chromosomalen Umordnung

Es steht fest, zwei Kopien in die chromosomale Umordnung involviert sein müssen, denn

- a) in der RFLP-Analyse mit *VspI* und *EcoRV* verdauter DNA trat der Verlust und nicht die Verschiebung einer Hybridisierungsbande auf, obwohl alle bekannten ISLsf6-Kopien je eine Schnittstelle für *VspI* und *EcoRV* haben.
- b) *mdr* und die nichtkodierende Region, die in nach der Hochdruckbehandlung nicht mehr neben ISLsf6 liegen, gehören nicht zur gleichen Kopie dieses IS-Elements.

Das legt die Vermutung nahe, dass entweder die Region zwischen zwei ISLsf6-Kopien verloren geht oder ein Transposon herausgeschnitten wird.

Ausgehend von der Lage der Sonden und Schnittstellen für *VspI* und *EcoRV* in ISLsf6 (Abbildung 3.24) und der Länge der verlorengegangenen Hybridisierungsfragmente der SouthernBlots, muss die herausgeschnittene Region ausserhalb einer ISLsf6-Kopie mindestens 4.200 bp betragen. Für Elemente der IS605/200-Familie wurde zudem eine bevorzugte Insertion neben anderen Kopien des selben IS-Elements beschrieben. Eine solche Anordnung im Genom von *L. sanfranciscensis*, wie auch in Abbildung 4.2 dargestellt, erklärt das Verschwinden der 9kb-*VspI* bzw. 5.3kb *EcoRV*-Banden, statt deren Verschiebung.

Wie auch immer die chromosomale Umordnung im Detail aussieht, die alleinige Tatsache, dass sie während der Hochdruckbehandlung in allen untersuchten Klonen zweier voneinander unabhängiger Zelllinien auftritt, ist bemerkenswert. Es drängt sich die Frage auf, ob diese Umordnung auf eine spontante Mutation oder eine spezifische, hochdruckinduzierte Regulation zurückzuführen ist.

In der Literatur wurde als Reaktion auf Hitzeschock, Nährstofflimitierung oder auch Toluenschock bereits eine Reihe von wiederholbaren Mutationen beschrieben, die auf transposable Elemente zurückzuführen sind und entweder spontan auftreten oder eine spezifische Regulation vermuten lassen [Bongers et al., 2003; Cooper et al., 2001; Riehle et al., 2001; Strøman et al., 2004; Treves et al., 1998; Wery et al., 2001].

Eine spontane Mutation müßte, um sich in dieser Form durchzusetzen, die Fitness von *L. sanfranciscensis* unter Hochdruck wesentlich verbessern. Gleichzeitig hätte ihr Auftreten keine (positiven) Auswirkungen auf *L. sanfranciscensis* unter atmosphärischen Druckbedingungen, denn in keinem der betreffenden 0,1 MPa-Klone war diese Mutation nachweisbar. Im Fall des Favorisierens einer spontanen Mutation müßte bedacht werden, dass sie zunächst nur in einer Subpopulation auftritt. Ihr Nachweis in allen analysierten Zellen nach einem Wachstumszyklus bei 50 MPa läßt nur die Schlußfolgerung zu, dass sich alle Zellen ohne diese Mutation (fast) nicht vermehrt haben. Damit wäre eine Abschätzung der Generationenanzahl im ersten Wachstumszyklus unter Hochdruck schwierig. Zudem würde sich die Frage aufdrängen, ob diese mutierte Subpopulation schon vor der Hochdruckbehandlung existierte (Druck wirkt nur selektiv) oder erst durch die Hochdruckbehandlung entstand.

Die starke transkriptionelle Induktion von ISLsf6 durch Hochdruck weist zumindest darauf hin, dass die chromosomale Umordnung erst während und nicht bereits vor der Hochdruckbehandlung stattfand.

Neben der Möglichkeit einer zufälligen Mutationen mit positiven Effekten auf die Fitness von *L. sanfranciscensis*, bleibt die der spezifischen Regulation. Strøman et al. [2003] führen die transkriptionelle Induktion von Tn3692 in *Lactobacillus curvatus* durch einen Hitzeschock und deren daraus fast resultierende 40fache Verlustfrequenz auf eine ihnen unbekannte spezifische Regulation zurück. Der hochdruckinduzierten, chromosomalen Umordnung in *L. sanfranciscensis* könnte ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegen. In diesem Fall führt der Verlust einer Genregion nicht unbedingt zu verbesserter Fitness unter subletalen Hochdruckbedingungen. Die Aufklärung des Mechanismus, der diese Mutation auslöst, wäre wesentlich wichtiger als die Identifizierung des herausgeschnittenen Genomfragments.

Betrachtet man die hohe Frequenz der Mutation, die relativ kurze Inkubationszeit (ein Wachstumszyklus bei 50 MPa), die starke transkriptionale Aktivierung der vermutlichen Transposasen von ISLsf6 und die Ähnlichkeit zur Hitzeschockaktivierung von Tn3692 in *Lactobacillus curvatus*, erscheint eine spezifische Regulation wahrscheinlicher als das Auftreten einer spontanen Mutation.

Offen bleibt in beiden Fällen die Frage, ob diese Mutation wirklich durch ISLsf6 vermittelt wurde oder ob dieses IS-Element lediglich diese Mutation widerspiegelt. Auch hier weist die hochdruckinduzierte Transkription eher auf die Vermittlung der Mutation hin.

4.5.4 Ausblick

Im Fall einer spontanen Mutation ist die Identifizierung der genomischen Region, die in die chromosomale Umordnung involviert ist, erforderlich. Gene in dieser Region könnten wichtige, neue Einblicke in die Auswirkungen von hydrostatischen Hochdruck auf zelluläre Prozesse liefern. Eine spezifische Regulation hingegen erfordert, nicht nur in Hinblick auf denkbare biotechnologische Anwendungen, die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass subletaler hydrostatischer Hochdruck IS-Elemente bzw. Transposasen aktiviert und weist auf aus dieser Aktivierung resultierende Mutationen hin.

Angesichts der Tatsache, dass mobile DNA-Elemente oft mit Genen assoziiert sind, die zu Antibiotikaresistenzen beitragen oder in bakterielle Pathogenität bzw. Virulenz involviert sind [Mahillon und Chandler, 1998] und die Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln zunimmt, sollten die der hier beschriebenen transkriptionalen Aktivierung und Transposition zugrundeliegenden Mechanismen aufgeklärt werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Reaktion von *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T auf subletalen Hochdruck charakterisiert. Für die Mikroarrayanalyse der Hochdruckreaktion wurden ca. 22% (0,34 Mbp) des Genoms von *L. sanfranciscensis* sequenziert. Unter den bisher identifizierten 635 Genen, die unterschiedlichen Proteinen zugeordnet werden konnten, machten Transporter und nicht näher charakterisierte Proteine mit 15% bzw. 18% die größten Anteile aus.

Ferner konnten sieben IS-Elemente und fünf weitere Transposasen aus acht unterschiedlichen IS-Familien identifiziert werden. ISLsf1, ein Element der IS30-Familie und ISLsf6 (IS605/200-Familie) wurden näher charakterisiert. Von den mindestens sieben rRNA-Operons unterscheiden sich mindestens fünf in ihrer 16S-rRNA-Sequenz.

Der für die Analyse der Reaktion der Genexpression von *L. sanfranciscensis* auf transkriptionaler Ebene konstruierte shot-gun Mikroarray lieferte reproduzierbare Ergebnisse, die mit einem weiteren Array und Real-Time-PCRs für 13 Gene verifiziert werden konnten. Die Auswertung der Mikroarrays zeigte, dass aus den mRNA-Verhältnissen des Phosphoketolasegens *xpk* keine Regulation durch Hochdruck festzustellen war und *xpk* als Referenzgen für die Normalisierung von Real-Time-PCRs geeignet ist.

Insgesamt bestanden 750 Spots des Arrays die Qualitätsanalyse. Die Auswertung des Arrays zeigt, dass Gene durch eine 30 minütige Hochdruckbehandlung bei 45 MPa 7% der analysierten Gene induziert und 1% reprimiert wurden. Die größte Anteil der hochdruckregulierten Gene kodierte für hypothetische Proteine unbekannter Funktion (33%), gefolgt von Genen, die Proteinbiosynthese und -abbau (21%) oder Transport und zentralem intermediärem Metabolismus zuzuordnen sind (je 10%). Die Art der regulierten Gene -Translationsfaktoren (EF-G, EF-TU), ribosomale Proteine (S2, L6, L11) Translationsgenauigkeit beeinflussende Proteine und molekulare Chaperone - und die Veränderung ihrer Expression weisen darauf hin, dass die Zelle versucht, die hochdruckinduzierte Abnahme der Translationskapazität zu kompensieren.

Die Hochdruckstressantwort überlappt mit einer Reihe von anderen Stressreaktionen, stimmt aber mit keiner von ihnen weitgehend überein. Es wurden z.B. sowohl Gene für in Hitze-(ClpL, GroEL), Kälte-(InfB, GyrA, ATP-abhängige DeaD-Helikase) als auch Säurestress (GuaA) involvierte Proteine induziert. Unter diesen befanden sich zwei, in der Literatur für Grampositive Bakterien als CtsR reguliert beschriebene Gene (ClpL, GroEL). Mindestens für GroEL konnte eine Stabilisierung der mRNA als Grund für die Induktion ausgeschlossen werden. Die simultane Induktion von Hitze- und Kälteschockgenen lässt sich mit der Konformationsänderung des Ribosoms unter Hochdruck erklären.

Ein besseres Verständnis der Auswirkung von Hochdruck auf *L. sanfranciscensis* ermöglichte die Isolierung einer hochdrucktoleranten Mutante. Dafür wurde *L. sanfranciscensis* für 25

Wachstumszyklen bei 50 MPa inkubiert. Die isolierte Mutante wuchs bei 50 MPa innerhalb von 15 Stunden doppelt so schnell wie der Wildtyp und wies beim Wachstum unter atmosphärischen Druck eine erhöhte Temperaturempfindlichkeit auf. Während die maximale Wachstumsrate der Mutante bei der für *L. sanfrancicensis* optimalen Wachstumstemperatur von 30°C gegenüber dem Wildtyp erhöht war, konnte die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp bei 35°C nicht mehr wachsen. Eine erhöhte Toleranz gegenüber letalen Drücken (150-200MPa) war nur unter der zusätzlichen Streßbedingung limitierender Mangan- und Magnesiumkonzentrationen zu beobachten.

Die erhöhte Empfindlichkeit der Mutante gegenüber Zellwandantibiotika, wie Teicoplanin und Vancomycin läßt sich mit ihren höheren Wachstumsrate bei 30°C erklären. Die veränderten Empfindlichkeiten gegenüber ribosomalen Antibiotika, wie Streptomycin oder Kasugamycin, weisen darauf hin, dass Mutationen in Genen ribosomaler Komponenten an der Hochdrucktoleranz beteiligt sind. Mutationen in 16S rDNAs und den ribosomalen Proteinen S4, S5 und S12, in denen i.a. die Ursache für veränderte Streptomycinresistenzen zu suchen ist, konnten nicht festgestellt werden.

Northern Blot-Hybridisierungen mit *ssrA* (tmRNA) als Sonde, zeigten, dass diese in der Mutante bei atmosphärischen Druck konstitutiv überexprimiert wird. Die Induktion von *ssrA* durch Hochdruck (50 MPa/30 min) im Wildtyp weist auf eine mögliche Beteiligung der tmRNA an der Entwicklung der Piezotoleranz hin. Die erhöhte tmRNA-Transkriptmenge unter Hochdruck stellt eine Verbindung zwischen der hochdruckinduzierten Konformationsänderung des Ribosoms, der Abnahme der Polypeptidsyntheserate und der Induktion von Clps durch Hochdruck dar.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass subletaler Hochdruck (80 MPa/30min) die Transkription der Transposasen von IS-Elementen (*IS153*, *ISLsf1*, *ISLsf4* and *ISLsf6*) induziert, wurde die Hochdruckmutante auch auf veränderte RFLP-Muster von IS-Elementen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. *ISLsf6*, wies in allen isolierten Kolonien nach 25, aber auch nach nur 1 Hochdruckwachstumszyklen/zyklus, ein verändertes Hybridisierungsmuster, gekennzeichnet durch den Verlust eines 5,3kb *EcoRV* bzw. 1,9kb-*VspI*-Fragments, auf. Hingegen konnte für keine der Einzelkolonien, die bei atmosphärischen Druck wuchsen, diese Veränderung nachgewiesen werden. Es konnten zwei flankierende *ISLsf6* Regionen identifiziert werden, die in die chromosomale Umordnung involviert sind -ein multiple drug Transporter und eine nichtkodierende Sequenz. Beide sind allerdings unterschiedlichen *ISLsf6*-Kopien zuzuordnen.

6 Literaturverzeichnis

Abe, F. und Horikoshi, K. (2001) The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnology* **19**:102-108.

Abe, F. und Horikoshi, K. (2000) Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 8093-8102.

Abe, F., Kato, C. und Horikoshi, K. (1999) Pressure-regulated metabolism in microorganisms *Trends in Microbiology* **7**:447-453

Abo, T., Inada, T., Ogawa, K. und Aiwa, H. (2000) SSrA mediated tagging and proteolysis of LacI and its role in the regulation of *lac* operon. *EMBO J.* **19**:3762-3769.

Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M. und Michiels, C.W. (2005) Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2226-2231.

Aertsen, A. und Michiels, C.W. (2005) SulA-dependent hypersensitivity to high pressure and hyperfilamentation after high pressure treatment of *Escherichia coli lon* mutants. *Research in Microbiology* **156**:233-237.

Aertsen, A. und Michiels, C.W. (2004) Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**:263-273.

Aertsen, A., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P. Sermon, J., Hauben, K., Farewell, A., Nyström, T. und Michiels, C.W. (2004a) Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2660-2666.

Aertsen A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K., und Michiels, C.W. (2004b). An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**:6133-6141.

Albert, M. J., Mathan, V.I. und Baker, S.J. (1980) Vitamin-B₁₂ synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature* **283**:781-782.

Albright, L.J. (1969) Alternate pressurization-depressurization effects on growth and net protein, RNA and DNA synthesis by *Escherichia coli* and *Vibrio marinus*. *Can. J. Microbiol.* **15**:1237-1240.

Allen, E.E., Faccioli, D. und Bartlett, D.H. (1999) Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth at high pressure and low temperature in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1710-1720.

Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R. und Klaenhammer, T.R. (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:3906-3912.

Arcinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V. und Polz, M.F. (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* Operons. *J. Bacteriol.* **186**:2629-2635.

Bartlett, D. H. (2002) Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1595**:367-381.

- Bartlett, D., Wright, M., Yayanos, A.A. und Silverman, M.** (1989) Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature* **342**:572-574.
- Baden, J.M., Monk, S.J. und Halsey, M.J.** (1981) Effect of high helium and high hydrostatic pressure on bacterial mutation and growth. *Toxicol. Letters* **9**:201-206.
- Balny, C., Masson, P. und Heremans, K.** (2002) High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1595**:3-10.
- Balny, C., Masson, P. und Travers, F.** (1989): Some recent aspects of the use of high-pressure for protein investigations in solution. *High Pressure Research* **2**:1-28.
- Beney, L. und Gervais, P.** (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses, *Appl Microbiol. Biotechn.* **57**:34-42.
- Bidle, K.A. und Bartlett, D.H.** (1999) RecD-function is required for high-pressure growth of a deep-sea bacterium. *J. Bacteriol.* **181**:2330-2337.
- Biesalski und Grimm** (1999) Taschenatlas der Ernährung, Georg Thime Verlag, Stuttgart, Seite 186.
- Blot, M.** (1994) Transposable elements and adaptation of host bacteria. *Genetica* **93**:5-12.
- Blum, H., Baier, H. und Gross, H.J.** (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**:93-99.
- Böcker, G., Vogel, R. F. und Hammes, W. P.** (1990) *Lactobacillus sanfrancisco* als stabiles Element in einem Reinzucht-Sauerteig Präparat. *Getreide, Mehl und Brot* **44**:269-271.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A. und Hols, P.** (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology* **22**:1554-1558.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, D. und Sorokin, A.** (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**:731-753.
- Bongers, R.S., Hoefnagel, M.H., Starrenburg, M.J., Siemerink, M.A., Arends, J.G. und Hugenholtz, J.** (2003) IS981-mediated adaptive evolution recovers lactate production by *ldhB* transcription activation in a lactate dehydrogenase-deficient strain of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **185**:4499-507.
- Bowtell, D. und Sambrook, J.** (2002) DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Boyen, A., Charlier, D., Crabeel, M., Cunin, R., Palchaudhuri, S. und Glansdorff, N.** (1978) Studies on the control region of the bipolar argECBH operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **161**:185-196.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* **72**:248-254.
- Bregeon, D., Colot, V., Radman, M. und Taddei, F.** (2001) Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev* **15**:2295-2306.

- Broeze, R.J., Solomon, C.J. und Pope, D.H.** (1978) Effects of low temperature on *in vivo* and *in vitro* protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **134**:861–874.
- Burton, R.E., Siddiqui, S.M., Kim, Y.-I., Baker, T.A. und Sauer, R.T.** (2001) Effects of protein stability and structure on substrate processing by the ClpXP unfolding and degradation machine. *The EMBO Journal* **20**:3092-3100.
- Cabedo, H., Macian, F., Villarroya, M., Escudero, J.C., Martinez-Vicente, M., Knecht, E. und Armengod, M.E.** (1999) The *Escherichia coli trmE* (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *EMBO J.* **18**:7063-7076.
- Caldas, T., Laalami, S. und Richarme, G.** (2000) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J. Biol. Chem.* **275**:855-860.
- Casal, V. und Gomez, 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.
- Certes, A.** (1884) Sur la culture, á l'abri des germes atmosphériques, des eaux et des sediments rapporté par les expeditions du Travailleur et du Talisman. *Compt. Rend.* **98**:690-693.
- Chandler, M. und Mahillon, J.** (2002) Insertion sequences revisited, in: Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M. und Lambowitz, A.M. (Eds). *Mobile DNAII*, ASM Press, Washington, DC: Seiten 305-366.
- Chastanet, A. und Msadek, T.** (2003) *clpP* of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in Gram-positive bacteria, *J. Bacteriol.* **185**:683-687.
- Chastanet, A., Fert, J. und Msadek, T.** (2003) Comparative genomics reveals novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **47**:1061-1073.
- Ciampi, M. S., Schmid, M. B. und Roth, J. R.** (1982) Transposon Tn10 provides a promoter for transcription of adjacent sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:5016-5020.
- Conway, T. und Schoolnik, G.K.** (2003) Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Molecular Microbiology* **47**:879-889.
- Cooper, V.S., Schneider, D., Blot, M. und Lenski, R.E.** (2001) Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2834-2841.
- De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Coconcelli, P. S. und Gobbetti, M.** (2001) The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* **147**:1863-1873.
- de la Cruz, J. und Vioque, A.** (2001) Increased sensitivity to protein synthesis inhibitors in cells lacking tmRNA. *RNA* **7**:1708-1716.
- de la Cruz, J., Kressler, D. und Linder, P.** (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* **24**:192-198.
- Dong, Q., Sadouk, K., Van der Lelie, D., Taghavi, S., Ferhat, A., Nuyten, J.M., Borremans, B., Mergeay, M. und Toussaint, A.** (1992) Cloning and sequencing of IS1086 of *Alcalignes eutrophicus* insertion sequence related to IS30 and IS4351. *J. Bacteriol.* **174**:8133-8138.

- Drews, O., Weiss, W., Reil, G., Parlar, H., Wait, R. und Görg, A.** (2002) High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics* **2**:765-774.
- Duval-Valentin, G., Normand, C., Khemici, V., Marty, B. und Chandler, M.** (2001) Transient promotor formation: a new feedback mechanism for regulation of IS911 transposition. *EMBO J.* **20**:5802-5811.
- Duwat, P., Ehrlich, S.D. und Gruss, A.** (1999) Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* **31**:845-58.
- Ehrmann, M.A. und Vogel, R.F.** (2001) Characterisation of IS153, an IS3-family insertion sequence isolated from *Lactobacillus sanfranciscensis* and its use for strain differentiation. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**:443-450.
- Eichenbaum, Z. und Livneh, Z.** (1998) UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics.* **149**:1173-1181.
- Emilsson, V. und Kurland, C.G.** (1999) Growth rate dependence of global amino acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**:248-251.
- Eng, R.H.K., Padberg F.T., Smith, S.M., Tan, E.N. und Cherubin, C.E.** (1991) Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1824-1828.
- Eriksson, S., Hurme, R. und Rhen, M.** (2002) Low-Temperature Sensors in bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **357**:887-893.
- Farewell, A. und Neidhardt, F.C.** (1998) Effect of temperature on *in vivo* protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:4704-4710.
- Fernandes, P.M., Domitrovic, T., Kao, C.M. und Kurtenbach, E.** (2004) Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* **556**:153-160.
- Ferretti, J.J., McSan, W.M., Ajdic, D., Savic, D., Lyon, D., Sezate, S., Suvorov, A.N., Clifton, S., Kenton, S., Lai, H.S., Lin, S.P., Najar, F.Z., Song, L., White, J., Yuan, X., Roe, B.A. und McLaughlin** (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:4658-4663.
- Frees, D. und Ingmar, H.** (1999) ClpP participates in the degradation of misfolded proteins in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **31**:79-87.
- Friedman, H., P. Lu, und Rich, A.** (1971) Temperature control of initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **61**:105-121.
- Friedman, H., Lu, P. und Rich, A.** (1969) An *in vivo* block in the initiation of protein synthesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **34**:255-260.
- Fujii S., Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, T. und Komatsu, Y.** (1996) Characterization of a barotolerant mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of trehalose content and membrane fluidity. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**:97-101.
- Funaoka, S., Takagi, I. Furuyama, Y. und Morishita, S.** (1965) Kann ein über Generationen wiederkehrendes Erlebnis ein Mutantbildner sein? Das Gewöhnen der *Escherichia coli* an hohen hydrostatischen Druck und das Sich-Entwöhnen davon. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **40**:833-837.

- Gill, R.T., Valdes, J.J. und Bentley, W.E.** (2000) A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **2**:178-189.
- Gobbetti, M., Smacchi, E. und Corsetti, A.** (1996) The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3220–3226.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. und Sauer, R.T.** (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes & Dev.* **12**:1338-1347.
- Gould, G.W.** (2001) New processing technologies: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society* **60**:463-474.
- Gray, Y.H.** (2000) It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet.* **16**:461-458.
- Groß, M.** (1997) *Leben unter Druck- Die Tiefsee aus: Exzentriker des Lebens- Zellen zwischen Hitzeschock und Kältetod*, Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Seiten 63-71.
- Groß, M., Kosmowsky, I.J., Lorenz, R., Molitoris, H.P. und 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. und Nierhaus, K.H.** (1993) Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation-cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *Eur. J. Biochem.* **218**:463-468.
- Gualerzi, C.O., Giuliodori, A.M. und Pon, C.L.** (2003) Transcriptional and Posttranscriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.* **331**:527-539.
- Haebel, P.W., Gutmann, S. und Ban, N.** (2004). Dial tm for rescue: tmRNA engages ribosomes stalled on defective mRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**:58-65.
- Hauben, K.J.A., Bartlett D.H., Soontjens, C.C., Cornelis, F K., Wuytack, E.Y. und Michiels, C.W.** (1997) *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:945-950.
- Hall, B.G.** (1999) Spectra of spontaneous growth-dependent and adaptive mutations at *ebgR*. *J. Bacteriol.* **181**:1149-1155.
- Hardon, M.J. und Albright. L,J,** (1974) Hydrostatic pressure effects on several stages of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **20**:359-365.
- Hartl, D.L., Dykhuizen, D.E., Miller, R.D., Green, L. und de Framond, J.** (1983) Transposable element IS50 improves growth rate of *E. coli* cells without transposition. *Cell.* **35**:503-510.
- Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G.C. und D'Ari, R.** (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev.* **12**:1348-1355.
- Hörmann, S.** (2006), Dissertation, TU-München.

- Hörmann, S., Scheyhing, C., Behr, J., Pavlovic, M., Ehrmann, M. und Vogel, R.F.** (2006) Comparative proteome approach to characterize the high pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T. *Proteomics* 6:1875-1885.
- Horwitz, W.** (ed.) (2000) Official methods of analysis of AOAC International , 17th edition, AOAC International, Gaithersburgh, Md.
- Huang, C., Wolfgang, M.C., Withey, J., Koomey, M. und Friedman, D.I.** (2000) Charged tmRNA but not tmRNA-mediated proteolysis is essential for *Neisseria gonorrhoeae* viability. *EMBO J.* 19:1098-1107.
- Huecas, S. und Andreu, J.M.** (2004). Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett.* 569:43-48.
- Hutchison, C.A., Peterson, S.N., Gill, S.R., Cline, R.T., White, O., Fraser, C.M., Smith, H.O. und Venter, J.C.** (1999) Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* 286:2165-2169.
- Ishii, A., Oshima, T., Sato, T., Nakasone, K., Mori, H. und Kato, C.** (2005) Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure. *Extremophiles* 9:65-73.
- Ishii, A., Sato, T., Wachi, M., Nagai, K. und Kato, C.** (2004) Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers *in vivo* and *in vitro*. *Microbiology* 150:1965-1972.
- Iskakova, M., Connell, S.R. und Nierhaus, K.R.** (2004) Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* in: Nierhaus, KH und Wilson, DN (Eds) Protein synthesis and ribosome structure-Translating the Genome, Wiley-VCH-Verlag GmbH&Co.KGAA, Weinheim.
- Iwahashi, H., Odani, M., Ishidou, E. und Kitagawa, E.** (2005) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS Lett.* 579:2847-2852.
- Iwahashi, H., Shimizu, H., Odani, M. und Komatsu, Y.** (2003) Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles* 7:291-298.
- Jellen-Ritter, A. S. und Kern, W. V.** (2001) Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1467-1472.
- Jenal, U. und Hengge-Aronis, R.** (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Current Opinion in Microbiology* 6:163-172.
- Jaurin, B. und Normark, S.** (1983) Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell.* 32:809-816.
- Julio, S.M., Heithoff, D.M. und Mahan, M.J.** (2000) *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* pathogenesis. *J. Bacteriol.* 182:1558-1563.
- Kallastu, A., Horak, R. und Kivisaar, M.** (1998) Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 180:5306-5312.
- Karatzas, K.A. und Bennik, M.H.** (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3183-3189.

- Karatzas, K.A., Wouters, J.A., Gahan, C.G., Hill, C., Abee, T. und Bennik, M.H.** (2003) The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol. Microbiol.* **49**:1227-1238.
- Karzai, A.W., Susskind, M.M. und Sauer, R.T.** (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J.* **18**:3793-3799.
- Kato, C. und Nogi, Y.** (2001) Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**:223-230.
- Kato, C.** (1999) Barophiles (Piezophiles) aus Horikoshi, K. und Tsujii, K. (Editoren) *Extremophiles in Deep-Sea environments*, Springer-Verlag, Seite 91-111.
- Kato, C., Inoue, A. und Horikoshi, K.** (1996) Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. *Trends in Biotechnology* **14**:6-12.
- Kato, C., Sato, T., Smorawska, M. und 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.
- Keiler, K. C., Waller, P. R. und Sauer, R.T.** (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**:990-993.
- Kersulyte, D., Velapattino, B., Dailide, G., Mukhopadhyay, A.K., Ito, Y., Cahuayme, L., Parkinson, Gilman, R.H. und Berg, D.E.** (2002) Transposable Element ISHp608 of *Helicobacter pylori*: Geographic distribution, functional organization, and Insertion specificity. *J. Bacteriol.* **184**:992-1002.
- Kersulyte, D., Mukhopadhyay, A.K., Shirai, M., Nakazawa, T. und Berg, D.E.** (2000) Functional organization and insertion specificity of IS607, a chimeric element of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **182**:5300-5308.
- Kirby, J. E., Trempey, J. E. und Gottesman, S.** (1994) Excision of a P4-like cryptic prophage leads to Alp protease expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:2068-2081.
- Kiss, J., Szabó, M. und Olsz, F.** (2003) Site specific recombination by the DDE family member mobile element IS30 transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:15000-15005.
- Kitamura, K., Torii, Y., Matsuoka, C. und Yamamoto, K.** (1995) DNA sequence changes in mutations in the *tonB* gene on the chromosome of *Escherichia coli* K12: insertion elements dominate the spontaneous spectra. *Jpn. J. Genet.* **70**:35-46.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. und Siezen, R.** (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:29-58.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E., Stiekema, W., Klein Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.A., Nierop Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M. und Siezen, R.J.** (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:1990-1995.

- Kline, L. und Sugihara, T. F.** (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.* **21**:4569-4465.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. und Inokuchi, H.** (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9223-9227.
- Korakli, M., Gänzle, M.G., Knorr, R., Frank, M., Rossmann, A. und Vogel, R.F.** (2002) Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* under high-pressure: investigations using stable carbon isotopes. In: Hayashi R (ed) Trends in high pressure bioscience and biotechnology. Elsevier, Amsterdam, pp 287–294.
- Korakli, M., Rossmann, A., Gänzle, M. G. und Vogel, R. F.** (2001). Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Agric. Food Chem.* **49**:5194–5200.
- Kozak, M. und Nathans. D.** (1972) Differential inhibition of coliphage MS2 protein synthesis by ribosome-directed antibiotics. *J. Mol. Biol.* **70**:41-55.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H. und Hecker, M.** (2001) Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *The EMBO Journal* **20**:852-863.
- Krüger, M.K., Pedersen, S., Hagervall, T.G. und Sørensen, M.A.** (1998) The modification of the wobble base of tRNAGlu modulates the translation rate of glutamic acid codons *in vivo*. *J Mol Biol* **284**:621-631.
- Krüger, M.K. und Sørensen, M.A.** (1998) Aminoacylation of hypomodified tRNAGlu *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **284**:609-620.
- Landau, J.V. und Pope, D.H.** (1980) Recent advances in the area of barotolerant protein synthesis in bacteria and implications concerning barotolerant and barophilic growth. *Advances in Aquatic Microbiology* **2**:249-276.
- Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R.T. und Baker, T.A.** (2000) A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machinery. *Science* **289**:2354-2356.
- Lieb, M.** (1981) A fine structure map of spontaneous and induced mutations in the lambda repressor gene, including insertions of IS elements. *Mol. Gen. Genet.* **184**:364-371.
- Lullien-Pellerin, V. und Balny, C.** (2002) High-pressure as a tool to study some proteins. properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innovativ Food Sci. and Emerging Technologies* **3**:209-221.
- Lyon, B.R., Gillespie, M.T. und Skurray, R.A.** (1987) Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:3031-3038.
- Mahillon, J. und Chandler, M.** (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:725-774.
- Maaloe, O.** (1979) Regulation of the protein synthesizing machinery ribosomes, tRNA, factors, and so on. In R. F. Goldberger (ed.), *Biological regulation and development*. Plenum Publishing Corp., New York, N.Y.:487-542.
- Macdonald, A.G.** (1984) The effect of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **304**:47-68.

- Margesin, R. und Nogi, Y.** (2004) Psychropiezophilic microorganisms. *Cell. Mol. Biol.* **50**:429-436.
- Marquis, R.E. und Bender, G.R.** (1980) Isolation of a variant of *Streptococcus faecalis* with enhanced barotolerance. *Can. J. Microbiol.* **26**:371-376.
- Martens, J.-H., Barg, H., Warren, M. J. und Jahn, D.** (2002) Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**:275-285.
- Martiel, J.L. und Blot, M.** (2002) Transposable elements and fitness of bacteria. *Theor. Popul. Biol.* **61**:509-518.
- McMahon, G. und Landau, J.V.** (1982) Effect of S12 ribosomal mutations on peptide chain elongation in *Escherichia coli*: a hydrostatic pressure study. *J. Bacteriol.* **151**:516-520.
- Mechold, U. und Malke, H.** (1997) Characterization of the stringent and relaxed responses of *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* **179**:2658-2667.
- Melancon, P., Tapprich, W.E. und Brakier-Gingras, L.** (1992) Single-base mutations at position 2661 of *Escherichia coli* 23S rRNA increase efficiency of translational proofreading. *J. Bacteriol.* **174**:7896-7901.
- Michal, G.** (Hrsg) (1999a), *Biochemical Pathways*, Spektrum-Verlag, Heidelberg, Kapitel 9.5:Seiten 111-112.
- Michal, G.** (Hrsg) (1999b), *Biochemical Pathways*, Spektrum-Verlag, Heidelberg, Kapitel 9.5:Seiten 40 und 184.
- Mira, A., Klasson, L. und Andersson, S.G.E.** (2002) Microbial genomes evolution: sources of variability. *Current Opinion of Microbiology* **5**:506-512.
- Moll, I., Grill, S., Grundling, A. und Blasi, U.** (2002) Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**:1387-1396.
- Müller, M., Wolfrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M. und Vogel, R. F.** (2001) Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiol.* **18**:217-227.
- Muto, A., Fujihara, A., Ito, K.I., Matsuno, J., Ushida, C. und Himeno, H.** (2000) Requirement of transfer-messenger RNA for the growth of *Bacillus subtilis* under stresses. *Genes Cells* **5**:627-635.
- Nagy, Z. und Chandler, M.** (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Research in Microbiology* **155**:387-398.
- Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, und Schaechter, M.** (1990) *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Robertson, G.T., Gilmour, R. und Winkler, M. E.** (2003) Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J. Bacteriol.* **185**:359-370.
- Niven, G.W., Miles, C.A. und 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.

- Ochman, H., Ayala, F.J. und Hartl, D.L.** (1993) Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences. *Methods Enzymol.* **218**:309-321.
- Oh, B. und Apirion, D.** (1991) 10Sa RNA, a small stable RNA of *Escherichia coli*, is functional. *Mol. Gen. Genet.* **229**:52-56.
- Ohtsubo, Y., Genka, H., Komatsu, H., Nagata, Y. und Tsuda, M.** (2005) High-temperature-induced transposition of insertion elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1822-1828.
- Olasz, F., Stalder, R. und Arber, W.** (1993) Formation of the tandem repeat (IS30)₂ and its role in IS30-mediated transpositional DNA-rearrangements. *Mol. Gen. Genet.* **239**:177-187.
- Olliver, A., Vallé, M., Chaslus-Dancla, E. und Cloeckaert, A.** (2005) Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with *IS1* or *IS10* elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with Fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:289-301.
- Polard, P., Prere, M.F., Fayet, O. und Chandler, M.** (1992) Transposase-induced excision and circulization of the bacterial insertion sequence *IS911*. *EMBO J.* **11**:5079-5090.
- Pope, D.H., Smith, W.P., Swartz, R.W. und Landau, J.V.** (1975) Role of bacterial ribosomes in barotolerance. *J. Bacteriol.* **121**:664-669.
- Pope, D.H. und Berger, L.R.** (1973) Inhibition of metabolism by hydrostatic pressure, what limits microbial growth? *Arch. Microbiol.* **93**:367-370.
- Potapov, A.P. und Subramanian, A.R.** (1992) Effect of *E. coli* ribosomal protein S1 on the fidelity of the translational elongation step: reading and misreading of poly(U) and poly(dT). *Biochem. Int.* **27**:745-753.
- Pridmore, R. D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A. C., Zwahlen, M. C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F. und Schell, M. A.** (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:2512-2517.
- Qureshi, M.H., Kato, C. und 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. und Horikoshi, K.** (1998b) Purification of two pressure-regulated *ctyp* cytochromes from a deep-sea barophilic bacterium, *Shewanella sp.* strain DB-172F. *FEMS Microbiol Lett.* **161**:301-309.
- Riehle, M.M., Bennett, A.F. und Long, A.D.** (2001). Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**:525-530.
- Rao, N.N. und Kornberg, A.** (1996) Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **178**:1394-1400.
- Raux, E., Lanois, A., Rambach, A., Warren, M. J. und Thermes, C.** (1998) Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: functional characterization of the *Bacillus megaterium cbi* genes required to convert uroporphyrinogen III into cobyrinic acid a,c-diamide. *Biochemical Journal* **335**:167-173.

- Raux, E., Lanois, A., Levillayer, F., Warren, M. J., Brody, E., Rambach, A. und Thermes, C.** (1996) *Salmonella typhimurium* cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes: functional studies in *S. typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:753-767.
- Robey, M., Benito, A., Hutson, R.H., Pascual, C., Park, S.F. und Mackey, B.M.** (2001) Variation of resistance to high hydrostatic pressure in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4901-4907.
- Roche, E.D. und Sauer, R.T.** (1999) SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J.* **18**:4579-4589.
- Roche, E.D. und Sauer, R.T.** (2001) Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop. *J. Biol. Chem.* **276**:28509-28525.
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. und Gelfand, M. S.** (2003) Comparative Genomics of the Vitamin B12 Metabolism and Regulation in Prokaryotes. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:41148-41159.
- Rodriguez, H., Snow, E.T., Bhat, U. und Loechler, E.L.** (1992) An *Escherichia coli* plasmid-based, mutational system in which *supF* mutants are selectable: insertion elements dominate the spontaneous spectra. *Mutat. Res.* **270**:219-231.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G. und Bobik, T. A.** (1996) Cobalamin (Coenzyme B12): Synthesis and Biological Significance. *Annual Review of Microbiology* **50**:137-181.
- Russel, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. und Abee, T.** (1995) Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology* **28**:255-261.
- Saedler, H., Reif, H.J., Hu, S. und Davidson, N.** (1974) IS2, a genetic element for turn-off and turn-on of gene activity in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **132**:265-289.
- Sato, T., Kato, C. und Horikoschi, K.** (1995) The effect on high pressure gene expression by the *lac* and *tac* promoters in *E. coli*. *J. Mar. Biotechn.* **3**:89-92.
- Scheyhing, C., Hörmann, S., Vogel, R. und Ehrmann, M.A.** (2004) Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T. *Letters in Applied Microbiology* **39**:284-289.
- Scheyhing, C.** (2002) Hochdruckinduzierte Genexpression bei Bakterien. Dissertation, TU-München.
- Schwarz, J.R. und Landau, J.V.** (1972a) Hydrostatic pressure effects on *Escherichia coli*: site of inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **109**:945-948.
- Schwarz, J.R. und Landau, J.V.** (1972b) Inhibition of cell-free protein synthesis by hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* **112**:1222-1227.
- Scott, A.I. und Roessner, C.A.** (2002) Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂). *Biochemical Society Transactions* **30**:613-620.
- Schönhuber, W., Le Bourhis, G., Tremblay, J., Amann, R. und Kulakauskas, S.** (2001) Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol.* **1**(1):20: doi:
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K. und Noguchi, T.** (2000) Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry* **65**:315-323.

- Shpanchenko, O.V., Zvereva, M.I., Ivanov, P.V., Bugaeva, E.Y., Rozov, A.S., Bogdanov, A.A., Kalkum, M., Isaksson, L.A., Nierhaus, K.H. und Dontsova, O.A.** (2005) Stepping transfer messenger RNA through the ribosome. *J. Biol. Chem.* **280**:18368-18374.
- Skoovgard, M. Jensen, L.J., Brunak, S., Ussery, D. und Krogh, A.** (2001) On the total number of genes and their length distribution in complete microbial genomes. *Trends Genet.* **17**:425-428.
- Smelt, J.P.P.M.** (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology* **9**:152-158.
- Smith, W., Pope, D., und Landau, J.V.** (1975) Role of bacterial ribosome subunits in barotolerance. *J. Bacteriol.* **124**:582-584.
- Somero, G.N.** (1992) Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:557-577.
- Strøman, P., Mueller, C.C. und Sorensen, K.I.** (2003) Heat shock treatment increases the frequency of loss of an erythromycin resistance-encoding transposable element from the chromosome of *Lactobacillus crispatus* CHCC3692. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7173-7180.
- Steiner, K. und Malke, H.** (2000) Life in protein-rich environments: the *relA*-independent response of *Streptococcus pyogenes* to amino acid starvation, *Mol. Microbiol.* **38**:1004-1016.
- Stolz, P., Vogel, R. F. und Hammes, W. P.** (1995) Utilization of electron acceptors by lactobacilli from sourdoughs. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**:402-410.
- Taddei, F., Vulic, M., Radman, M. und Matic, I.** (1997) Genetic variability and adaptation to stress. *EXS.* **83**:271-290.
- Takahashi, T., Konno, T., Muto, A. und Himeno, H.** (2000) Various effects of Paromomycin on tmRNA-directed *trans*-translation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:27672-27680.
- Tanner, N.K. und Linder, P.** (2001) DEAD/H box RNA helicases: from genetic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell.* **8**:251-262.
- Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., de Valdez, G.F. und Sesma, F.** (2003) *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces Cobalamin. *J. Bacteriol.* **185**:5643-5647.
- Tauscher, B.** (1998) Pasteurisierung von Lebensmitteln mit hohen hydrostatischen Hochdruck. *Flüssiges Obst* **2/98**:72-75.
- Thieringer, H.A., Jones, P.G. und Inouye, M.** (1998) Cold shock and adaptation. *BioEssays* **20**:49-57.
- Tremblay, J.G., Amann, R. und Kulakauskas, S.** (2001) Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol.* **1**:20-27.
- Treves, D.S., Manning, S. and Adams, J.** (1998) Repeated evolution of an acetate-crossfeeding polymorphism in long-term populations of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **15**:789-797.
- Tu, G.F., Reid, G.E., Zhang, J.G., Moritz, R.L. und Simpson, R.J.** (1995) C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J. Biol. Chem.* **270**:9322-9326.
- Turlan, C. und Chandler, M.** (1995) IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. *EMBO J.* **14**:5410-5421.

- Tzeng, C. M., und Kornberg, A.** (2000) The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:3977-3983.
- Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G. und Bjork, G.R.** (2001) Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.* **20**:4863-4873.
- Vaughan, E.E. und de Vos, W.M.** (1995) Identification and characterization of the insertion element IS1070 from *Leuconostoc lactis* NZ6009. *Gene* **155**:95-100.
- VanBogelen, R.A. und Neidhardt, F.C.** (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5589-5593.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. und Maguin, E.** (2002) Stress response in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:187-216.
- Vaughan, E.E. und de Vos, W.M.** (1995) Identification and characterization of the insertion element IS1070 from *Leuconostoc lactis* NZ6009. *Gene* **155**:95-100.
- Vermanen, P., Ingmar, H. und Vogensen, F.K.** (2000) *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology* **146**:1447-1455.
- Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G. und Vogel, R.F.** (2005) Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T during growth in sourdough. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6260-6266.
- Vezi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F.M., Cestaro, A., Malacrida, G. Simionati, B., Cannata, N., Romualdi, C., Bartlett, D.H. und Valle, G.** (2005) Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* **307**:1459-1461.
- Vigh, L., Maresca, B. und Harwood, J.L.** (1998) Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* **23**:369-374.
- Vioque, A., und de la Cruz, J.** (2003) *Trans*-translation and protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**:9-14.
- Vogel, R.F., Böcker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K. und Schleifer, K. H.** (1994) Identification of Lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:223-229.
- Weinert, T.A., Schaus, N.A. und Grindley, N.D.** (1983) Insertion sequence duplication in transpositional recombination. *Science* **222**:755-765.
- Weiss, N. und Schillinger, U.** (1984) *Lactobacillus sanfrancisco* sp. nov., nom. rev. *System. Appl. Microbiol.* **5**:230-232.
- Weissbach, H., Ladd, J.N., Volcani, B.E., Smyth, R.D. und Barker, H.A.** (1959) Structure of the Adenylcobamide coenzyme: Degradation by Cyanide, Acid and Light. *The Journal of Biological Chemistry* **235**:1462-1473.
- Welch, T.J., und Bartlett, D.H.** (1998) Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Mol. Microbiol.* **27**:977-985

- Welch, T.J., Farewell, A., Neidhardt, F.C., und 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. und 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.
- Wery, J., Hidayat, B., Kieboom, J. und de Bont, J.A.** (2001) An insertion sequence prepares *Pseudomonas putida* S12 for severe solvent stress. *Biol. Chem.* **276**:5700-5706.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. und Gottesman, S.** (1999) Posttranslational quality control: Folding, refolding and degrading proteins. *Science* **286**:1888-1893.
- Wiegert, T. und Schumann, W.** (2001) SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:3885-3889.
- Wiese, B.G., Stromar, W., Rainey, F. A., und Diekmann, H.** (1996) *Lactobacillus panis* sp. nov., from sourdough with a long fermentation period. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:449-453.
- Williams, K. P.** (2002) The tmRNA website: invasion by an intron. *Nucleic Acids Res.* **30**:179-182.
- Williams, R.M. und Rimsky, S.** (1997) *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS: a central controller of gene regulation networks. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**:175-185.
- Wilson, D.N.** (2004) Antibiotics and the inhibition of ribosome function. in: Nierhaus, KH und Wilson, DN (Eds) Protein synthesis and ribosome structure-Translating the Genome, Wiley-VCH-Verlag GmbH&Co.KGaA, Weinheim
- Withey, J. und Friedman, D.** (1999). Analysis of the role of *trans*-translation in the requirement of tmRNA for *immP22* growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:2148-2157.
- Withey, J. und Friedman, D.** (2002) The biological roles of *trans*-translation. *Current Opinion in Microbiology* **5**:154-159.
- Yayanos, A.A., Dietz, A.S. und Van Boxtel, R.** (1979) Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* **205**:808-810.
- Zapparoli, G., Torriani, S. und Dellaglio, F.** (1998) Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**:325-332.
- ZoBell, C.E. und Morita, R.Y.** (1957) The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacteriol.* **57**:179-189.
- ZoBell, C.E. und Johnson, F.H.** (1949) Barophilic bacteria in some deep-sea sediments. *J. Bacteriol.* **73**:563-568.

7 Anhang

7.1 Funktionelle Klassifizierung der bisher (an)sequenzierten *L. sanfranciscensis*-Gene

Die, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, (an)sequenzierten Gene von *L. sanfranciscensis* DSM20451 wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu funktionalen Klassen eingeteilt. Diese Einteilung beruht auf Sequenzhomologien. Sequenzen, für die keine eindeutigen Homologien in Datenbanken gefunden wurde, wurden nicht berücksichtigt. Bei Genen, die für ähnliche, aber anscheinend verschiedene Proteine kodieren, wurden, wo notwendig bzw. möglich (manuelle Auswertung), Homologien in Klammern angegeben.

KATEGORIE

Seite

AMINOSÄUREBIOSYNTHESE.....	141
PURINE, PYRIMIDINE, NUKLEOSIDE UND NUKLEOTIDE.....	142
FETTSÄURE UND PHOSPHOLIPID METABOLISMUS.....	143
BIOSYNTHESE VON COFAKTOREN, PROSTHETISCHEN GRUPPEN UND CARRIERN	144
ZENTRALER INTERMEDIÄRER METABOLISMUS.....	145
ENERGIEMETABOLISMUS.....	145
TRANSPORT UND BINDEPROTEINE.....	147
DNA METABOLISMUS.....	150
TRANSKRIPTION.....	151
PROTEINBIOSYNTHESE.....	152
PROTEINSCHICKSAL.....	154
REGULATORISCHE FUNKTIONEN.....	155
ZELLHÜLLE.....	156
ZELLULÄRE PROZESSE.....	157
ANDERE KATEGORIEN.....	158
PHAGEN.....	159
HYPOTHETISCHE PROTEINE.....	159
NICHT-PROTEIN-KODIERENDE-GENE.....	161

AMINOSÄUREBIOSYNTHESE

Familie der aromatischen Aminosäuren

aspartate aminotransferase 2.6.1.1

Aspartat-Familie

asdl aspartate-semialdehyde dehydrogenase 1.2.1.11

<i>dapA2</i>	dihydrodipicolinate synthase	4.2.1.52
<i>dapB</i>	dihydrodipicolinate reductase	1.3.1.26
<i>dapD</i>	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylatesuccinyltransferase 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succiny- transferase-related protein	3.1.117
<i>dapE1</i>	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	3.5.1.18
<i>lysA</i>	diaminopimelate decarboxylase	4.1.1.20
<i>thrA1</i>	aspartate kinase	2.7.2.4

Glutamat Familie

<i>argG</i>	argininosuccinate synthase	6.3.4.5
<i>argH</i>	argininosuccinate lyase	4.3.2.1
<i>glnA</i>	glutamate-ammonia ligase	6.3.1.2

Serin Familie

<i>glyA</i>	glycine hydroxymethyltransferase	2.1.2.1
-------------	----------------------------------	---------

PURINE, PYRIMIDINE, NUKLEOSIDE UND NUKLEOTIDE**2' Deoxyribonukleotid Metabolismus**

<i>dkg2</i>	deoxyguanosine kinase deoxyguanosine kinase (deoxynucleoside kinase complex 1 F component)	2.7.1.113
-------------	---	-----------

Nukleotid und Nukleosid Interkonversionen

<i>nrdI</i>	ribonucleotide reductase protein	1.17.4.1
-------------	----------------------------------	----------

Purinribonukleotid Biosynthese

<i>guaA</i>	GMP-synthase	6.3.5.2
<i>purA</i>	adenylosuccinate synthase	6.3.4.4
<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	6.3.2.6
<i>purE</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit	4.1.1.21
<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase precursor	2.4.2.14
<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	6.3.5.3
<i>purK1</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit	4.1.1.21
<i>purM</i>	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	6.3.3.1
<i>purQ</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase I phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase	6.3.5.3

Pyrimidinribonukleotid Biosynthese

<i>cpdC</i>	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	3.1.3.5;3.1.4.16
-------------	--	------------------

<i>nrdE</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase α -chain	1.17.4.1
	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, β -chain	1.17.4.1
<i>nrdh</i>	glutaredoxin like protein	
<i>pyrAB</i>	carbamoylphosphate synthase, pyrimidine-specific large chain	6.3.5.5
<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	2.4.2.10
<i>pyrG</i>	CTP synthase	6.3.4.2
<i>pyrH</i>	uridylate kinase	2.7.4.--
<i>tmk</i>	thymidylate kinase	2.7.4.9
<i>trxB2</i>	thioredoxin reductase	1.6.4.5
<i>udk</i>	uridine kinase	2.7.1.48

Spalten von Nukleotiden und Nukleosiden

<i>iunH1</i>	inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	
<i>gmk</i>	guanylate kinase	2.7.4.8
	xanthine phosphoribosyltransferase	2.4.2.--
	adenosine deaminase	3.5.4.4
	cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein	3.5.4.5

Zucker-Nukleotid Biosynthese und Interkonversionen

<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase	5.1.3.2
<i>galU</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7.7.9
	UDP-galactopyranose mutase	5.4.99.9

FETTSÄURE UND PHOSPHOLIPID METABOLISMUS

<i>atoB</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	2.3.1.9
-------------	------------------------------	---------

Fettsäurebiosynthese

<i>accA2</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, α -subunit	6.4.1.2
<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier subunit	6.4.1.2
<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, β -subunit	6.4.1.2
	acetyl-coA carboxylase carboxyl transferase subunit β/α	6.4.1.2
<i>acpA2</i>	acyl carrier protein	
<i>fabf</i>	3-oxoacyl carrier protein synthase II	2.3.1.41
<i>fabH2</i>	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) synthase III	2.3.1.41
<i>fabZ2</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-(acyl carrier protein) dehydratase	4.2.1.--
<i>fabD</i>	(acyl-carrier protein) S-malonyltransferase	2.3.1.39
	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	
<i>fabG1</i>	oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	1.1.1.100
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	

Generelllipase (*Clostridium perfringens*)**Glyzerolipid Metabolismus**

<i>glpK</i>	glycerolkinase	2.7.1.30
<i>cls</i>	cardiolipin synthetase	2.7.8.—

Sterol, Vitamin K, Vitamin E, Carotenoidbiosynthese

<i>idiI</i>	isopentenyl-diphosphate δ -isomerase	5.3.3.2
<i>mvaD</i>	mevalonate diphosphate decarboxylase	4.1.1.33
<i>mvaK1</i>	mevalonate kinase	2.7.1.36
<i>mvaK2</i>	phosphomevalonate kinase	2.7.4.2
<i>mvaA</i>	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	1.1.1.34
<i>mvaS</i>	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	4.1.3.5

BIOSYNTHESE VON COFAKTOREN, PROSTHETISCHEN GRUPPEN UND CARRIERN

S-adenosylmethionine synthetase 2.5.1.6

Biotin

biotin-(acetyl-CoA-carboxylase) ligase and operon repressor 6.3.4.15

Folsäure

5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 1.7.99.5

Glutathion, Thioredoxin und Glutaredoxin

<i>gshR4</i>	glutathione reductase	1.6.4.2
<i>trxA1</i>	thioredoxin	

Häm, Porphyrin und Cobalmin*hemK* protoporphyrinogen oxidase, putative 2.1.1.--**Menaquinonebiosynthese**

<i>menB</i>	dihydroxynaphtonic acid synthase	
<i>pheB</i>	chorismate mutase	5.4.99.5

Nikotinsäure und Nikotinamid Metabolismus

<i>pncA</i>	pyrazinamidase/nicotinamidase	3.5.1.19
<i>nadD</i>	nicotinate nucleotide adenylyl transferase	2.7.7.18
	NH ₃ dependent NAD ⁺ synthetase	6.3.5.1
	nicotinate phosphoribosyltransferase	2.4.2.11

	NAD synthase	6.3.5.1
Pantothensäure		
<i>coaBC</i>	phosphopantothenate-cysteine ligase	6.3.2.5
Riboflavin, FMN, FAD		
<i>cobQ</i>	cobyric acid synthase	6.3.5.--
<i>ribF</i>	riboflavin biosynthesis protein	
Thiamin		
<i>thiI</i>	thiamine biosynthesis protein	

ZENTRALER INTERMEDIÄRER METABOLISMUS

Aminozucker

<i>glmM</i>	phosphoglucosamine mutase	5.4.2.10
<i>pgmA</i>	phosphoglucomutase	5.4.2.2
<i>pgmA1</i>	phosphoglucomutase	

Biosynthese und Abbau von Polysacchariden

<i>lev</i>	levansucrase	2.4.1.10
	dextransucrase	2.4.1.5
	glucosyltransferase-I precursor (Dextransucrase)	
	glucan-binding domain (YG repeat)	
	rhamnosyl transferase	
	galactosyltransferase	2.4.1.-

Phosphorbestandteile

<i>ppx1</i>	exopolyphosphatase	3.6.1.11
<i>ppx2</i>	exopolyphosphatase	3.6.1.11
<i>ppx3</i>	exopolyphosphatase	3.6.1.11
<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	2.7.4.1
	exopolyphosphatase-related protein (putative)	

Andere

<i>mapA</i>	maltosephosphorylase	2.4.1.8
<i>mapA2</i>	maltosephosphorylase	2.4.1.8

ENERGIEMETABOLISMUS

<i>nuoL</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 aldehyde-alcohol dehydrogenase	1.6.5.3
-------------	--	---------

Aerob

	oxidoreductase	
	oxidoreductase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1161)	
	oxidoreductase, Gfo/Idh/MocA family	
<i>nadh5</i>	NADH dehydrogenase, subunit 5	1.6.99.5
<i>nox</i>	NADH oxidase	1.6.
	NADH oxidoreductase	

Aminosäuren und Amine

	D-hydroxyisocaproate dehydrogenase	1.1.1.-
<i>aspC</i>	PLP-dependent aspartate aminotransferase	
	amino acid aminotransferase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0339)	
	amino acid amidohydrolase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_2263)	
<i>araT1</i>	aromatic amino acid specific aminotransferase	2.6.1.--
<i>araT2</i>	aromatic amino acid specific aminotransferase	2.6.1.--
<i>araTCP</i>	aromatic amino acid aminotransferase	2.6.1.--
	putative amino acid aminotransferase	

Anaerob

	nitroreductase family protein, putative	1.7.99.4
<i>gspA</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P) ⁺)	1.1.1.94

ATP-Proton Motive Force Interkonversionen

<i>atpD</i>	F ₁ F ₀ -ATPase, β-subunit	3.6.3.14
<i>atpC</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, ε-subunit	3.6.3.14

Elektronentransport

flavodoxin

Fermentation

<i>pta</i>	phosphotransacetylase	2.3.1.8
<i>ack</i>	acetate kinase	2.7.2.1

Glykolyse, Glukoneogenese

<i>adhI/adha</i>	alcohol dehydrogenase, short chain	1.1.1.1
<i>D-ldh</i>	D-lactate dehydrogenase	1.1.1.28
<i>L-ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	1.1.1.27
<i>galM2</i>	aldose-1-epimerase	5.1.3.3
<i>enoA1</i>	phosphopyruvate hydratase	4.2.1.11
<i>pgmb</i>	β-phosphoglucomutase	5.4.2.6
<i>pgm1</i>	phosphoglyceratmutase	5.4.2.1

<i>pgm3</i>	phosphoglycerate mutase	5.4.2.1
<i>pgm4</i>	phosphoglycerate mutase	5.4.2.1
<i>pgk</i>	phosphoglyceratekinase	2.7.2.3
<i>labU</i>	phosphoglyceromutase	

Organische Säuren

<i>mleS</i>	malolactic enzyme	1.-.-.
-------------	-------------------	--------

Pentose-Phosphate-Weg

<i>gntK</i>	gluconokinase	2.7.1.12
<i>rpe</i>	ribulose-phosphate 3-epimerase	5.1.3.1
<i>xpK</i>	phosphoketolase	4.1.2.9
	(glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase)	1.1.1.49

Zucker

<i>galM2</i>	aldose-1-epimerase	5.1.3.3
<i>rbsI</i>	ribobose-5-phosphate-isomerase	
<i>rbsK</i>	ribokinase	2.7.1.15
	phospho- β -glucosidase	3.2.1.86
	mannitdehydrogenase	
	maltose O-acetyltransferase	2.3.1.79

Zitronensäurezyklus

<i>citF</i>	citrat lyase α -chain /(citrat CoaTransferase subunit)	4.1.3.6; 2.8.3.10
<i>citE</i>	citrate lyase β -chain	4.1.3.6; 4.1.3.34
<i>citD</i>	citrate lyase acyl carrier protein	4.1.3.6
<i>citX</i>	apo-citrate lyase phosphoribosyl-ft dephospho-CoA transferase	
	fumarate hydratase	4.2.1.2
<i>mae</i>	malate oxidoreductase	1.1.1.37

TRANSPORT UND BINDEPROTEINE

Aminosäuren, Peptide und Amine

<i>ctrA</i>	cationic amino acid transporter (lysine specific permease)
<i>glnQ3</i>	glutamine ABC transporter, ATP-binding protein
<i>glnQ4</i>	glutamine ABC transporter, ATP-binding protein
<i>brnQ3</i>	branched-chain amino acid transport protein
<i>brnQ</i>	putative branched-chain amino acid transporter
<i>glnM</i>	glutamine ABC transporter, permease protein
<i>glnH1</i>	glutamine ABC transporter, substrate binding protein
<i>glnP2</i>	glutamine ABC transporter, permease

<i>ptr2</i>	di-/tripeptide transporter (homolog to <i>Lactobacillus helveticus</i>)
<i>dtpT</i>	di-/tripeptide transport protein
	glycine betaine/carnitine/choline transport protein
<i>lysP</i>	lysine transport protein
<i>oppA1</i>	oligopeptide binding protein
<i>oppB</i>	transmembrane protein OppB (ATP-binding protein)
<i>oppD</i>	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein
<i>oppF</i>	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein
	Gamma-aminobutyrate permease and related permeases
	amino acid transporter (lysine specific?)
	amino acid transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1120)
	amino acid transporter (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1811)
	amino acid transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1722)
	amino acid transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_2240)
	amino acid ABC transporter(homolog to <i>L. plantarum</i> lp_3211)
	amino acid ABC transporter, substrate binding protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_3214)
	amino acid transporter SE2021
	amino acid transporter
	glutamine ABC transporter, substrat binding protein
	amino acid transport protein (<i>S.aureus</i>)
	probable amino acid transporter(<i>Bifidobacterium longum</i>)
	probable amino acid transporter <i>yfnA</i>
	amino acid transporter (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)
	amino acid permease family protein
	ABC transporter, ATP-binding protein SP2220
	ABC transporter ATPase component15-9a

Anionen

	alkylphosphonate ABC transporter
	phosphonate ABC transporter, permease protein
<i>eriC</i>	voltage-gated chloride channel family protein

Kohlenhydrate, organische Alkohole und Säuren

<i>xylT</i>	D-xylose-proton symporter
<i>map</i>	maltosepermease
<i>mleP</i>	malate permease
	sugar transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1729)
	sugar transport protein (sucrose)(homolog to <i>L. plantarum</i> lp_3533)
	sugar transport SE0123

Kationen

<i>copB</i>	copper transporting ATPase	
<i>pacL1</i>	cation transporting P-type ATPase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0124)	
<i>amtB</i>	ammonium transport protein	
<i>nha1</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	
<i>napA2</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	
<i>napA3</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter, putative (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0815)	
<i>napA4</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	
	Co/Zn/Cd efflux system component	
<i>czcD</i>	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	
<i>atpH</i>	(+) transporting two-sector ATPase. delta subunit	
<i>mgtA</i>	cation-transporting P-type ATPase(homolog to <i>L. plantarum</i> to lp1154)	3.6.3.--
<i>mntH</i>	manganese transport protein	
	proton-dependent manganese transporter, group C β1	
	zinc/iron ABC transporter	
	zinc/iron ABC transporter, permease protein	
	ABC transporter substrate binding protein (homolog to <i>L. plantarum</i> to lp_3302)	

Multidrug Resistenz

	multidrug resistance protein, putative (from <i>Enterococcus faecalis</i>)	
<i>lmrA</i>	multidrug ABC transporter, ATP-binding and permease protein	
	multidrug resistance efflux pump	
	multidrug transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0770)	
	multidrug transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp-1302)	
	multidrug transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_3303)	
	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase	
	permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	

Nukleoside, Purine und Pyrimidine

<i>nupC</i>	pyrimidine nucleoside transport	
<i>pyrP</i>	uracil transporter	
	xanthine/uracil permease family protein	

PTS -Systeme

<i>hprK</i>	bifunctional protein: HPr kinase; P-ser-HPr phosphatase	2.7.1.--; 3.1.3.--
<i>ptsK</i>	HPr kinase/phosphatase	
	(β-glucosides PTS, EIIB)	2.7.1.69

Unbekannte Substrate

<i>escb</i>	ABC transporter,permease	
<i>atmE</i>	putative ABC transporter, permease	

yudA	transport protein
	ABC transporter, ATP-binding protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp0160)
	ABC transporter, permease protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0217)
	ABC transporter, ATP-binding protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0218)
	transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0295)
	transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0492)
	transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0729)
	ABC transporter, ATP-binding protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1871)
	transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_3171)
	ABC transporter, ATP-binding protein
	ABC-2 transporter, permease protein
	ABC transporter, ATP-binding subunit
	ABC transporter ATP-binding protein <i>yjjC</i>
	ABC transporter, permease protein (putative)
	ABC transporter, ATP-binding protein (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
	ABC transporter, ATP-binding protein (<i>Bacillus anthracis</i>)
	ABC transporter, ATP-binding protein SP2220

Andere

	riboflavin transporter
	ABC-2 transporter, permease protein, putative (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
	transport protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_2789)
	transporter, EamA family

DNA METABOLISMUS**Abbau von DNA**

<i>rexA</i>	ATP dependent nuclease	
<i>rexB</i>	ATP dependent nuclease, subunit B	
<i>uvrA1</i>	excinuclease ABC, subunit A	
<i>uvrB</i>	excinuclease ABC, subunit B	
<i>uvrC</i>	excinuclease ABC, subunit C	
	endonuclease IV	3.1.21.2
<i>recJ</i>	single-strand DNA-specific exonuclease RecJ	

DNA Replikation, Rekombination und Reparatur

<i>codV</i>	integrase/recombinase	
<i>dinG</i>	ATP-dependent helicase	3.6.1.-
<i>dinP</i>	DNA damage inducible protein P	
<i>dnaA</i>	chromosomal replication initiation protein	
<i>dnaB</i>	replicative DNA helicase	

<i>dnaC</i>	replicative DNA helicase	3.6.1.--
<i>dnaI</i>	primosomal protein	
<i>dnaN</i>	DNA-directed DNA polymerase III, β -subunit	2.7.7.7
<i>dnaX</i>	DNA-directed DNA polymerase III, γ -subunit	2.7.7.7
<i>gyrA</i>	DNA-Gyrase	5.99.1.3
<i>gyrB</i>	DNA gyrase, B subunit	5.99.1.3
<i>hexB</i>	DNA mismatch repair protein	
<i>holB</i>	DNA-directed DNA polymerase III, δ' subunit	2.7.7.7
<i>ligA</i>	DNA-ligase (NAD ⁺ -dependent)	6.5.1.2
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein	
<i>nfo</i>	deoxyribonuclease IV	3.1.21.2
<i>parE</i>	Topoisomerase IV, subunit B	5.99.1.--
<i>priA</i>	primosomal protein N`	
<i>pcrA</i>	ATP-dependent DNA helicase	3.6.1.--
<i>polC</i>	DNA-directed DNA Polymerase III, α -chain	2.7.7.7
<i>radA</i>	DNA repair protein	
<i>recA</i>	recombinase A	
<i>recD</i>	exodeoxyribonuclease V, alpha chain 5	3.1.11.5
<i>recR</i>	recombination protein	
<i>recF</i>	DNA repair and genetic recombination protein	
<i>rheI</i>	ATP-dependent RNA helicase	
<i>topA</i>	DNA topoisomerase	5.99.1.2
<i>ung</i>	uracil-DNA glycosylase	3.2.2.--
	DNA-directed DNA Polymerase III, δ -subunit	2.7.7.7
	DNA polymerase III polC-type	
	DNA-directed DNA-Polymerase	
	N-methylpurine-DNA glycosylase	
	DNA-Ligase	6.5.1.2
	DNA-Helicase	
	tyrosine family DNA recombinase	
	putative tyrosine family DNA recombinase	

Restriktion und Modifikation

mrr restriction system protein

TRANSKRIPTION

Abbau von RNA

rnh ribonuclease H 3.1.26.4
t-RNA-processing ribonuclease BN 3.1.

DNA-abhängige RNA-Polymerase

<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase, α -subunit	2.7.7.6
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA-Polymerase β -chain	2.7.7.6
<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA-Polymerase	2.7.7.6
<i>rpoZ</i>	DNA-directed RNA polymerase, ω -subunit	2.7.7.6
	DNA-directed RNA polymerase β' chain	

RNA-Prozessierung

<i>rimM</i>	putative 16S rRNA processing protein ATP dependent RNA helicase(cold shock dead box), DeaD, superfamily II)
-------------	--

RNA Synthese, Modifikation und DNA Transkription

<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor 7 RNA methyltransferase RNA methyltransferase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1151)
------------	---

Transkriptionsfaktoren

<i>sigH</i>	DNA-directed RNA polymerase, sigma factor 30 DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma factor 24 homolog
<i>greA</i>	transcription elongation factor
<i>nusA</i>	transcription termination-antitermination factor
<i>pspC</i>	putative stress-responsive transcriptional regulator
<i>codR</i>	transcriptional regulator

Andere

<i>tex</i>	transcription accessory protein
<i>dusA</i>	tRNA-dihydrouridine synthase

PROTEINBIOSYNTHESE**Ribosomale Proteine: Modifikationen**

<i>prmA</i>	ribosomal protein L11 methyltransferase
-------------	---

Ribosomale Proteine: Synthese

<i>rplC</i>	ribosomal protein L3
<i>rplD</i>	ribosomal protein L4
<i>rplE</i>	ribosomal protein L5
<i>rplF</i>	ribosomal protein L6
<i>rplI</i>	ribosomal protein L9
<i>rplK</i>	ribosomal protein L11
<i>rplN</i>	ribosomal protein L14

<i>rplR</i>	ribosomal protein L18
<i>rplX</i>	ribosomal protein L24
	ribosomal protein L30
	50S ribosomal protein
<i>rpsB</i>	ribosomal protein S2
<i>rpsD</i>	ribosomal protein S4
<i>rpsE</i>	ribosomal protein S5
<i>rpsG</i>	ribosomal protein S7
<i>rpsH</i>	ribosomal protein S8
<i>rpsJ</i>	ribosomal protein S10
<i>rpsK</i>	ribosomal protein S11
<i>rpsN</i>	ribosomal protein S14
<i>rpsS</i>	ribosomal protein S19
	30S ribosomal protein

Translationsfaktoren

<i>prfB</i>	peptide chain release factor 2 in translation
<i>prfC</i>	peptide chain release factor 3
<i>prfBC</i>	peptide chain release factor 2, C-terminal fragment
<i>fusA1</i>	elongation factor G
<i>fusA2</i>	elongation factor G
<i>infB</i>	translation initiation factor 2
<i>tuf</i>	putative elongation factor Tu
<i>tsf</i>	elongation factor Ts
<i>lepA</i>	GTP-binding translation elongation factor

tRNA-Aminoacylierung

<i>alaS</i>	alanine-tRNA-ligase	6.1.1.7
<i>argS</i>	arginine-tRNA-ligase	6.1.1.19
<i>asnS1</i>	asparagine-tRNA-ligase	6.1.1.22
<i>asnS2</i>	asparagine-tRNA-ligase	6.1.1.22
<i>cysS</i>	cysteine-tRNA-ligase	6.1.1.16
<i>glnS</i>	glutamine-tRNA-ligase	6.1.1.18
<i>gltS</i>	glutamate-tRNA ligase	6.1.1. 17
<i>hisS</i>	histidine-tRNA-ligase	6.1.1.21
<i>ileS</i>	isoleucine-tRNA-ligase	6.1.1.5
<i>leuS</i>	leucine-tRNA-ligase	6.1.1.4
<i>lysS</i>	lysine-tRNA ligase	6.1.1.6
<i>metS</i>	methionine-tRNA-ligase	6.1.1.10
<i>pheT</i>	phenylalanine-tRNA ligase, β -chain	6.1.1.20
<i>trpS</i>	tryptophan-tRNA-ligase	6.1.1.2

<i>tyrS</i>	tyrosine-tRNA-ligase	6.1.1.1
<i>vals</i>	valine-tRNA ligase	6.1.1.9

tRNA und rRNA Basen Modifikation

<i>pth</i>	aminoacyl-tRNA hydrolase	3.1.1.29
	dimethyladenosinetransferase	2.1.1.--
<i>gatA</i>	glutamyl-tRNA-aminotransferase subunit A	6.3.5.--
<i>gatB</i>	glutamyl-tRNA amidotransferase	6.3.5.--
<i>trmU</i>	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	2.1.1.61
<i>thdF/trmE</i>	thiophene and furan oxidation protein/tRNA modefying GTPase	
<i>truA</i>	pseudouridylate synthase A	
	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	3.1.--.--
	rRNA methylase (putative) (homolog to <i>L.plantarum</i> lp_1724)	2.3.1.57

Andere

<i>srnB</i>	SSRA RNA binding Protein	
	S1 RNA-binding domain protein	
<i>speG</i>	spermidine n1-acetyltransferase	
<i>miaB</i>	2-methylthioadenine synthetase	
	tRNA-dihydrouridine synthase	

PROTEINSCHICKSAL

Abbau von Proteinen, Peptiden und Glykopeptiden

<i>pepC</i>	cysteine aminopeptidase	
<i>pepI</i>	prolyl aminopeptidase	3.4.11.5
<i>pepN</i>	membrane alanine aminopeptidase	3.4.11.2
<i>pepO</i>	endopeptidase	3.4.24.--
<i>pepR</i>	prolyl aminopeptidase	3.4.11.5
<i>pepT</i>	tripeptidase	3.4.11.-
<i>pepV</i>	probable amino acid permease/dipeptidase	3.4.13.--
<i>pepX</i>	X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase	3.4.14.11
	ATP-dependent zinc metallopeptidase	
	peptidase, M20/M25/M40 family	
	membrane-bound protease, CAAX (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1359)	

Protein und Peptidsekretion

<i>secA</i>	preprotein translocase, SecA subunit	
<i>yajC</i>	preprotein translocase, subunit (putative), homolog to <i>L. plantarum</i> lp_2281	
<i>ffh</i>	signal peptidase type IV	
	signal peptidase I	3.4.21.89

Protein Modifizierung und Reparatur

protein-tyrosine phosphatase 3.1.3.48

REGULATORISCHE FUNKTIONEN**Familie der GntR-Regulatoren**

transcriptional regulator (homolog to *L. plantarum* lp_0563)

GTP-Bindeproteine

lepA GTP-binding protein

typA GTP-binding protein

GTP-binding protein (homolog to *L. plantarum* lp_2049)

GTP-binding protein (homolog to *L. plantarum* lp_3196)

Familie der LacI-Regulatoren

kdgR KDG operon repressor (pectin utilization operon)

LysR-Familie

transcriptional regulator (homolog to *L. plantarum* lp_2842)

Zwei-Komponenten Regulatoren

hprK bifunctional protein: HPr kinase; P-ser-HPr phosphatase 2.7.1.--; 3.1.3.--

ptsK HPr kinase/phosphatase

rr11 two component response regulator

Andere

ctsR transcriptional repressor of class III stress genes

copR transcription regulator

malR maltose operon transcriptional repressor

pai1 protease synthase and sporulation negative regulatory protein (acetyltransferase)

pspC putative stress-responsive transcriptional regulator (phage shock protein)

purR purine biosynthesis operon repressor

transcription regulator (homolog to *L. plantarum* lp_0549)

transcriptional regulator (homolog to *L. plantarum* lp_1150)

transcriptional repressor (homolog to *L. plantarum* lp_1820)

transcriptional regulator 19-2f

transcription regulator (repressor Cro/CI-family)

TPR domain transcriptional regulator, Cro/CI family

probable transcriptional regulator (Bacteriophage EJ-1)

putative transcriptional regulator (*B.macerans*)

transcriptional regulator (TetR/AcrR family)

putative MalR repressor protein

ZELLHÜLLE

<i>lgt</i>	prolipoprotein diacylglyceryl transferase FemX (homolog to FemX of <i>Weissella viridescens</i>) major outer membrane lipoprotein, putative alkaline phosphatase superfamily protein	2.4.99.- 3.1.3.1
------------	--	-----------------------------

Mureinsakkulus und Peptidoglykan

<i>alr</i>	alanine racemase	5.1.1.1
<i>acm2</i>	muramidase	3.5.1.28; 3.2.1.17
<i>dacA</i>	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase dacA1	3.4.16.4
<i>murA2</i>	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	2.5.1.7
<i>murE</i>	UDP-MurNac-tripeptide synthetase	6.3.2.13
<i>murE1</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase	6.3.2.13
<i>murA1</i>	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	2.5.1.7
<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase	6.3.2.8
<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase	6.3.2.9
	penicillin binding protein 1A	
<i>pbp2B</i>	penicillin binding protein 2B	
<i>mraY</i>	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	2.7.8.13
<i>ddl</i>	D-alanine-D-alanine ligase	6.3.2.4

Oberflächenpolysaccharide, Lipopolysaccharide und Antigene

	extracellular protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0302)	
	extracellular protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0304)	
	extracellular protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0869)	
	extracellular protein (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_2845)	
<i>cps1D</i>	glycosyltransferase	
<i>cpsJ3</i>	polysaccharide biosynthesis protein	
<i>cpsO</i>	glycosyltransferase (exopolysaccharide)	
<i>wcfN</i>	putative glycosyltransferase	
	priming glycosyltransferase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1233)	
	cell surface protein precursor (homolog to <i>L. plantarum</i> lp1043)	
	cell surface protein precursor (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1643)	
	cell surface protein precursor (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_3114)	
	basic surface protein	

Oberflächenstruktur

<i>cnb</i>	collagen binding protein	
------------	--------------------------	--

aggh autoaggregation mediating protein
apfl aggregation promoting factor

Teichonsäurebiosynthese

tagB3 teichoic acid biosynthesis protein

ZELLULÄRE PROZESSE

Adaptationen und atypische Bedingungen (Clp-System)

clpA ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit
clpB ClpB protein
clpC ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit
clpE ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit
clpP proteolytic subunit
clpL ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit
clpX ATP dependent Clp protease, N and C-terminal fragment

Adaptationen und atypische Bedingungen (Hitze/Kälteschock)

cspL cold shock protein
grpE heat shock protein
dnaK heat shock protein
dnaJ chaperone protein
hrca transcriptional regulator of heat shock gene

Adaptationen und atypische Bedingungen (andere)

hpo halo peroxidase

Zellteilung

chpA cell growth regulatory protein
ftsA cell division protein
ftsH cell division protein FtsH,(oligopeptide binding protein)
ftsH cell division protein FtsH, ATP-dependent zinc metallopeptidase
ftsK1 cell division protein FtsK/ DNA translocase
ftsZ cell division protein
gidA glucose inhibited division protein
gidB glucose-inhibited division protein B
mesJ cell cycle protein
mraW cell division protein
mreB cell shape determining protein
mreC cell shape determining protein
parA chromosome partitioning protein, membrane-associated ATPase

smc chromosome segregation SMC ATPase
 chromosome segregation helicase (putative *csH2*)
 chromosome partitioning protein, membrane-associated ATPase
 cell division protein, FtsK/SpoIIIE family
 cell division protein (homolog to *L. plantarum* lp_2190)

Chaperone

hsp60 GroEL

hsp10 GroES

Detoxifikation

npr1 NADH peroxidase 1.11.1.1

npr2 NADH peroxidase 1.11.1.1

Signalübertragung

uspA universal stress protein USPA family (homolog to *L. plantarum* lp_1163)
 DHH family protein

DNA-Transformation und Kompetenz

ComEC operon protein I

ComEA competence protein

comGB competence protein ComGB

comGA ComG operon protein 1

radA DNA repair protein

Toxinproduktion und Resistenz

plnY plantaricin biosynthesis protein

Andere

BacI-like protein

haloacid dehalogenase 3.8.1.2

putative haloacid dehalogenase like hydrolase

ANDERE KATEGORIEN**Antibiotikaresistenz und Sensitivität**

chloramphenicol resistance protein

chloramphenicolacetyltransferase 2.3.1.28

Transposon und ähnliche Funktionen

	IS153
	ISLsf1
	ISLsf2
	ISLsf3
	ISLsf4
	ISLsf6
	IS1
	ISLsf1'5
	transposase von IS10
	transposase aus <i>Enterococcus hirae</i> 1
	transposase aus <i>Enterococcus hirae</i> 2
	transposase [<i>B.cereus</i>]
	transposase (<i>Clostridium tetani</i> CTC_00621)
	transposase aus <i>L.mesenteroides</i>
	transposase (<i>Lactococcus lactis</i> insertion sequence IS-LL6)
	transposase (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	transposase (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
	transposase (<i>Xanthobacter autotrophicus</i>)
	transposase 7291
	transposase 322353
	transposase 290353
	putative transposase (<i>Lactobacillus paracasei</i>)
	putative integrase <i>int</i> (<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>)
<i>codV</i>	integrase/recombinase
	transposase, putative <i>Enterococcus faecalis</i> V583
	putative transposase <i>prcB</i>

PHAGEN

<i>arpU</i>	phage transcriptional regulator
<i>codV</i>	integrase/recombinase
<i>pspC</i>	putative stress-responsive transcriptional regulator(phage shock protein)
	dGTP triphosphohydrolase inhibitor [Enterobacteria phage T7]
	probable transcriptional regulator [Bacteriophage EJ-1]

HYPOTHETISCHE PROTEINE**Konserviert**

conserved hypothetical protein (*E. faecalis* EF_1145)

conserved hypothetical protein(*Coxiella burnetii*)

conserved domain protein EF0469

Membran Proteine

ähnlich zu *Lactobacillus plantarum*

Integrale Membranproteine lp_0753, lp_0968, lp_0969, lp_0999, lp_1174,
lp_1435, lp_1436, lp_1887, lp_1978, lp_2290,
lp_2549, lp_2642, lp_2671, lp_3359

andere

integral membrane protein 7-1

integral membrane protein 19-2

membrane protein, putative 8-2f

putative integral membrane protein

Andere hypothetische Proteine

ähnlich zu *Lactobacillus plantarum*

Hypothetische Proteine lp_0026, lp_0038, lp_0039, lp_0045, lp_0304,
lp_0340,lp_0704, lp_0706, lp_0725, lp_0780,
lp_0781,lp_0818, lp_0819, lp_0871, lp_1235,
lp_1236,lp_1240, lp_1427 lp_1529, lp_1534, ,
lp_1626,lp_1637, lp_1805, lp_1893, lp_1886,
lp_1887,lp_1992, lp_2042, lp_2169, lp_2219,
lp_2230,lp_2236, lp_2260, lp_2300, lp_2306,
lp_2333,lp_2340, lp_2342, lp_2623, lp_2652,
lp_3040,lp_3236, lp_3423, lp_3663, lp_3391

weitere

hypothetical protein(*yetP*)

hypothetical protein BH0305 similar to phosphoglyceratekinase

hypothetical protein C03E10.3 (*Caenorhabditis elegans*)

hypothetical protein (*Campylobacter jejuni*)

hypothetical protein (*Clostridium tetani* CTC_00214)

hypothetical protein (*Enterococcus faecalis*)

hypothetical protein (*Francisella tularensis*)

hypothetical protein (*Lactobacillus helveticus*)

hypothetical protein SA2239 (*Staphylococcus aureus*)

hypothetical protein(*Streptococcus pyogenes*)

hypothetical protein (*S. mutans*)

hypothetical protein (*Zymomonas mobilis*)

hypothetical protein similar to phosphoglucomutase homolog

hypothetical protein similar to tetrahydrodipicolinate succinylase

hypothetical cytosolic protein

<i>cinA</i>	competence/ damage-inducible protein ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain acyltransferase (putative) aminotransferase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1721) AtsA/ElaC family protein, metal-dependent hydrolase of the β a-lactamase superfamily III cell wall associated hydrolase chlorohydrolase family protein 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase DegV family protein, uncharacterized protein conserved in bacteria epimerase Esterase-Lipase-17-6d Esterase-Lipase-4-11e
<i>orf2</i>	GTPase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1528)
<i>obg</i>	GTPase Obg, hydrolase HAD superfamily cof hydrolase (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0041) hydrolase lp_0476 LemA family protein metal-dependent hydrolase of the β -lactamase superfamily III (homolog to lp_2229) methyltransferase (putative) (homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0707) methyltransferase methylase (putative), homolog to <i>L. plantarum</i> lp_1754 oxidoreductase, homolog to <i>L. plantarum</i> lp_0127 predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases predicted nucleotidyltransferase predicted P-loop-containing kinase pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein tetrapyrrole methylase family protein TPR-domain containing protein zinc-binding oxidoreductase

NICHT-PROTEIN-KODIERENDE-GENE

tmRNA	
5S rRNA	mindestens 4 von mindestens 7
16S rRNA	mindestens 5 von mindestens 7
23S rRNAs	mindestens 6 von mindestens 7

7.2 Sequenzdaten

In diesem Abschnitt werden nur die AC-Nummern und, wenn nicht in Datenbanken hinterlegt, Sequenzen der in dieser Arbeit ausführlicher behandelten Gene dargestellt.

7.2.1 Cobyrinsäure-Synthase

Die Sequenz des Cobyrinsäuresynthasegens ist fett gedruckt. Upstream von *cobQ* wird *murC* (UDP-N-acetylmuramat-Alanin-Ligase) kodiert, downstream befindet sich ein nicht näher zu charakterisierendes ORF.

murC-cobQ-ORF

AGATTTCGTCAATATTTTCCGAGATCAACTTGATCGATATGGTGAAATTTATACGACATATCAAAAAT
TCTTGATGGAATTGAATTAGATCCCAGTGCAACCGTAATTTCAAATGGTGATGAACCAATTTTCAATT
CAGTTGAACTTCCCTAATCCACAAAATTTATTATGGATTTGAAAATCAACTAGCATCTGGCAATTTTAAA
GCTCATGCAAATACTGACGGGATTATTTGTCCATTTGTCATCACATTTTACATTACCACTATTTAAT
TTATGCTAACTTGGGTGATTACTTCTGTCTAACTGTGGTTACCATCGTCCAGAATTAAGTACAAAG
TTACCAGTGTTGAAAATCAAACCTCCAGTTGAATCAAAGTTTGATATTGACAATCATCAATATCAAATC
AGTGTGGGTGGAACCTACAATATTTACAATGCCCTTAGCTGCCATGCAGTTGGTTCGTGAATTAGGAGT
TACTCCAGAACAGATTAAGCATGCTTTTCGATGCTAATGAAAGAATTTTTGGACGCCAAGAAGAAATTC
ATGTTGGCGATAAAGATGTCACAATATTTTATGTTAAAAATCCGGTTGGAACCTAATCAAGTGATTGAT
TTGCTAACTACTGAAAATGAACCAATTTTCGTTTATGGCTTTGCTAAACGCTAATTATGCTGATGGAAT
TGATACTAGTTGGATTTGGGATGGTGAATTCGAAAGATTACCAAAGATGAACATTCAACAGTTTGAAA
CTGGAGGTTCTCGCTACAAAGATATTACTTTCCGTCTAAAAGTTGCTGGTGTGCCTGATGACAAACAT
ATCGTCCAACCAGATTTAGAAAAAGTGGTTGATGATATTAAAAAAATGCCAACTAAAAAGGTTTATAT
CTTAGCAACCTATACTGCAATGATGCAAGTTAGATCTATTTTAGCTAAGCGTGGTTACATTAAGGAG
GACAAAACCTAATGACAATGAGTATTAGAGTTGCTCATCTTTATGGTGACTTAATGAACACTTATGGTG
ATATTGGAAATATCTTAACCCTTCAATTCTATGCTAAACAAAATGGTGTGGAAGTTACCTCTGATATT
GTTTCTTTAGAAGAGGACTTTAAAGCAGATGACTATGATTTTGTGTCTTCGGTGGTGGCCAAGATTT
CGAGCAAACCTGTTGTGGCAGATGATATTCAATCTAAAAAGCTGAATTAATTAAGTTTATTGAGGCTA
ACAAACCATTTGTTGCTGTATGTGGTGGTTATCAAATGCTTGGTAAATATTACGTTGATGCTAAAGGT
CAAAAATTACCTGGAATTGAAGCCATGAACCATTATACTGAGCAACAACATGACCATCTTTTATTGGT
GATGTTGTCATCGAAAATGAAAAAACGGTAACAAATATCATGGTTTTGAAAATCATCAAGGAATCAC
ATTCTTAGGTGAAGATGAACATCCGCTTGAAAAGTATTGCAAGGATACGGTAACAATGGTCAAGACG
GTACTGAAGGTGCTGTTTATAAAAAATACAGTTGGAACCTATTTTTCATGGACCAATTATGGCCCGTAAT
GGTAACTTCGCTAAATACATGTTGTTCCAAGCTCTTCAAAACAAATATCCTGATACARACTTTACTGA
AATGAAAAACAAGTTAAACTTACGAATATTAAAAAATAGACCTGAATTTTGAATTAATTCGGGTCT

ATTTTTTTGTAAACAAAAAGGTCCCCGTTAGGGACCTTTTTGCTGGAAAAGAGTAGTTCCGTTATTT
 TATAACATATTGAGTATACCATAAGAATTATAGTTTTCAAGAATTAGAAAAATTAATATCATACGGGAT
 TATTAGGAAGCATCTCATCAAAAATAAAAAGGAGGATACAGGATTTGAACCTGCGCGCCAAGTATAAG
 CTT

7.2.2 Tetrapyrrolmethylase

Die Sequenz des Tetrapyrrolmethylasegens ist fett gedruckt. Upstream der Tetrapyrrolmethylase werden *holB* (DNA-gerichtete DNA-Polymerase III) und ein Transportprotein (homolg zu *yabA*) kodiert.

holB-yabA-Tetrapyrrolmethylasegen

CATTGGAGATGATGTGTTTGATTTTTTCGAGAAGTTTTTAACGTTAAATTCAAAAATACTCCGGCTAGT
 GAGTTAGCGTTTGAAATATTTATGATTTAATTAGTCAGATGGCCAATCATTTGTTCGGATAATCAATT
 GATTTGTATCATTGATGACATCCTTGAAAGTGTTAAAAACAACAAATTAATGTTAGTTTTCAAATA
 TTTTGGAAGTAATTACGTTGGATTGTTTGAATCAAATTAAGGAGTAGCCAAATTGGATATTAATGAAA
 TGAATGATGGAATGGATAAATTATCCGTTCAATTTAAACAAATGGTTACTAAAATTGGAGAATTGCGT
 GAACAAATTAACGCTGTTCTTGAAGAAAATTCAGAATTAAAAATTGAAAATGAACATTTGCGAGAATT
 ATTAGAAAATTCGGCAAAAAAATGAAGGAGTTCAGGAACCTTTCGAAATCTAAGAACTTTTGGAAA
 AGTTATATAATCAGGGATTTTATGTATGCAACGAATCGTATGGGAAACGACGGTTGCAAGATGAAAGT
 TGTATTTTTTTGTAATTAATCTATGGAGAAAGGTAAATAAAAT**GACTTTACGCACGCAAATGAGT**
TTTGAAAAGCATGATACAGGTAAGTTATATTTAATTCGGACTCCATTGGTAATTTAGAGGATATGAC
TTTTAGAGCAGTTAATTTATTAAGAAGTAGATTTAATTGCTGCTGAAGATACTCGCAATACCCAAA
AG

7.2.3 AC-Nummern

Alle weiteren, hier nicht aufgeführte AC-Nummern wurden bereits in den Tabelle 3.8 und 3.9 angegeben.

ISLsf1	DQ111781
ISLsf2-orfA	DQ133594
ISLsf2-orfB	DQ133593
ISLsf3	DQ133590
ISLsf4	DQ133589
ISLsf6	DQ133588
Transposase H1(Mutator Familie/IS256)	DQ133595

Flankierende, in die beschriebenen chromosomale Umordnung involvierte Regionen von ISLsf6

Permease downstream von ISLsf6 DQ133591

Sequenz upstream von ISLsf6 DQ133592

7 ANHANG Alignment sequenzierter 16S-Operons in *L. sanfranciscensis* DSM 20451^T -167 -

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Operon A-Datenbanksequenz	tgcatggttg	tcgtcagctc	gtgtcgtgag	atgttggggt	aagtcccgca	acgagcgcaa
Operon B	tgcatggttg	tcgtcagctc	gtgtcgtgag	atgttggggt	aagtcccgca	acgagcgcaa
Operon D	tgcatggttg	tcgtcagctc	gtgtcgtgag	atgttggggt	aagtcccgca	acgagcgcaa
Operon E oder F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Operon A-Datenbanksequenz	cccttgtctt	tagttgccag	cattaagttg	ggcactctag	agagactgcc	ggtgataaac
Operon B	cccttgtctt	tagttgccag	cattaagttg	ggcactctag	agagactgcc	ggtgataaac
Operon D	cccttgtctt	tagttgccag	cattaagttg	ggcactctag	agagactgcc	ggtgataaac
Operon E oder F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Operon A-Datenbanksequenz	cggaggaagg	tggggatgac	gtcaaatcat	catgcccctt	atgtcctggg	ctacacacgt
Operon B	cggaggaagg	tggggatgac	gtcaaatcat	catgcccctt	atgtcctggg	ctacacacgt
Operon D	cggaggaagg	tggggatgac	gtcaaatcat	catgcccctt	atgtcctggg	ctacacacgt
Operon E oder F	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Operon A-Datenbanksequenz	gctacaatgg	gcgataacaac	gagttgcgaa	accgcgaggt	caagtaaatc	tcttaaagtc
Operon B	gctacaatgg	gcgataacaac	gagttgcgaa	accgcgaggt	caagtaaatc	tcttaaagtc
Operon D	gctacaatgg	gcgataacaac	gagttgcgaa	accgcgaggt	caagtaaatc	tcttaaagtc
Operon E oder F	-----	-----	-----	--cgcgaggt	caagtaaatc	tcttaaagtc
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
Operon A-Datenbanksequenz	gttctcagtt	cggattgcag	tctgcaactc	gactgcatga	agttggaatc	gctagtaatc
Operon B	gttctcagtt	cggattgcag	tctgcaactc	gactgcatga	agttggaatc	gctagtaatc
Operon D	gttctcagtt	cggattgcag	tctgcaactc	gactgcatga	agttggaatc	gctagtaatc
Operon E oder F	gttctcagtt	cggattgcag	tctgcaactc	gactgcatga	agttggaatc	gctagtaatc
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Operon A-Datenbanksequenz	gtggatcagc	atgccacggt	gaatacgttc	ccgggtcttg	tacacaccgc	ccgtcacacc
Operon B	gtggatcagc	atgccacggt	gaatacgttc	ccgggtcttg	tacacaccgc	ccgtcacacc
Operon D	gtggatcagc	atgccacggt	gaatacgttc	ccgggtcttg	tacacaccgc	ccgtcacacc
Operon E oder F	gtggatcagc	atgccacggt	gaatacgttc	ccgggtcttg	tacacaccgc	ccgtcacacc
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Operon A-Datenbanksequenz	atgagagttt	gtaacaccca	aagtcggttg	gataaccttt	ttaggagtcc	gccgcctaag
Operon B	atgagagttt	gtaacaccca	aagtcggttg	gataaccttt	ttaggagtcc	gccgcctaag
Operon D	atgagagttt	gtaacaccca	aagtcggttg	gataaccttt	ttaggagtcc	gccgcctaag
Operon E oder F	atgagagttt	gtaacaccca	aagtcggttg	gataaccttt	ttaggagtcc	gccgcataag
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Operon A-Datenbanksequenz	gtgggacaga	tgattagggg	gaagtcgtaa	caaggtagcc	gtaggagaac	ctgctggctgg
Operon B	gtgggacaga	tgattagggg	gaagtcgtaa	caaggtagcc	gtaggagaac	ctgctggctgg
Operon D	gtgggacaga	tgattagggg	gaagtcgtaa	caaggtagcc	gtaggagaac	ctgctggctgg
Operon E oder F	atgggacaga	tgattagggg	gaagtcgtaa	caaggtagcc	gtaggagaac	ctgctggctgg
	1570					
Operon A-Datenbanksequenz	atcacctcct	ttnt				
Operon B	atcacctcct	ttct				
Operon D	atcacctcct	ttct				
Operon E oder F	atcacctcct	ttct				

7.4 Alignment 16S rDNA-Sequenzen der Hochdruckmutante

zu Abschnitt 3.4

Die Bezeichnungen der 16S-rDNA-Sequenzen enden jeweils mit -pfu, Zahlen oder Buchstaben vor -pfu geben die Nummer des *E. coli* Klons an, aus dem das jeweilige Plasmid isoliert wurde. Die Sequenzen der Hochdruckmutante wurden mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz für den *L. sanfranciscensis* DSM20451^T-Wildtyp verglichen (Bezeichnung: 1.53-WT; AC X76327). Unterschiede zwischen den Sequenzen wurden grau unterlegt. Nach Berücksichtigung der Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen 16S-rRNA-Operons des Wildtyps (vergleiche Abschnitt 7.3), konnten keine Mutationen in der 16S rDNA der Hochdruckmutante beobachtet werden.

1.53-WT	TTCCGCCTTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA	928
A-pfu	TTCCGCCTTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA	60
17-pfu	-----ACCGCA	6
51-pfu	-----GTACGACCGCA	11
5-pfu	-----CGCA	4
C- pfu	--CCGCCTTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA	58
18-pfu	-----CGCA	4
14-pfu	-----CGACCGCA	8
56-pfu	-----GACCGCA	7
12-pfu	-----ACCGCA	6
20-pfu	-----ACCGCA	6
31-pfu	-----ACCGCA	6
10-pfu	-----A	1
44-pfu	-----A	1
45-pfu	-----GCA	3
26-pfu	-----GCA	3
22-pfu	-----GCA	3
7-pfu	-----GCA	3
57-pfu	-----CGCA	4
53-pfu	-----CGCA	4
52-pfu	-----CGCA	4
49-pfu	-----CGCA	4
38-pfu	-----CGCA	4
34-pfu	-----CGCA	4
30-pfu	-----CGCA	4
24-pfu	-----CGCA	4
8-pfu	-----CGCA	4
41-pfu	-----CCGCA	5
35-pfu	-----CCGCA	5
33-pfu	-----CCGCA	5
32-pfu	-----CCGCA	5
27-pfu	-----CCGCA	5
23-pfu	-----CCGCA	5
6-pfu	-----CCGCA	5

B- pfu ---CGCCTTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA 57
 60-pfu -----ACCGCA 6
 58-pfu -----ACCGCA 6
 9-pfu -----
 25-pfu -----CGCA 4

1.53-WT AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 988

A-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 120
 17-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 66
 51-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 71
 5-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 C-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 118
 18-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 14-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 68
 56-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 67
 12-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 66
 20-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 66
 31-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 66
 10-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 61
 44-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 61
 45-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 63
 26-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 63
 22-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 63
 7-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 63
 57-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 53-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 52-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 49-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 38-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 34-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 30-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 24-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 8-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64
 41-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 35-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 33-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 32-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 27-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 23-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 6-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 65
 B-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 117
 60-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 66
 58-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 66
 9-pfu -----CTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 51
 25-pfu AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT 64

1.53-WT TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 1049

A-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 180
 17-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 126
 51-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 131
 5-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 C-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 178
 18-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 14-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 128
 56-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 127
 12-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 126
 20-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 126
 31-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 126
 10-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 121
 44-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 121
 45-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 123
 26-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 123
 22-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 123
 7-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 123
 57-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 53-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 52-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 49-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 38-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 34-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 30-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 24-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 8-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124
 41-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 35-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 33-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 32-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 27-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 23-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 6-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 125
 B-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 177
 60-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 126
 58-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 126
 9-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 111
 25-pfu TCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAG 124

1.53-WT ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 1108

A-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 240
 17-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 186
 51-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 191
 5-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 C-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 238
 18-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 14-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 188
 56-pfu ACGTTCC-TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 187

12-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 186
 20-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 186
 31-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 186
 10-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 181
 44-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 181
 45-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 183
 26-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 183
 22-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 183
 7-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 183
 57-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 53-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 52-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 49-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 38-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 34-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 30-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 24-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 8-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184
 41-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 35-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 33-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 32-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 27-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 23-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 6-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 185
 B-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 237
 60-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 186
 58-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 186
 9-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 171
 25-pfu ACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA 184

1.53-WT GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 1168
 A-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 300
 17-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 246
 51-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 251
 5-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 244
 C-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 298
 18-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 244
 14-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 248
 56-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 247
 12-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 246
 20-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 246
 31-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 246
 10-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 241
 44-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 241
 45-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 243
 26-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 243
 22-pfu GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT 243

7-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 243
 57-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 53-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 52-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 49-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 38-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 34-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 30-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 24-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 8-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244
 41-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 35-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 33-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 32-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 27-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 23-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 6-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 245
 B-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 297
 60-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 246
 58-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 246
 9-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 231
 25-pfu GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTT 244

153 **GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 1228**
 A-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 360
 17-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 306
 51-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 311
 5-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 C-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 358
 18-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 14-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 308
 56-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 307
 12-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 306
 20-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 306
 31-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 306
 10-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 301
 44-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 301
 45-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 303
 26-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 303
 22-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 303
 7-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 303
 57-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 53-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 52-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 49-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 38-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 34-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 30-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304

24-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 8-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304
 41-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 35-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 33-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 32-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 27-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 23-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 6-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 305
 B-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 357
 60-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 306
 58-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 306
 9-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 291
 25-pfu GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA 304

1. 53-WT TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 1288

A-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 420
 17-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 366
 51-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 371
 5-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 C- pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 418
 18-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 14-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 368
 56-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 367
 12-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 366
 20-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 366
 31-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 366
 10-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 361
 44-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 361
 45-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 363
 26-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 363
 22-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 363
 7-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 363
 57-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 53-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 52-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 49-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 38-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 34-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 30-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 24-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 8-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364
 41-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365
 35-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365
 33-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365
 32-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365
 27-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365
 23-pfu TCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365

6-pfu TCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 365
 B-pfu TCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 417
 60-pfu TCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 366
 58-pfu TCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 366
 9-pfu TCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 351
 25-pfu TCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGATAACAACGAGTTGCGA 364

1.53-WT AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 1348

A-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 480
 17-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 426
 51-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 431
 5-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 C-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 478
 18-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 14-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 428
 56-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 427
 12-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 426
 20-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 426
 31-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 426
 10-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 421
 44-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 421
 45-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 423
 26-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 423
 22-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 423
 7-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 423
 57-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 53-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 52-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 49-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 38-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 34-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 30-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 24-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 8-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424
 41-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 35-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 33-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 32-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 27-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 23-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 6-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 425
 B-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 477
 60-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 426
 58-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 426
 9-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 411
 25-pfu AACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACT 424

1.53-WT **CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT** **1408**
A-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 540
17-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 486
51-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 491
5-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
C-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 538
18-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
14-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 488
56-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 487
12-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 486
20-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 486
31-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 486
10-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 481
44-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 481
45-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 483
26-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 483
22-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 483
7-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 483
57-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
53-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
52-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
49-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
38-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
34-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
30-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
24-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
8-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484
41-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
35-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
33-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
32-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
27-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
23-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
6-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 485
B-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 537
60-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 486
58-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 486
9-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 471
25-pfu CGACTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTT 484

1.53-WT **CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT** **1468**
A-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 600
17-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 546
51-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 551
5-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
C-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 598
18-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
14-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 548

56-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 547
 12-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 546
 20-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 546
 31-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 546
 10-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 541
 44-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 541
 45-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 543
 26-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 543
 22-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 543
 7-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 543
 57-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 53-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 52-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 49-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 38-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 34-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 30-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 24-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 8-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544
 41-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 35-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 33-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 32-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 27-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 23-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 6-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 545
 B-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 597
 60-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 546
 58-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 546
 9-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 531
 25-pfu CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTT 544

1. 53-WT GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 1528
 A- GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 660
 17-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 51-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 610
 5-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 603
 C- pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 658
 18-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 603
 14-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 608
 56-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 607
 12-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 606
 20-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 606
 31-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 606
 10-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 601
 44-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 601
 45-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 603
 26-pfu GGATAACCTTTTAGGAGTCCGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 603

22-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 603
 7-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 603
 57-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 53-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 52-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 49-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 38-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 34-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 30-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 24-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 8-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604
 41-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 35-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 33-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 32-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 27-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 23-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 6-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 605
 B-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 657
 60-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 606
 58-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 606
 9-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 590
 25-pfu GGATAACCTTTTTAGGAGTCCGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA 604

1. 53-WT ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 1572

A-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 709
 17-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 653
 51-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 658
 5-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 650
 C-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 710
 18-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 651
 14-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 656
 56-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 655
 12-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 654
 20-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 654
 31-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 654
 10-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 649
 44-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 649
 45-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 651
 26-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 651
 22-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 651
 7-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 651
 57-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 652
 53-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 652
 52-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 652
 49-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 652
 38-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 652
 34-pfu ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT 652

30-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	652
24-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	652
8-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	652
41-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
35-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
33-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
32-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
27-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
23-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
6-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	653
B-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	709
60-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	654
58-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	654
9-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	638
25-pfu	ACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT	652

7.5 Biosynthese von Cobalamin

Abbildung 7.5.1 gibt einen Überblick über die Biosynthese von Adenosylcobalamin. Dargestellt sind sowohl der aerobe als auch der anaerobe Syntheseweg. Die homologen Gene werden in Bakterien mit aerobem Syntheseweg nach *Pseudomonas denitrificans*, in Bakterien mit anaerobem Syntheseweg nach *Salmonella Typhimurium* benannt [Rodionov et al., 2003]. Die von der Cobyrynsäuresynthese katalysierte Reaktion ist markiert. Tetrapyrrolmethylasen sind an den Methylierungen zwischen (Cobalt-)Precorrin-2 und (Cobalt-)Precorrin-5 beteiligt. Die genaue Funktion der in *L. sanfranciscensis* identifizierten Tetrapyrrolmethylase konnte allein durch Homologien nicht näher vorausgesagt werden.

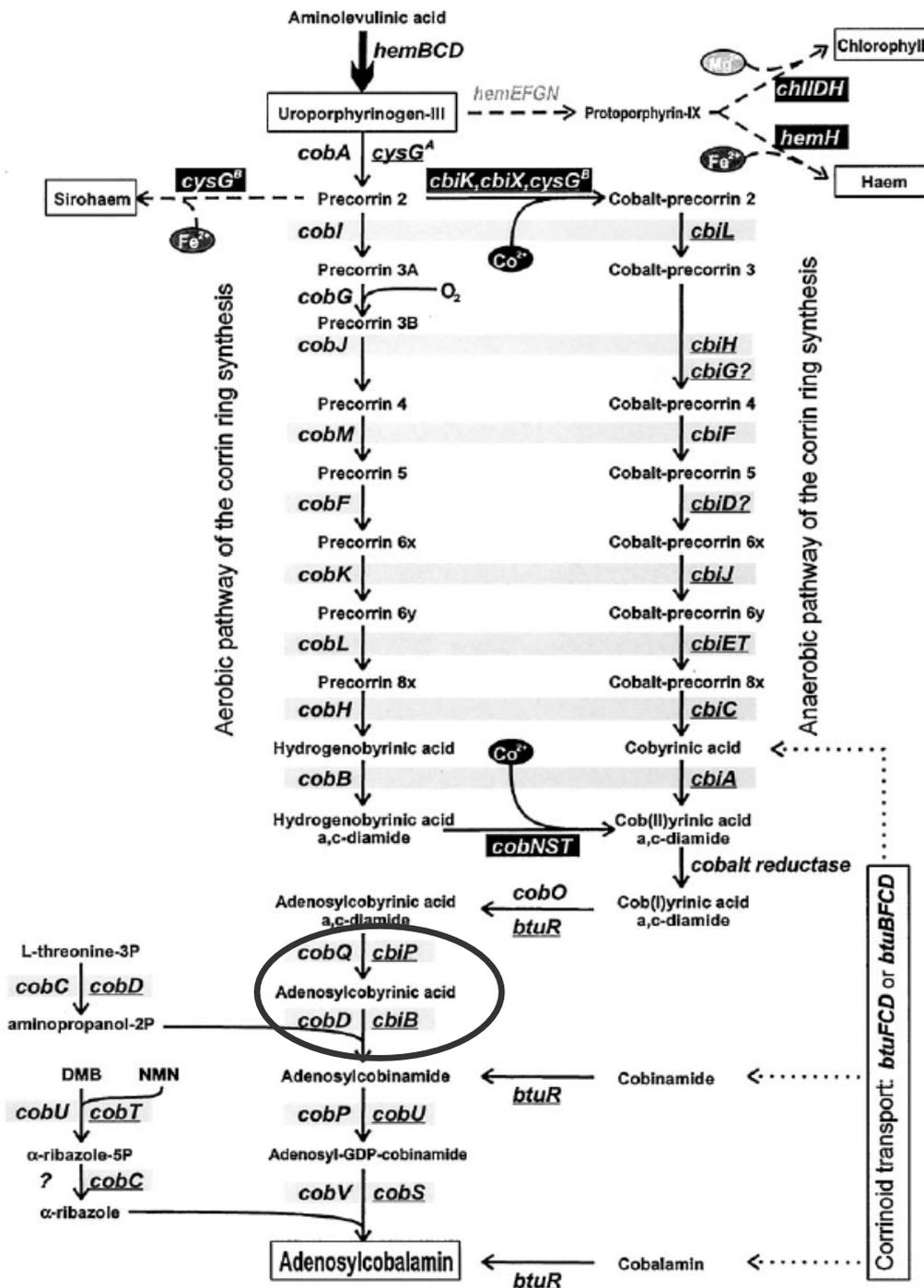


Abbildung 7.5.1: Aerober und anaerober Adenosylcobalaminbiosyntheseweg aus Rodionov et al.[2003]

Die Struktur der Cobalamine wird in Abbildung 7.5.2 dargestellt (vergleiche Abschnitt 4.2.1)

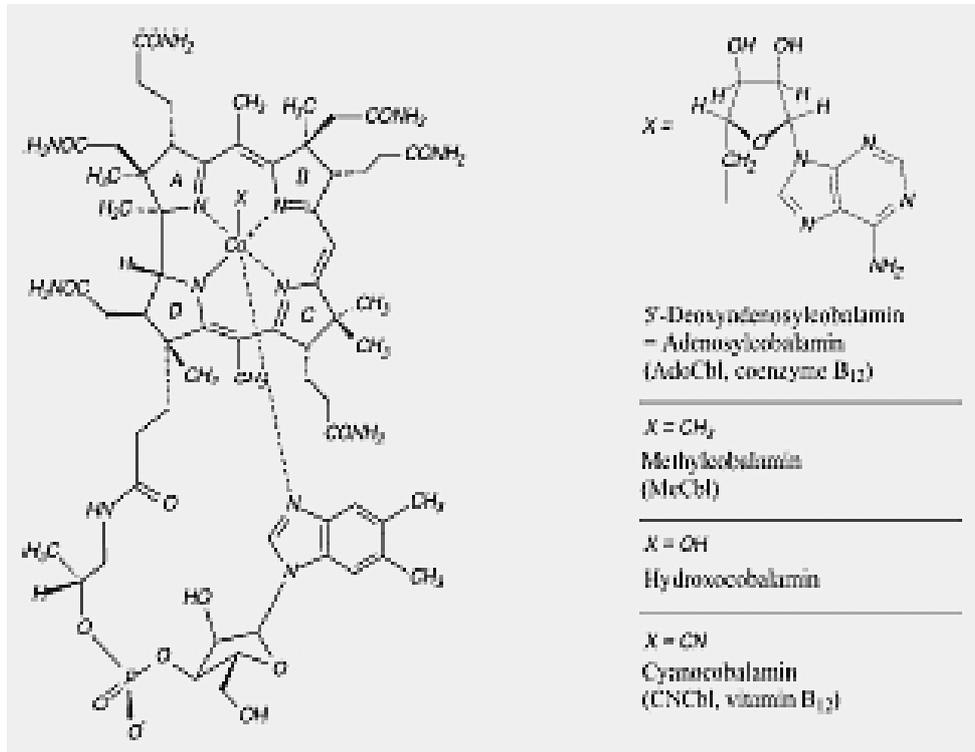


Abbildung 7.5.2 Struktur von Vitamin B₁₂. Unter dem Begriff Vitamin B₁₂ werden zahlreiche Mitglieder der Cobalamingruppe zusammengefasst. Adenosyl-, Hydroxy- und Methyl-Cobalamin sind natürliche Formen, Cyanocobalamin ist die industriell hergestellte und stabilste Form (Martens et al., 2002).

LEBENS LAUF

Melanie Pavlovic

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 05.11.1978
Geburtsort: Dannenberg/ Elbe
Familienstand: verheiratet

SCHULBILDUNG

1985-1989 Grundschule in Hitzacker

1989-1991 Orientierungsstufe an der Bernhard-Varenus-Schule in Hitzacker

1991-1998 Fritz-Reuter-Gymnasium in Dannenberg/Elbe mit Abschluß Abitur
 (Note: gut bestanden)

STUDIUM UND PROMOTION

10/1998-07/2002 Studium der Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel an der
Technischen Universität München mit Abschluß als Diplom-Ingenieurin
(Note: mit Auszeichnung bestanden)

Thema der Diplomarbeit:
„Der Saccharosestoffwechsel von *Lactobacillus sanfranciscensis*“

seit 08/2002 Promotion am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen
Universität München