



# *UFZ-Bericht*

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 22/2000

Dissertation

---

**Molekulare Mechanismen der  
Resistenz von Bakterien gegenüber  
Xenobiotika**

---

Dirk Benndorf

ISSN 0948-9452

# **Molekulare Mechanismen der Resistenz von Bakterien gegenüber Xenobiotika**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie  
der Universität Leipzig  
genehmigte

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von Dipl.-Biochemiker Dirk Benndorf,  
geboren am 14.03.1972 in Leipzig.

Dekan: Prof. M. Schlegel

Gutachter: Prof. W. Babel  
Prof. M. Hecker  
Prof. H.-P. Kleber

Tag der Verteidigung: 16.06.2000

## Bibliographische Beschreibung

Benndorf, Dirk

### Molekulare Mechanismen der Resistenz von Bakterien gegenüber Xenobiotika

Universität Leipzig, Dissertation

96 S., 123 Lit., 65 Abb., 23 Tab.

#### Referat

Bakterien sind in der Lage, Schadstoffe anthropogenen Ursprungs abzubauen. Dabei ist die Geschwindigkeit der Detoxifizierung häufig gering, weil die Bakterien selbst der toxischen Wirkung der Xenobiotika ausgesetzt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, sowohl die Mechanismen der Toxizität von Xenobiotika als auch die Mechanismen, die zur Ausbildung einer Resistenz führen, zu erkennen.

Da Bakterien auf die Einwirkung verschiedener Umwelteinflüsse mit der Synthese sogenannter „Streßproteine“ antworten, wurde mit Hilfe der Methode der zweidimensionalen Elektrophorese untersucht, ob Schadstoffabbauer auf Xenobiotika ebenfalls mit der Synthese von Proteinen antworten. Als Modellorganismus wurde *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V ausgewählt, der Modellsubstanzen wie primären Alkoholen und Phenol und Catechol ausgesetzt wurde. Dabei waren sie sowohl Wachstumssubstrat als auch Stressor während des Wachstums auf Acetat. Ihre Einwirkung führte zur Induktion von Proteinen, die durch Mustervergleich oder Nachweis einzelner Proteine folgenden Antworten zugeordnet wurden: der Hitzeschockantwort, der Antwort auf oxidativen Streß, der Stationären-Phase und den abbauenden Enzymen. In Abhängigkeit von der chemischen Struktur der Modellsubstanzen unterschied sich das Potential zur Induktion der einzelnen Antworten. Lipophile Substanzen wie primäre Alkohole und Phenol verursachten verstärkt die Induktion der Hitzeschockproteine, die denaturierte Proteine wiederherstellen oder proteolytisch abbauen. In diesem Zusammenhang wurde die cytoplasmatische Membran als ein Target erkannt. Die Änderung ihrer Fluidität könnte ein weiteres Signal zur Induktion der Hitzeschockantwort sein. Reaktive Substanzen wie Catechol, die eine Bildung von Sauerstoffradikalen in der Zelle hervorrufen, induzieren verstärkt Proteine der Antwort auf oxidativen Streß, die diese Radikale entgiften. Während die Stationäre-Phase-Antwort kaum einen Beitrag zur Resistenz gegenüber den Modellsubstanzen leistet, könnte die verstärkte Induktion der Catechol-1,2-dioxygenase während des Wachstums auf hohen Phenolkonzentrationen die Geschwindigkeit seiner Oxidation beschleunigen.

Die Ergebnisse bieten erste Lösungsansätze wie die Stabilität schadstoffabbauender Bakterien erhöht werden könnte. Gleichzeitig ermöglichen sie mit Hilfe immunologischer Methoden die Nutzung einzelner Proteine als Biomarker für Chemostreß.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Wirkung und Targets von Xenobiotika	1
1.2 Die Fähigkeit zur Detoxifizierung von Xenobiotika als ein Resistenzmechanismus	2
1.3 Antwort von Bakterien gegenüber Problemstoffen	3
1.3.1 Die Hitzeschockantwort als ein Resistenzmechanismus	4
1.3.2 Die Antworten auf oxidativen Streß und DNA-Schädigung als Resistenzmechanismen	7
1.3.3 Die Stationäre-Phase-Antwort und die Ausbildung von Resistenzen	9
1.3.4 Die Streßantwort als ein Netzwerk vieler Mechanismen	10
1.4 Methoden zur Analyse der Streßantwort	10
1.5 Problemstellung	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Mikroorganismen	13
2.1.1 Batch-Kultivierung und Streßversuche	13
2.1.2 Kontinuierliche Kultivierung im Chemostat	13
2.1.3 Kontinuierliche Kultivierung nach dem Nutristatprinzip	14
2.1.4 Bestimmung der Biomassekonzentration	15
2.2 Probenvorbereitung	15
2.2.1 Zellgewinnung und Zellaufschluß	15
2.2.2 Proteinbestimmung	16
2.3 Trennung und Nachweis von Proteinen mit elektrophoretischen Methoden	16
2.3.1 Isoelektrische Fokussierung	16
2.3.1.1 Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten	16
2.3.1.2 Isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten	17
2.3.2 SDS-Elektrophorese	18
2.3.3 Nativelektrophorese und Aktivfärbung der Katalase	19
2.3.4 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen	19
2.3.5 Blottechniken	19
	I

2.3.5.1	Westernblot von Proteinen	19
2.3.5.2	Dot-Blot von Proteinen	20
2.3.6	Färbung von Proteinen	20
2.3.6.1	Coomassiefärbung	20
2.3.6.2	Silberfärbung	20
2.3.6.3	Ponceau S Färbung	21
2.3.6.4	Immunfärbung	21
2.3.7	Trocknung der Gele	22
2.4	Auswertung von Proteinmustern	22
2.4.1	Bildaufnahme	22
2.4.2	Auswertung eindimensionaler Gele	23
2.4.3	Auswertung zweidimensionaler Gele	23
2.4.4	Auswertung von Dot-Blots	25
2.5	N-terminale Sequenzierung von Proteinen und Datenbankrecherche	25
2.6	Messung von physiologischen Parametern	26
2.6.1	Bestimmung der Überlebensrate gegenüber lethalem Streß	26
2.6.2	Messung der Katalase	26
2.6.3	Messung der Atmungsraten	26
2.6.4	Messung der ATP-Synthese	26
2.7	Chemikalien	27

### **3 Ergebnisse** **28**

3.1	Nachweis von Proteinen in zweidimensionalen Proteinmustern	28
3.1.1	Nachweis von Proteinen durch Mustervergleich	28
3.1.2	Nachweis von Proteinen durch N-terminale Sequenzierung	29
3.1.3	Nachweis von Proteinen durch spezifische Bindung polyklonaler Antikörper	32
3.1.3.1	Einsatz kommerzieller polyklonaler Antikörper zum Nachweis der Proteinen GroEl und DnaK	32
3.1.3.2	Herstellung und Einsatz polyklonaler Antikörper zum Nachweis der Proteine ClpB und AhpC	34
3.2	Einfluß von Chemikalien und von Temperaturerhöhung auf die Wachstumsrate, Atmungsrate und ATP-Synthese von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	37
3.3	Antwort von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf Chemostreß in Anwesenheit von Xenobiotika	39
3.3.1	Einfluß von primären Alkoholen und Temperaturerhöhung	39
3.3.1.1	Einfluß auf das Wachstum	39
3.3.1.2	Einfluß auf die Proteinmuster	40
3.3.1.3	Einfluß von Ethanol und Butanol auf die Synthese von Hitzeschockproteinen	45

3.3.2	Einfluß von Phenol, Catechol, Wasserstoffperoxid und Temperaturerhöhung	48
3.3.2.1	Einfluß auf das Wachstum	48
3.3.2.2	Einfluß auf die Proteinmuster	48
3.3.2.3	Einfluß auf die Aktivität der Katalase	53
3.3.2.4	Einfluß auf die Resistenz gegenüber letalen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Konzentrationen	54
3.4	Antwort von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf Chemostreß während des Wachstums auf Xenobiotika	55
3.4.1	Wachstum auf primären Alkoholen	55
3.4.1.1	Einfluß der Ausgangskonzentration auf das Wachstum	55
3.4.1.2	Einfluß der Ausgangskonzentration auf die Proteinmuster	55
3.4.1.3	Einfluß der Ausgangskonzentrationen auf die Induktion der Katalase	59
3.4.2	Wachstum auf Phenol	59
3.4.2.1	Batchkultivierung	59
3.4.2.1.1	Einfluß der Ausgangskonzentration auf das Wachstum	59
3.4.2.1.2	Einfluß auf die Aktivität der Katalase	61
3.4.2.2	Kontinuierliche Kultivierung im Chemostat	62
3.4.2.2.1	Einfluß der Durchflußrate auf die Restkonzentration von Phenol	62
3.4.2.2.2	Einfluß der Durchflußrate auf die Katalaseaktivität	62
3.4.2.3	Kontinuierliche Kultivierung im Nutristat	63
3.4.2.3.1	Einfluß der Phenolkonzentration auf das Wachstum	63
3.4.2.3.2	Einfluß der Phenolkonzentration auf Proteinmuster	64
3.4.2.3.3	Einfluß der Phenolkonzentration auf die Aktivität der Katalase	69
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	Die Antwort auf Chemikalienstreß in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	70
4.2	Die Antwort auf Hitzeschock als Schutz gegen hydrophobe Substanzen	70
4.2.1	Die Antwort auf Hitzeschock von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	70
4.2.2	Die Induktion von Hitzeschockproteinen durch hydrophobe Chemikalien als Resistenzmechanismus	71
4.3	Die Antwort auf oxidativen Streß als Schutz gegen reaktive Substanzen	74
4.3.1	Die Antwort von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf oxidativen Streß	74
4.3.2	Die Induktion von Proteinen der Antwort auf oxidativen Streß durch reaktive Chemikalien als Resistenzmechanismus	76
4.4	Der produktive Abbau als Vorwärtsstrategie für Wachstum und Vermehrung	78
4.4.1	Der Nachweis von Enzymen des produktiven Abbaus von Chemikalien	78
4.4.2	Die Induktion abbauender Proteine als Resistenzmechanismus	78
4.5	Entwicklung einer generellen Resistenz beim Eintritt in die Stationäre-Phase	79
4.5.1	Der Nachweis der Stationäre-Phase-Katalase	79
4.5.2	Induktion der Stationären-Phase-Antwort als Resistenzmechanismus	80

4.6	Das Vielfalt der Mechanismen von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> als Antwort auf die Einwirkung von Chemikalien	80
4.7	Proteine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> als Biomarker für Chemostreß	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\sigma$	Sigmafaktor der RNA-Polymerase
$\mu$	Wachstumsrate
$\mu$ l	Mikroliter
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
C-terminal	Aminoterminales Ende eines Peptides/Proteins
D	Durchflußrate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
ELISA	Enzymimmunoassay
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie IPG
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
KBE	Kolonien bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger-RNA
Mw	Molekulargewicht
NAD(H)	Nicotinadenindinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinadenindinucleotid(-2`-phosphat) (reduziert)
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminales Ende eines Peptides/Proteins
OD	optische Dichte
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
s	Substratkonzentration
s <sub>0</sub>	Substratkonzentration im Zulauf
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTBS	TBS mit Tween 20
U	Umdrehungen oder Unit (Einheit der Enzymaktivität [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ])
V	Volt

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell der Faltung von Proteinen durch die Chaperone nach Thomas et al. (1997)	5
Abb. 2: Regulation der Synthese der Hitzeschockproteine des $\sigma^{32}$ -Regulons nach Yura und Nakahigashi (1999)	6
Abb. 3: Enzymatische Entgiftung von reaktiven Sauerstoffverbindungen	8
Abb. 4: Induktion des soxRS-Regulons nach Weiss (1998).	8
Abb. 5: Schema des experimentellen Aufbaus des Nutristats	14
Abb. 6: Schritte bei der Auswertung und beim Vergleich zweidimensionaler Proteinmuster mit der Phoretix 2D Full Software	24
Abb. 7: Berechnung der Verstärkung eines Proteins	25
Abb. 8: Berechnung der ATP-Konzentration unter Berücksichtigung eines internen ATP-Standards (Lundin und Thore 1975)	27
Abb. 9: Identifizierung der durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzierten Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern.	28
Abb. 10: Identifizierung der stationären Phase-Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern.	28
Abb. 11: Westernblot eines präparativen zweidimensionalen Gels.	32
Abb. 12: Immunfärbung von GroEl und DnaK nach SDS-Elektrophorese zellfreier Extrakte von <i>Escherichia coli</i> B421, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V und <i>Pseudomonas putida</i> B342.	33
Abb. 13: Immunfärbung von GroEl in Westernblots zweidimensionaler Gele von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	33
Abb. 14: Immunfärbung von DnaK in Westernblots zweidimensionaler Gele von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	34
Abb. 15: Dot-Blot zellfreier Extrakte von <i>Escherichia coli</i> B421, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V mit anschließender Immunfärbung.	34
Abb. 16: Immunfärbung zum Nachweis der Proteine ClpB (A) und AhpC (B) von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V mit in Kaninchen hergestellten anti-Seren in eindimensionalen Proteinmustern.	35
Abb. 17: Immunfärbung von AhpC in Westernblots zweidimensionaler Gele von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	36
Abb. 18: Hemmung des Wachstums auf Acetat, der Atmung und der ATP-Synthese von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> durch Xenobiotika.	38
Abb. 19: Hemmung des Wachstums von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf Acetat durch primäre Alkohole und Temperaturerhöhung.	39

Abb. 20: Berechnung des Verteilungskoeffizienten primärer Alkohole zwischen Membran und Puffer. (Sikkema et al., 1994).	39
Abb. 21: Induktion von Proteinen durch primäre Alkohole und Temperaturerhöhung in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	40
Abb. 22: Generell (blau), dreifach (grün), zweifach (gelb) und spezifisch (weiß) induzierte Proteine in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von primären Alkoholen.	41
Abb. 23: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat (Kontrolle).	42
Abb. 24: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation bei 45 °C.	43
Abb. 25: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation mit 5 % Ethanol.	43
Abb. 26: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation mit 0,8 % Butanol.	44
Abb. 27: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation mit 0,1 % Hexanol.	44
Abb. 28: Dot-Blot mit anschließender Immunfärbung der Hitzeschockproteine GroEl und DnaK.	45
Abb. 29: Messung der Verstärkung der Hitzeschockproteine GroEl und DnaK von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von Ethanol und nach Temperaturerhöhung im Dot-Blot.	46
Abb. 30: Induktion von Hitzeschockproteinen durch gemeinsame Einwirkung von Ethanol und Temperaturerhöhung in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	46
Abb. 31: Induktion des Proteins HtpG (High temperature protein G) von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> durch Ethanol und Temperaturerhöhung.	47
Abb. 32: Induktion der Hitzeschockproteine GroEl und Dank von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von Butanol und Ethanol.	47
Abb. 33: Hemmung des Wachstums von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf Acetat durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Catechol, Phenol oder eine Temperaturerhöhung.	48
Abb. 34: Induktion von Proteinen durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Catechol, Phenol und Temperaturerhöhung in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	49
Abb. 35: Generell (blau), dreifach (grün), zweifach (gelb) und spezifisch (weiß) induzierte Proteine in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von Phenol, Catechol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Temperaturerhöhung.	50
Abb. 36: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat (Kontrolle).	51

Abb. 37: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Einwirkung von 6 x 0,15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	51
Abb. 38: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Einwirkung von 14 mM Catechol.	52
Abb. 39: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Einwirkung von 14 mM Phenol.	52
Abb. 40: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation bei 45 °C.	53
Abb. 41: Aktivfärbung zum Nachweis von Katalase nach nativer Elektrophorese von zellfreien Extrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	54
Abb. 42: Resistenz von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> gegenüber 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	54
Abb. 43: Wachstum von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf Ethanol und Butanol	55
Abb. 44: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf 0,2 % Ethanol.	57
Abb. 45: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf 4 % Ethanol.	57
Abb. 46: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf 0,05 % Butanol.	58
Abb. 47: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf 0,4 % Butanol.	58
Abb. 48: Aktivfärbung der Katalase nach nativer Elektrophorese von Rohextrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf primären Alkoholen.	59
Abb. 49: Wachstum von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf verschiedenen Phenolkonzentrationen als Kohlenstoff- und Energiequelle	60
Abb. 50: Hemmung des Wachstums von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf Phenol.	60
Abb. 51: Formel nach Haldane	60
Abb. 52: Phenolatmung von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> in Abhängigkeit von der Phenolkonzentration	61
Abb. 53: Aktivfärbung der Katalase nach nativer Elektrophorese von zellfreien Extrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase.	62
Abb. 54: Ausschnitte aus zweidimensionalen Proteinmustern von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach kontinuierlicher Kultivierung im Chemostat.	63
Abb. 55: Durchflußrate und Phenolkonzentration während der kontinuierlichen Kultivierung von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach dem Nutristatprinzip.	63
Abb. 56: Phenolatmung von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Kultivierung auf Phenol im Chemostat und im Nutristat	64

Abb. 57: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Acetat im Chemostat (Kontrolle).	65
Abb. 58: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Phenol im Chemostat.	66
Abb. 59: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Phenol im Chemostat (Kontrolle).	66
Abb. 60: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach 1 h Wachstum auf 7,5 mM Phenol im Nutristat.	67
Abb. 61: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach 4 h Wachstum auf 7,5 mM Phenol im Nutristat.	67
Abb. 62: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach 24 h Wachstum auf 7,5 mM Phenol im Nutristat.	68
Abb. 63: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf 18,5 mM Phenol im Nutristat.	68
Abb. 64: Aktivfärbung der Katalase nach nativer Elektrophorese von zellfreien Extrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	69
Abb. 65: Streßinduzierbare Proteine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	83

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Spannungsprogramm für die isoelektrische Fokussierung von Proteinen in Immobiline Dry Strips	17
Tab. 2:	Protokoll zur Herstellung und Durchführung der modifizierten Silberfärbung nach Blum et al. (1987).	21
Tab. 3:	Lösungen zur Immunfärbung mit dem Immun-Blot Assay Kit (Bio-Rad)	22
Tab. 4:	Protokoll zur Immunfärbung mit dem Immun-Blot Assay Kit (Bio-Rad)	22
Tab. 5:	Einstellungen und der Software MagicScan 4.1 bei der Bildaufnahme mit dem Flachbettscanner (Powerlook 2000, Umax)	23
Tab. 6:	Liste der Chemikalien und der Hersteller	27
Tab. 7:	Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der Katalasen von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> und <i>Escherichia coli</i> in zweidimensionalen Proteinmustern.	29
Tab. 8:	N-terminale Aminosäuresequenzen von Hitzeschockproteinen.	30
Tab. 9:	N-terminale Aminosäuresequenzen durch oxidativen Streß induzierbarer Proteine.	31
Tab. 10:	N-terminale Aminosäuresequenzen von degradativer und kontitutiver Proteine.	31
Tab. 11:	N-terminale Proteinsequenzen der Proteine ClpB und AhpC und die zur Herstellung von Antikörpern ausgewählten Peptidsequenzen.	35
Tab. 12:	Membrankonzentration primärer Alkohole, Wachstumshemmung und Menge des 72 kDa Proteins (siehe 3.3.1.2) von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von primären Alkoholen und Temperaturerhöhung	40
Tab. 13:	Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von primären Alkoholen und Temperaturerhöhung.	42
Tab. 14:	Einfluß der Konzentration von Ethanol auf die Synthese von Hitzeschockproteinen in <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	45
Tab. 15:	Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Einwirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Catechol, Phenol und Temperaturerhöhung.	50
Tab. 16:	Spezifische Aktivität und Verstärkungsfaktoren der Katalase in zellfreien Extrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	53
Tab. 17:	Neue und verstärkte Proteine nach Wachstum von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> auf hohen Konzentrationen primärer Alkohole	56
Tab. 18:	Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf primären Alkoholen.	56
Tab. 19:	Spezifische Aktivität und Verstärkungsfaktoren der Katalase in Rohextrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf primären Alkoholen	59
Tab. 20:	Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Katalase in zellfreien Extrakten von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> vom Wachstumssubstrat und der Wachstumsphase	61

Tab. 21: Spezifische Aktivität und Anteil der Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern nach Kultivierung von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> im Chemostat auf Acetat oder Phenol.	62
Tab. 22: Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> nach Wachstum auf Phenol im Nutristat.	65
Tab. 23: Aktivität der Katalase und Phenolkonzentration nach Kultivierung von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> im Nutristat	69

# 1 Einleitung

Mikroorganismen attackieren ein großes Spektrum an anorganischen und organischen Substanzen. Chemoorganoheterotrophe Organismen oxidieren biogene Organika unter Konservierung biologisch verwertbarer Energie und nutzen diese zur Erhaltung zelleigener Substanz. Xenobiotika, organische Problemstoffe anthropogenen Ursprungs werden ebenfalls durch Mikroorganismen angegriffen. Dabei werden die Xenobiotika je nach enzymatischer Ausstattung durch Cometabolismus/Cooxidation transformiert oder mineralisiert. Diese Prozesse können zur Entgiftung der Xenobiotika führen, wobei es unter Umständen auch zur Akkumulation von toxischeren Zwischen- oder Endprodukten kommen kann. Die Assimilation des organischen Kohlenstoffs von Xenobiotika kann zum Wachstum und zur Vermehrung der Destruenten führen. Häufig ist die Geschwindigkeit des Abbaus von Xenobiotika verglichen mit der biogener Organika sehr gering. Eine Ursache ist neben der geringen Menge an aktiver Biomasse (Katalysator) die geringe Bioverfügbarkeit, das heißt die langsame Abgabe der Substanzen von einer Matrix (z. B. Boden) oder die geringe Löslichkeit der Xenobiotika in Wasser. Zum anderen inhibieren Xenobiotika Zellprozesse, so auch die Schritte ihrer Oxidation und Assimilation selbst. Beide Tatsachen gemeinsam erklären, warum außerhalb dieses kleinen Konzentrationsbereiches, zwischen Substratmangel und Substratüberschußhemmung, nur eine langsame Entgiftung von Xenobiotika beobachtet wird. Man nimmt an, daß Mikroorganismen für solche Bedingungen ebenso wie zur Antwort auf weitere abiotische und biotische Umwelteinflüsse Mechanismen besitzen, die ihnen eine Adaptation ermöglichen. Die Kenntnis der Targets von Xenobiotika und die Charakterisierung von Mechanismen, die zur Resistenzhöhung beitragen, bieten Lösungsansätze zur Erweiterung der Leistungsgrenzen von Schadstoffabbauern, was die Optimierung von biologischen Sanierungsprozessen unterstützt. Von besonderem Interesse ist, wie bisher bekannte Mechanismen der Adaptation von Mikroorganismen an die Änderung von Milieubedingungen zur Resistenz beitragen und ob zusätzliche für Xenobiotika spezifische Mechanismen der Antwort gegenüber Xenobiotika existieren.

## 1.1 Wirkung und Targets von Xenobiotika

Xenobiotika sind Substanzen, deren chemische Strukturen sich von denen biogener Organika unterscheiden. Diese fremden Strukturen können die Inhibierung von Lebensprozessen verursachen. Die halbmaximale Hemmung der Wachstumsrate von Organismen durch Xenobiotika (Bryant und Schultz, 1994) gemessen als EC50 Wert, dient als ein Maß für ihre Toxizität. Um die Wirkung von Xenobiotika zu beschreiben, wurden ausgehend von solchen experimentellen Ergebnissen quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen entwickelt, die zeigen, daß die Hydrophobizität und die Reaktivität die Toxizität einer Substanz maßgeblich beeinflussen.

Mit zunehmender Hydrophobizität einer Substanz, die durch den physikochemischen Parameter  $\log P_{Ok\ tan\ ol / Wasser}$  (Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser) beschrieben werden kann, nimmt ihre Toxizität zu (Bryant und Schultz, 1994). Viele Verbindungen gehen wegen ihrer lipophilen Eigenschaften Wechselwirkungen mit Biomolekülen und biologischen Strukturen ein, deren Funktion dadurch beeinträchtigt wird. Die Wirkung von lipophilen, membranaktiven Substanzen führt zur Aufhebung der Barrierefunktion von Lipidmembranen sowohl für intrazelluläre Metabolite als auch für Substanzen in der Umgebung und wird zum Beispiel gezielt genutzt, um Zellen für die Messung intrazellulärer Enzyme zu permeabilisieren (De Smet et al., 1978).

Die Reaktivität ist ein Maß für die Fähigkeit einer Verbindung, Biomoleküle kovalent zu modifizieren. Die hervorgerufenen Veränderungen sind meistens irreversibel. Die Reaktivität eines Xenobiotikums nimmt oft mit seiner Polarität zu (Bryant und Schultz, 1994).

Viele Zellkompartimente sind von der Wirkung der Xenobiotika betroffen. Die Ermittlung von Parametern wie der Wachstumshemmung erlaubt keine Differenzierung der Wirkung von Xenobiotika hinsichtlich der Targets. Der Leuchtbakterientest (Hermens et al. 1985), der die Löschung der Biolumineszenz von *Photobacterium phosphoreum* als Maß für Toxizität mißt, und Dehydrogenasetests (Strotmann et al., 1993) sind besser geeignet, die Wirkung von Xenobiotika auf eine einzelne Zellkomponente, den Elektronentransport, zu quantifizieren. Die parallele Analyse mehrerer Parameter wie zum Beispiel der Atmung und der ATP-Synthese (Loffhagen et al., 1997) ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung der entkoppelnden Wirkung schwacher organischer Säuren.

Die toxische Wirkung einiger Xenobiotika könnte außerdem in ihrer Funktion als spezifische Inhibitoren oder Modulatoren zellulärer Funktionen bestehen, wie es auch von Antibiotika und Pharmazeutika bekannt ist.

## **1.2 Die Fähigkeit zur Detoxifizierung von Xenobiotika als ein Resistenzmechanismus**

Der Abbau von Xenobiotika kann als aktiver Abwehrmechanismus betrachtet werden, denn er ermöglicht die Reduzierung ihrer Konzentration. Das Vermögen von Mikroorganismen zum Abbau von Xenobiotika ist weit verbreitet (Cork und Krueger, 1991). Abbauer können sowohl aus "sauberen" als auch aus kontaminierten Ökosystemen isoliert werden. Zum Spektrum der von ihnen attackierten Substanzen gehören verschiedene Stoffklassen wie Alkane, Alkene, mono- und polycyclische Heterocyclen und Aromaten. Mit zunehmender Komplexizität der Struktur wie bei polycyclischen oder mehrfach verzweigt-kettigen Systemen sowie in Abhängigkeit von der Art und der Zahl der Substituenten nimmt die Geschwindigkeit der biokatalytischen Konversion ab (Knackmus, 1997). Einzelne Xenobiotika können nur von Mischkulturen vollständig abgebaut werden. Jeder beteiligte Mikroorganismus katalysiert nur einen oder mehrere Teilschritte des Abbaus, die zur Mineralisierung der Substanz führen (Knackmus, 1997). Die genetische Information für die katabolen Stoffwechselwege ist sowohl im Chromosom als auch in Plasmiden der

Mikroorganismen gespeichert und wird bei der Vermehrung der Mikroorganismen weitergegeben. Die meisten degradativen Enzyme sind nicht konstitutiv vorhanden, sondern werden erst in Gegenwart von Xenobiotika und bei Mangel anderer, leichter verwertbarer Substrate induziert. Einige Mikroorganismen sind in der Lage, in Abhängigkeit von der Konzentration eines Xenobiotikums zwei verschiedene Abbausequenzen zu induzieren. So lassen sich zum Beispiel bei *Ralstonia eutropha* mehrere Wege der Spaltung des aromatischen Ringes von Phenol bezüglich ihrer Geschwindigkeit und Affinität (Müller und Babel, 1996, Müller et al., 1997) unterscheiden, deren Ausprägung eine Form der Adaptation ist.

### 1.3 Antwort von Bakterien gegenüber Problemstoffen

In den vergangenen Jahren wurde die Wirkung von verschiedenen Chemikalien, unter ihnen auch Xenobiotika, auf Bakterien untersucht. Neben der Analyse ihrer inhibierenden Wirkung auf Wachstum und Vermehrung sowie auf einzelne zelluläre Prozesse stand die Frage im Mittelpunkt, inwieweit Bakterien mit der Ausbildung von Mechanismen antworten, die sie befähigen, sich zu erwehren. Basierend auf dem Wissen, daß Ethanol oder Dinitrophenol die Hitzeschockantwort induzieren, wurde erwartet, daß auch andere Substanzen die Induktion von Hitzeschockproteinen verursachen. Tatsächlich konnte in *Escherichia coli* gezeigt werden, daß zu den Proteinen, die in Antwort auf Chemikalien induziert wurden, neben Hitzeschockproteinen auch Proteine anderer durch Stress induzierbarer Regulons wie oxidativer Stress und SOS Antwort gehören (VanBogelen et al., 1987). Die Analyse von Mutanten mit erhöhter Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln zeigte einen erhöhten Anteil einer durch das Gen *acrAB* kodierten Multidrug-Effluxpumpe. Die Transkriptionsfaktoren MarA, SoxS und RobA sind in ihre Regulation involviert (White et al., 1997).

Als Antwort auf die umweltrelevanten Schadstoffe Benzene, Cadmiumchlorid, Chlorpyrifos, 2,4-Dichloranilin, Dioctylphthalat, Hexachlorbenzene, Pentachlorphenol, Trichlorethylen und Tetrapropylbenzoesulfonat (Blom et al., 1992) konnten in *Escherichia coli* auch Proteine, die zur Hungerstreßantwort gehören, nachgewiesen werden. Diese Arbeit zeigte aber gleichzeitig, daß ein großer Anteil der induzierten Proteine nicht zu bekannten durch Streß induzierbaren Regulons gehört und darüber hinaus mehr als 50% der Proteine spezifisch durch nur eine Chemikalie induziert wurden. Trotz des hohen Anteils nicht identifizierter oder spezifischer Proteine konzentrieren sich viele vorliegende Veröffentlichungen auf die Analyse der Regulation bereits bekannter Mechanismen.

Transkriptionsanalysen mit Hilfe Genfusionen von Sigmafaktor  $\sigma^{32}$  (Van Dyk et al., 1995) oder Transkriptionsfaktor OxyR (Belkin et al., 1996) abhängigen Promotoren oder Gene mit den Luxgenen belegen die Induktion von Hitzeschock- und oxidativen Streßproteinen durch vielzählige Chemikalien wie Schwermetalle, Phenolderivate, anorganische und organische Peroxide sowie Ethanol. Beide Arbeiten zeigen außerdem, daß Gemische von Chemikalien nicht nur additiv, sondern oft auch synergistisch wirken können. Besonders der synergistische Effekt von Ethanol auf die durch Chemikalien induzierten Antworten auf Hitzeschock oder auf

oxidativen Streß erhöht die Empfindlichkeit der angewandten Testsysteme (Van Dyk et al., 1995, Belkin et al., 1996).

Die Kenntnisse zur Antwort von Bakterien auf Streß sind ziemlich umfangreich. Trotzdem beschränken sie sich vor allem auf Bakterien, welche von medizinischer Bedeutung als Krankheitserreger sind. Ihre Pathogenität wird oft durch ihre Fähigkeit zur Antwort auf Streß (Rafie-Kolpin et al., 1996), induziert durch die Wirkung der Immunabwehr des Wirtes oder von Medikamenten wie Antibiotika, bestimmt. Um einen Einblick in Resistenzmechanismen von Schadstoffabbauern gegenüber Xenobiotika zu erhalten, ist es deshalb notwendig, ihr Verhalten gegenüber Xenobiotika selbst zu analysieren. Obwohl die Stoffwechselwege der Assimilation des Kohlenstoffskeletts und der Mineralisierung von Xenobiotika oft bekannt sind, weiß man relativ wenig über Strategien, wie sich Bakterien der toxischen Wirkung von Xenobiotika auf ihren Umsatz selbst und andere Prozesse der Zelle erwehren. Wie erwartet, reagieren Schadstoffabbauer auch auf physikalische Einflüsse wie die Erhöhung der Temperatur (Givskov et al., 1994) und die Gegenwart von Xenobiotika wie 2-Chlorphenol (Lupi et al., 1995), Trichlorethylen (Uchiyama et al., 1999) und Toluol (Vercellone-Smith und Herson, 1997) mit der Synthese von Proteinen. Einige Proteine konnten bekannt werden durch Streß induzierbaren Regulons wie der Antwort auf Hitzeschock, der stationären-Phase-Antwort und oxidativen Streß zugeordnet werden. Die Induktion von Hungerstreßproteinen während des Wachstums auf einem Xenobiotikum, das in inhibierenden Konzentrationen vorliegt, legt nahe, daß diese Antwort zur Adaptation beitragen könnte. Die molekularen Mechanismen sind für diesen konkreten Fall unbekannt (Vercellone-Smith und Herson, 1997).

### **1.3.1 Die Hitzeschockantwort als ein Resistenzmechanismus**

Die am besten untersuchte Antwort von Mikroorganismen ist die Antwort auf einen physikalischen Stressor, die Wärme. Der Hitzeschock ist eine Erhöhung der Temperatur auf einen Wert oberhalb des Optimums. Zuerst wurde sie in der Fruchtfliege *Drosophila busckii* durch die Bildung von spezifischen *puffs* (Ausstülpungen) in den Riesenchromosomen entdeckt (Ritossa, 1962). Zehn Jahre später konnte die Synthese von sogenannten Hitzeschockproteinen nachgewiesen werden, die mit einer drastischen Verringerung der Synthese der meisten anderen Zellproteine einhergeht (Tissieres et al., 1974). Hitzeschockproteine weisen in allen bisher untersuchten Organismen, vom Säugetier bis zu den Prokaryoten, einen hohen Grad an Konserviertheit ihrer Gen- bzw. Proteinsequenzen auf (Schumann, 1994). Antiseren gegen ein Hitzeschockprotein zeigen eine hohe Kreuzresistenz gegenüber homologen Hitzeschockproteinen anderer Organismen, was noch heute zur Identifizierung von Hitzeschockproteinen genutzt wird (Eremeeva et al., 1998). Ihre ubiquitäre Verbreitung wird zugleich als Indiz für die Wichtigkeit dieser Proteine für das Leben aller Organismen sowohl unter normalen Wachstumsbedingungen als auch nach Streß betrachtet. Tatsächlich führt das Fehlen einzelner Hitzeschockproteine in Mutanten oft zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit bei optimaler Temperatur (Bukau und Walker, 1989) und zu einer deutlichen Senkung des Temperaturmaximums von Bakterien (Paek und Walker, 1987).

Viele Hitzeschockproteine fungieren in der Zelle als molekulare Chaperone. Sie falten naszierende oder partiell denaturierte Proteine und verhindern damit die vollständige Denaturierung von Proteinen in der Zelle, die zum Wärmetod führen kann. Es sind zwei Chaperonkomplexe bekannt. Der DnaK/DnaJ/GrpE-Komplex und der GroEl/GroEs-Komplex (Thomas et al., 1997) ergänzen sich in ihrer Funktion. DnaJ bindet vom Ribosom synthetisierte Peptidketten und schirmt gemeinsam mit DnaK hydrophobe Regionen ab. Durch Anlagerung von GrpE unter gleichzeitiger Hydrolyse von ATP wird das Peptid gefaltet und vom Komplex abgelöst. Es kann dann bereits als natives Protein vorliegen oder weitere Faltungszyklen mit dem DnaK/DnaJ/GrpE-Komplex und dem GroEl/GroEs-Komplex durchlaufen (Abb. 1).

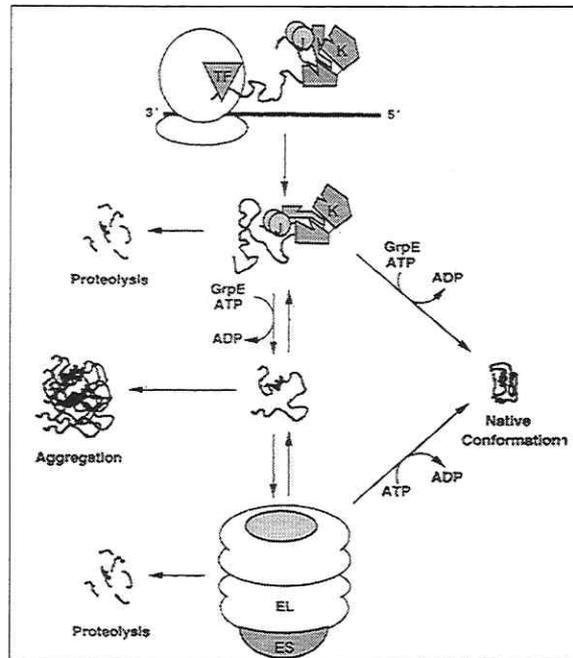


Abb. 1: Modell der Faltung von Proteinen durch die Chaperone nach Thomas et al. (1997)

GroEl ist in seiner nativen Form ein Homotetradekamer aus 2 übereinanderliegenden Ringstrukturen aus je 7 Monomeren. Es bindet kompaktere Peptidketten. Die Faltung der Proteine erfolgt unter Mitwirkung von GroEs, welches ebenfalls einen Ring aus 7 Monomeren bildet, bei gleichzeitiger Spaltung von ATP. Neben der Chaperonfunktion der beiden Komplexe gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, zum Beispiel die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerasen, die Proteincarboxylmethyltransferase, die Methioninsulfoxidreduktase (Visick und Clarke, 1995) und die Proteindisulfidisomerase (Crouy-Chanel et al., 1995), die an der Renaturierung von fehlgefalteten und/oder kovalent modifizierten Proteinen beteiligt sind. Nicht alle von ihnen sind Hitzeschockproteine. Wird eine korrekte Faltung nicht erreicht, präsentieren die Komplexe die fehlgefalteten Proteine verschiedenen Proteasen.

Mindestens drei Proteasen, die sich in Substratspezifität und zellulärer Lokalisation unterscheiden, werden in *Escherichia coli* durch Hitze induziert: Lon, DegP und die Clp (Gottesman, S. et al., 1995) Proteine. Die Clp Proteine weisen sowohl proteolytische Aktivität als auch Chaperonfunktion auf. Die proteolytische Untereinheit ClpP allein kann nur kurze Peptide abbauen. Um größere Peptide zu spalten, muß sie einen multimeren Komplex mit einer der bekannten ATP-spaltenden Unterheiten (ClpA, ClpX, ClpB) eingehen. ClpA und ClpB agieren in Abwesenheit der proteolytischen Untereinheit ClpP als Chaperone (Gottesman, S. et al., 1995).

Die Hitzeschockantwort ist in ihrem zeitlichen Verlauf von einem drastischen Anstieg der Synthese und einer kurz darauffolgenden Abnahme der Synthese der Hitzeschockproteine gekennzeichnet. Diese differenzierte Expression einer Gruppe von Genen unterliegt mehreren Mechanismen der positiven und negativen Regulation. Die Sigmafaktor  $\sigma^{32}$  abhängige Regulation der Hitzeschockantwort, die für einen großen Teil der Hitzeschockproteine in *Escherichia coli* zutrifft, wurde intensiv untersucht (Abb. 2, Schumann, 1994).

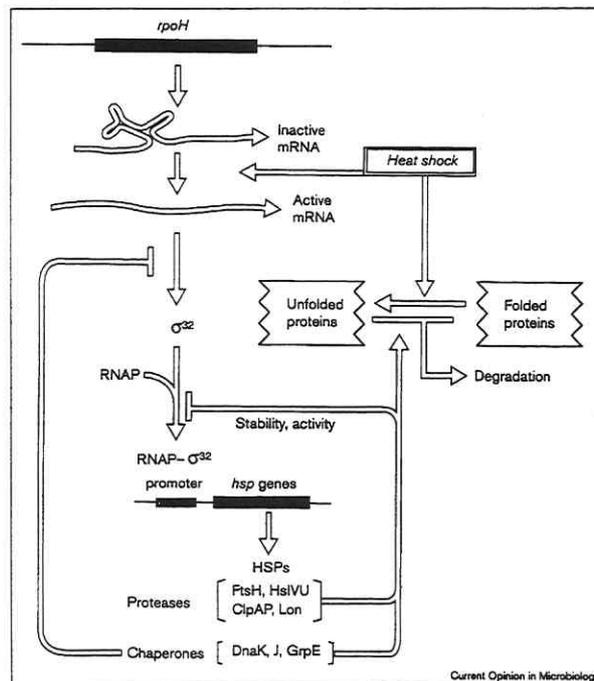


Abb. 2: Regulation der Synthese der Hitzeschockproteine des  $\sigma^{32}$ -Regulons nach Yura und Nakahigashi (1999)

Die Menge an aktiven Sigmafaktor  $\sigma^{32}$  der RNA-Polymerase reguliert die Transkription und die darauffolgende Translation der Hitzeschockproteine. Er ist ein Genprodukt von *rpoH*-Genes, welches unter der Kontrolle verschiedener Promotoren steht. Die Transkription von *rpoH* erhöht sich mit zunehmender Temperatur (Polissi et al., 1995). Die Synthese von mRNA und eine vermutete gleichzeitige Änderung ihrer Sekundärstruktur durch die erhöhte Temperatur führen

zu einer erhöhten Translation von  $\sigma^{32}$ . Außerdem nimmt die Stabilität von  $\sigma^{32}$  durch den Hitzeschock zu (Schumann, 1994). Bereits nach 6-8 min wird die Synthese von Hitzeschockproteinen wieder abgeschaltet. Die Bindung von  $\sigma^{32}$  an den DnaK/DnaJ/GrpE-Komplex (McCarty et al., 1996) reduziert die  $\sigma^{32}$  abhängige Aktivität der RNA-Polymerase und ermöglicht außerdem seinen proteolytischen Abbau (Abb. 2). Als Signal für diesen Prozeß dient die relative Zunahme von Hitzeschockproteinen durch ihre Synthese gegenüber der Abnahme denaturierter Proteinen im Ergebnis ihrer Aktivität. Außerdem unterdrückt der Komplex auch die Translation des  $\sigma^{32}$ . Die gleichzeitige Verringerung der Synthese anderer Proteine während des Hitzeschocks und die Zunahme ihrer Synthese im Anschluß an die Hitzeschockantwort wird durch die Thermoinstabilität des vegetativen  $\sigma^{70}$  und seine Reaktivierung durch den DnaK/DnaJ/GrpE-Komplex hervorgerufen (Blaszczak et al., 1995). Im Gegensatz zu *Escherichia coli* wird in *Bacillus subtilis* und bei vielen anderen vor allem grampositiven Bakterien die Synthese vieler Hitzeschockproteine durch einen Repressor der Hitzeschockgene reguliert, der nach Temperaturerhöhung eine palindromische Bindungsstelle (CIRCE) zwischen Hitzeschockpromotor und dem ersten Hitzeschockgen freigibt, was zur Erhöhung der Transkriptionsrate führt (Schumann, 1994). Als ein weiteres Signal für die Induktion von Hitzeschockproteinen wird inzwischen auch die Änderung der Struktur der Zellmembran angenommen. Diese Hypothese stützt sich hauptsächlich darauf, daß lipophile Substanzen wie primäre Alkohole, die Fluidität der Membran ähnlich wie die Einwirkung von Wärme (Mejia et al., 1995) steigern. Die Temperatur, die zur Hitzeschockproteinsynthese in Gegenwart solcher Substanzen notwendig ist (Curran und Khalawan, 1994), wird erniedrigt. Außerdem werden zunehmend Hitzeschockproteine in Wechselwirkungen mit Membranen beobachtet. Ihre Funktion als Modulator der Hitzeschockantwort wird diskutiert (Horvath et al., 1998).

### **1.3.2 Die Antworten auf oxidativen Streß und DNA-Schädigung als Resistenzmechanismen**

Viele Mikroorganismen benutzen Sauerstoff als Substrat bei Enzymreaktionen und als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette. Dabei entstehen mit niedrigen Raten reaktive Sauerstoffverbindungen als Nebenprodukt (Gonzalez-Flecha und Demple, 1997; Weiss, 1998). Das Ansteigen der Konzentration der reaktiven Sauerstoffverbindungen, wie das Superoxidanions ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxylradikals ( $OH^\cdot$ ), sowie organischer Peroxide ( $ROOH$ ), die nach Einwirkung von Xenobiotika durch Redoxcycling entstehen können (Kappus und Sies, 1981), führt zur Schädigung zellulärer Bestandteile wie Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen (Tamarit et al., 1998), zum Beispiel der  $\beta$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATP-ase. Viele Organismen besitzen Mechanismen zur Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Die wichtigsten detoxifizierenden Enzyme sind Superoxiddismutase, Katalase und Alkylhydroperoxidreductase (Abb. 3).

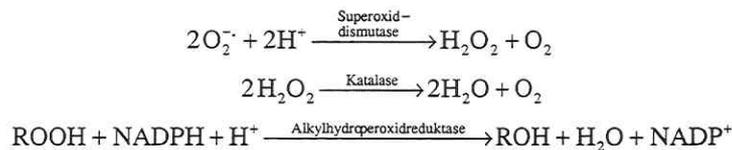


Abb. 3: Enzymatische Entgiftung von reaktiven Sauerstoffverbindungen

Neben detoxifizierenden Enzymen werden auch Enzyme, die sensitiv gegenüber Sauerstoffradikalen sind, verstärkt synthetisiert (Aconitase: Gruer und Guest, 1994) oder durch Isoenzyme ersetzt (Fumarase: Liochev und Fridovich, 1992). Enzyme wie die Glukose-6-phosphatdehydrogenase und die NADPH-Ferredoxin-oxidoreduktase tragen durch Bildung von NADPH bzw. durch Reduktion von FeS Zentren in Proteinen zur Erhöhung der Stabilität von FeS Proteinen bei. Obwohl oxidativer Streß zur DNA-Schädigung führt, ist Endonuclease IV das einzige bekannte DNA-reparierende Enzym, welches allein durch oxidativen Streß induziert wird (Weiss, 1998). Die Gene für die oxidative Streßantwort sind in *Escherichia coli* in mehreren Regulons organisiert. Das OxyR und das SoxRS Regulon werden durch redoxensitive Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Oxidation von OxyR durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rosner und Storz, 1997) und die darauffolgende Bildung intramolekularer Disulfidbrücken ermöglicht seine Bindung an die OxyR-abhängigen Promotoren und dadurch eine Genexpression. Die Induktion des SoxRS- Regulons läuft in einem Zweistufenprozeß ab (Abb. 4).

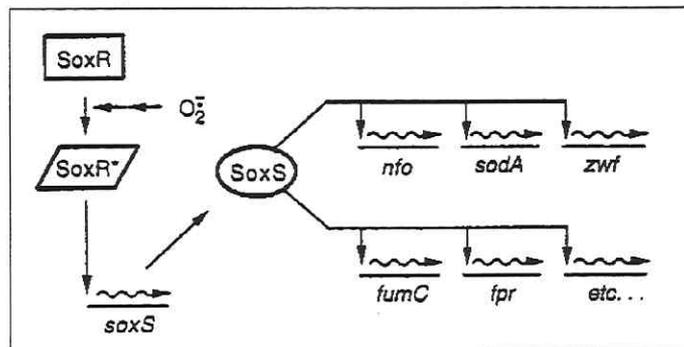


Abb. 4: Induktion des soxRS-Regulons nach Weiss (1998). (nfo: Gen der Endonuclease IV; sodA:  $\text{Mn}^{2+}$ -Superoxiddismutase; zwf: Glukose-6-phosphatdehydrogenase; fumC:  $\text{O}_2^-$  resistente Fumarase; fpr: NADPH-Ferredoxin-oxidoreduktase)

Zuerst wird SoxR durch die Einwirkung von  $\text{O}_2^-$  in die aktive Form überführt, was die Transkription des *soxS*-Gens erhöht. Die Zunahme an SoxS ermöglicht die Aktivierung des gesamten Regulons. Als Mechanismus der Aktivierung von SoxR wird die Bildung eines  $[\text{2Fe:2S}]$  Clusters am Apoenzym aus dem freigesetzten Eisen von  $\text{O}_2^-$  sensitiven Proteinen (Dempfle, 1996) oder die direkte Oxidation eines bereits vorhandenen  $[\text{2Fe:2S}]$  Clusters durch  $\text{O}_2^-$  (Ding et al., 1996) angenommen. Beide Transkriptionsfaktoren, OxyR und SoxR, können durch die spezifische Reduktion mit reduziertem Glutathion (Zheng et al., 1998) bzw. NADPH (Gaudu et al., 1997) inaktiviert werden, was auf einen Einfluß der beiden Hauptredoxpuffer der

Zelle auf die Regulation der oxidativen Stressantwort hinweist (Zheng et al., 1998). Einige OxyR und SoxRS abhängige Proteine überlappen zum Teil mit Proteinen anderer Regulons wie Stationäre-Phase-Antwort und dem Multiple-Antibiotika-Resistenz-Regulon (mar), was eine Feinregulation ermöglicht (Rosner und Storz, 1997).

Neben reaktiven Sauerstoffverbindungen verursachen auch UV-Strahlung und eine Vielzahl von Verbindungen wie Nalidixinsäure und Aflatoxin eine Schädigung der DNA. Modifikationen der Sequenz der DNA können zu Veränderungen oder zum Verlust genetischer Information führen, die die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit eines Organismus einschränken. Die SOS-Antwort ist ein regulatorisches Netzwerk, das durch DNA-Schädigung und durch Störung der DNA-Replikation induziert wird (Walker, 1996). Signal für die Induktion der Antwort ist in *Escherichia coli* die Bildung einsträngiger DNA, die durch kovalente Modifikationen an den Nucleobasen und darauffolgenden Fehlpaarungen hervorgerufen wird. Die Bindung von Protein RecA an einsträngige DNA führt zur Bildung einer aktiven RecA\*-Form. RecA\* erleichtert die autokatalytische Inaktivierung des Repressors der SOS-Antwort LexA (Walker, 1996). Eine Verringerung des induzierenden Signals der einzelsträngigen DNA nach DNA-Reparatur führt zur Abschaltung der Antwort. SOS-abhängige Proteine sind verantwortlich für UV-abhängige Excisionsreparatur, SOS-Mutagenese, Doppelstrangbruchreparatur und Tochterstrang-Gap-Reparatur (Walker, 1996).

### **1.3.3 Die Stationäre-Phase-Antwort und die Ausbildung von Resistenzen**

Die natürliche Umgebung von Bakterien zeichnet sich durch den Mangel von einem oder mehreren Nährstoffen aus, die zur Begrenzung der Geschwindigkeit ihres Wachstums oder zur scheinbaren Ruhe führen. Die Bakterien treten in ein physiologisches Stadium ein, was Stationäre-Phase genannt wird und von vielen morphologischen und physiologischen Änderungen begleitet wird. Sie sind in der Lage, große Zeiträume des Nährstoffmangels zu überleben und zeigen eine starke multiple Resistenz gegenüber verschiedenen Einflüssen wie Temperatur, Wasserstoffperoxid, alkylierenden Reagenzien, Ethanol, Acetone sowie sauren und basischen pH-Werten. Die Fähigkeit, diese sehr verschiedenen Bedingungen zu überleben, weist darauf hin, daß Stationäre-Phase-Zellen Mechanismen zum Schutz von DNA, Proteinen und Membranen exprimiert haben. Es wird vermutet, daß die Induktion nicht spezifisch für einen Stressor ist, da die Zellen keinen Kontakt mit potentiellen Stressoren hatten. Obwohl einige induzierbare Gene der Stationären-Phase gleichzeitig zu Stress induzierbaren Operons gehören, unterscheidet sich die Genregulation der Stationären-Phase deutlich von denjenigen, die in Stresssituationen beobachtet werden (Hengge-Aronis, 1996).

In *Escherichia coli* werden als primäre Antwort auf Limitierung eines Nährstoffes, Mechanismen induziert, die eine höhere Affinität zum Substrat haben oder andere Substrate erschließen können. Diese induzierten Regulons sind spezifisch für das limitierende Substrat. Wenn ein essentieller Nährstoff vollständig aufgebraucht ist und kein Ersatz erschließbar ist, treten die Zellen in die Stationäre-Phase ein. Diese scheint unabhängig vom mangelnden Substrat zu sein. Die Synthese von Stationäre-Phase-Proteinen wird in *Escherichia coli* durch

die Menge an Sigmafaktor  $\sigma^S$  der RNA-Polymerase reguliert. Die Menge an  $\sigma^S$  wird sowohl auf transkriptionaler, translationaler Ebene als auch durch seine eigene Stabilität geregelt. Obwohl viele einzelne Faktoren, die in die Regulation eingreifen, identifiziert wurden, bleibt das molekulare Signal, welches zu einer Induktion der Stationären-Phase-Antwort führt, unklar (Hengge-Aronis, 1996). Die Akkumulation des Nucleotides ppGpp könnte wie bei der Stringent Response, der Antwort auf Probleme bei der Synthese von Aminoacyl-tRNA für die Proteinsynthese (Cashel et al., 1996), ein positives Signal sein.

#### **1.3.4 Die Streßantwort als ein Netzwerk vieler Mechanismen**

Wie bereits punktuell in der Beschreibung der einzelnen Möglichkeiten der Antwort auf Streß deutlich wurde, ist die Gesamtheit aller Mechanismen als ein kompliziertes Netzwerk zu sehen. Obwohl nur Bakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Bacillus subtilis* verhältnismäßig intensiv untersucht wurden, kann vermutet werden, daß die gefundenen Prinzipien auch für andere Bakterien, im konkreten Fall für Schadstoffabbauer, gelten. Im Gegensatz zu einigen wenigen Stressoren beschränkt sich die Wirkung der meisten Stressoren nicht ausschließlich auf ein Target oder auf einen Wirkmechanismus, was an der simultanen Induktion verschiedener Regulons sichtbar wird.

#### **1.4 Methoden zur Analyse der Streßantwort**

Die Expression von Genen als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen kann sowohl mit Hilfe der Quantifizierung der entsprechenden mRNA als auch entsprechender Proteine analysiert werden.

Die mRNA wird durch die RNA-Polymerase synthetisiert. Der Gehalt der Zelle an einer mRNA widerspiegelt die Aktivität eines Gens oder einer Gengruppe. Um die Zunahme einer bestimmten mRNA als Resultat einer erhöhten Genexpression nachweisen zu können, wird die Methode des Northern Blots angewandt. Dazu muß die isolierte gesamte mRNA der Zelle mit Hilfe elektrophoretischer Trenntechniken entsprechend ihrer Größe getrennt werden. Die getrennten mRNA werden anschließend auf eine Nukleinsäure bindende Membran gebロットet, auf der sie mit Hilfe markierter RNA-Sonden, gerichtet gegen eine Teilsequenz der zu untersuchenden mRNA, spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Voraussetzung ist die Kenntnis der entsprechenden Gensequenzen, um RNA-Sonden synthetisieren zu können. Die begrenzte Verfügbarkeit der Sequenzen von induzierten Genen schränkt die Nutzbarkeit dieser Methode, insbesondere zur Identifizierung neuer Mechanismen, ein.

Proteine werden an den Ribosomen mit einer Aminosäuresequenz entsprechend der mRNA synthetisiert. Man nimmt an, daß eine Bakterienzelle aus sehr vielen verschiedenen Proteinen besteht. Voraussetzung für die Quantifizierung eines einzelnen Proteins ist eine Auftrennung dieser großen Vielfalt. Verschiedene elektrophoretische Methoden zur Trennung von Proteinen wurden entwickelt. Die Nativelektrophorese ermöglicht die Separierung von Proteinen unter Bedingungen, bei denen ihre enzymatische Aktivität erhalten bleibt, die mit einer Färbung im Gel nachgewiesen werden kann. Sie wird oft zur Trennung von Isoenzymen genutzt. Viele

Proteine sind sehr instabil oder besitzen keine enzymatische Aktivität. Bei der Anwendung von ein- bzw. zweidimensionaler Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen werden sie entsprechend ihres Molekulargewichts und/oder ihres isoelektrischen Punktes getrennt. Der Vergleich der erhaltenen Proteinmuster ermöglicht das Erkennen von Veränderungen der Genexpression. Die Entwicklung der zweidimensionalen Proteinelektrophorese (O'Farrell, 1975; Klose, 1975) hat durch die höhere Auflösung im Vergleich zur SDS-Elektrophorese die Analyse der Stressantwort entscheidend gefördert. Die vergangene Entwicklung, vor allem die Einführung und Verbesserung von immobilisierten pH-Gradienten, hat die Handhabbarkeit erleichtert und die Reproduzierbarkeit (Bjellequist et al., 1982; Görg et al., 1988) erhöht. Oft wird die Trennung von radioaktiv markierten Proteinen, die nach kurzzeitiger Markierung mit einer oder mehreren markierten Aminosäuren erhalten wurden, wegen ihrer höheren Sensitivität bevorzugt. Im Gegensatz zum Nachweis der Proteine durch Farbreaktionen wird dabei nicht das Gesamtprotein, sondern nur der Anteil des neu synthetisierten Proteins im Markierungszeitraum erfaßt.

Die ermittelten Werte, isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht sowie das Gesamtbild des Musters, ermöglichen den Nachweis von Proteinen in Organismen, von denen bereits Datenbanken mit zweidimensionalen Proteinmustern existieren. Noch heute trägt die N-terminale Sequenzierung von Proteinen, die aus präoperativen Gelen ausgeschnitten wurden (Eckerskorn et al., 1988), zur Entwicklung solcher Datenbanken bei. Die massenspektrometrische Analyse als eine modernere Methode gewinnt bei der Analyse der Funktion von Proteinen zunehmend an Bedeutung (Dukan et al., 1998). Eine der Vorgehensweisen ist die Spaltung des Proteins mit einer Protease, z.B. Trypsin. Die Molekularmassen der Peptide werden massenspektrometrisch ermittelt. Anschließend wird sowohl in Nukleinsäure- als auch in Proteindatenbanken nach Genen/Proteinen gesucht, die ein entsprechendes Peptidspaltmuster enthalten. Um in einer größeren Gruppe von Organismen ein Protein nachzuweisen, von dem Teile der Sequenz hoch konserviert sind, ist der immunochemische Nachweis mit Antikörpern geeignet, der auf der Kreuzreaktivität der benutzten Antikörper mit entsprechenden Antigenen beruht.

Um Zugang zu den codierenden Genen von N-Terminal sequenzierten Proteinen zu erhalten, kann mit Gensonden gearbeitet werden, die auf Grundlage der Proteinsequenz (Rückübersetzung) synthetisiert wurden. Der Zugang zu den Genen ermöglicht die gezielte Konstruktion von Mangel- und Überexpressionsmutanten (Paek und Walker, 1986), die zu typischen physiologischen Veränderungen führen und helfen, die Funktion eines Proteins im Zusammenhang der Gesamtzelle zu beurteilen. Oft sind Überexpressionsmutanten Voraussetzung für die Reinigung des nativen Enzyms oder Proteins. Die Bestimmung biochemischer Parameter wie Aktivität, Bindungsverhalten zu Substraten und anderen Proteinen, Stabilität und Hemmbarkeit trägt zur weiteren Beschreibung der Funktion der Proteine bei. Die Konstruktion von Bakterienstämmen, bei denen ein Streß abhängiges Regulon Gene für ein Markerenzym (lux, Biolumineszenz, Van Dyk et al., 1994, Van Dyk et al., 1995, Belkin et al., 1996) oder ein Markerprotein (Grün-fluoreszierendes Protein,

Cha et al. 1999) involviert wurden, ermöglicht die Untersuchung der Genregulation mit einfachen und gut quantifizierbaren Methoden. Solche Systeme können ebenfalls genutzt werden, um den Einfluß von Chemikalien auf die Induktion dieser Gene zu untersuchen.

### 1.5 Problemstellung

Die Identifizierung der Targets von Xenobiotika und die Kenntnis der Resistenzmechanismen könnte dazu beitragen, Maßnahmen zur Stabilisierung und zur Leistungssteigerung von Mikroorganismen abzuleiten. Der momentane Kenntnisstand ist nicht hinreichend.

Als Modellorganismus wurde ein Schadstoff abbauendes Bakterium ausgewählt, das in den Ökosystemen Boden und Wasser verbreitet ist. *Acinetobacter calcoaceticus* kann aus diesen Ökosystemen wie auch aus Abwasser leicht isoliert werden (Towner et al., 1991). *Acinetobacter calcoaceticus* ist in der Lage, n-Alkane (Asperger und Kleber, 1991) und Aromaten (Fewson, 1991) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Im Vergleich zu anderen Schadstoffabbauern aus der Gattung *Pseudomonas* ist das Spektrum an verwertbaren Xenobiotika relativ klein. Für *Acinetobacter calcoaceticus* gibt es aber wie für Bakterien der Gattung *Pseudomonas* (Heipieper et al., 1992) Daten zur Empfindlichkeit gegenüber Xenobiotika (Loffhagen et al., 1997) sowie Hinweise auf Mechanismen der Resistenzhöhung gegenüber Xenobiotika auf dem Niveau der cytoplasmatischen Membran (Loffhagen et al., 1995).

Die Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Xenobiotikaeinwirkung soll auf der Ebene der Synthese von Proteinen untersucht werden. Zusätzlich sollen auch physiologische Parameter wie Wachstum, Atmung und ATP-Synthese verfolgt werden. Als Modellsubstanzen für Xenobiotika wurden Phenol, Catechol und primäre Alkohole eingesetzt.

Es ergeben sich folgende zu beantwortende Fragen:

- Welche der Mechanismen der Streßantwort lassen sich nach Xenobiotikaeinwirkung in *Acinetobacter calcoaceticus* nachweisen?
- Welche Rückschlüsse lassen sich daraus auf die Wirkungsweise von Xenobiotika ziehen?
- Welchen Beitrag leisten die erkannten Systeme zur Resistenz gegenüber Xenobiotika?
- Kann die Induktion von einigen Streßproteinen eventuell als Biomarker für den physiologischen Zustand schadstoffabbauender Bakterien genutzt werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mikroorganismen

Für die Experimente wurde *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (Kleber et al., 1973), der freundlicherweise von Prof. Kleber (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde, ausgewählt. Dieser Stamm gehört zur  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien und kann n-Alkane und monocyclische Aromaten als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Acetat, primäre Alkohole, Phenol und Catechol wurden als Modellsubstrate ausgewählt. Bei den Versuchen, bei denen Proteine mit immunologischen Techniken nachgewiesen wurden, dienten *Escherichia coli* B421 und *Pseudomonas putida* B342 (Typusstamm DSM 50202) als Vergleichsorganismen. Sie wurden auf Glukose bzw. Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert.

#### 2.1.1 Batch-Kultivierung und Streßversuche

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Kulturflüssigkeit bei 30°C. Die Kolben wurden mit 150 U/min geschüttelt (Inkubationsschüttler SM/TH25, BÜHLER). Als Nährmedium wurde ein Minimalmedium (Müller und Babel, 1986) mit 310 mg/l Phosphatpuffer pH 7,0 eingesetzt, dem im Falle der Kultivierung von *Escherichia coli* 0,1% Hefeextrakt zugesetzt wurde. In die Hauptkultur wurden 5-10 ml Inokulum aus einer sterilen Vorkultur gegeben. Folgende Substrate wurden zugegeben: 0,22 % Acetat (entspricht 0,5% Natriumacetat-Trihydrat), 0,5% Glukose, verschiedene Konzentrationen an Phenol, Catechol, Ethanol oder Butanol.

Zur Durchführung von Streßversuchen wurden Kulturen verwandt, die sich in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden. Um mit identischen Biomassen zu arbeiten, wurden die Kulturen aus mehreren Erlenmeyerkolben vor der Streßeinwirkung vereinigt, die gewünschten Volumina auf 100 ml bzw. 500 ml Erlenmeyerkolben verteilt und die Modellxenobiotika Catechol, Phenol (gelöst in Wasser) und primäre Alkohole in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Um eine schnelle Temperaturerhöhung bei Kulturvolumina größer 20 ml zu erreichen, wurde der Hitzeschock im Wasserbad (Schüttelwasserbad GFL 1083) durchgeführt. Eine Kontrolle unter Standardbedingungen, ohne Einwirkung von Stressoren, wurde mitgeführt.

#### 2.1.2 Kontinuierliche Kultivierung im Chemostat

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde in Zusammenarbeit mit Dr. C. Härtig und Frau A. Wichmann in einem Laborfermenter (Braun, Biostat MD) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 l und bei einer Temperatur von 30°C. Der Füllstand des Fermenters wurde mit Hilfe einer Waage (Sartorius, BP 34000-P) gemessen und durch das Anschalten einer Pumpe bei Überschreitung des Sollgewichts reguliert. Der pH-Wert wurde auf

pH 7,0 geregelt (automatische Titration mit 1 M  $H_2SO_4$  oder 1 M KOH, pH-Meßsonde: Ingold). Der Verbrauch an Säure bzw. Lauge und die Sauerstoffsättigung in % (Sauerstoffelektrode, Ingold) wurden als Parameter des Wachstums aufgezeichnet. Um die Schaumbildung zu minimieren, wurde Entschäumer (10 % Silicone anti-foam emulsion M30) zugegeben. Die Zugabe erfolgte automatisch durch das Signal der Schaumsonde gesteuert. Die Kultivierung wurde in einem Batch auf 0,22 % Acetat in Minimalmedium begonnen. Nach Verbrauch des Substrates, ersichtlich durch das Ende des Verbrauches an Lauge, wurde die kontinuierliche Kultivierung mit einer Durchflußrate von  $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$  oder  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$  gestartet. Die Substratkonzentration betrug  $s_0 = 5 \text{ g/l}$  Acetat in Minimalmedium. Ein Fließgleichgewicht stellte sich ein. Die Durchflußrate entspricht unter diesen Bedingungen der Wachstumsrate  $\mu$ . Nach der Etablierung der kontinuierlichen Kultur auf Acetat wurde auf eine kontinuierliche Kultivierung mit  $s_0 = 0,5 \text{ g/l}$  Phenol und  $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$  umgestellt. Die Kultivierung erfolgte anschließend bei Durchflußraten von  $D = 0,1 - 0,4 \text{ h}^{-1}$ .

### 2.1.3 Kontinuierliche Kultivierung nach dem Nutristatprinzip

Die Kultivierung im Nutristat ist eine kontinuierliche Kultivierung bei konstant geregelter Substratkonzentration. Sie ermöglicht die Kultivierung von Mikroorganismen unter inhibierenden Substratkonzentrationen, zu denen sich eine entsprechende Wachstumsgeschwindigkeit einstellt. Der Einfluß verschiedener Phenolkonzentrationen auf das Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* wurde im Nutristat untersucht. Die Ausrüstung zum Umbau des Fermenters wurde von Dr. R. H. Müller zur Verfügung gestellt.

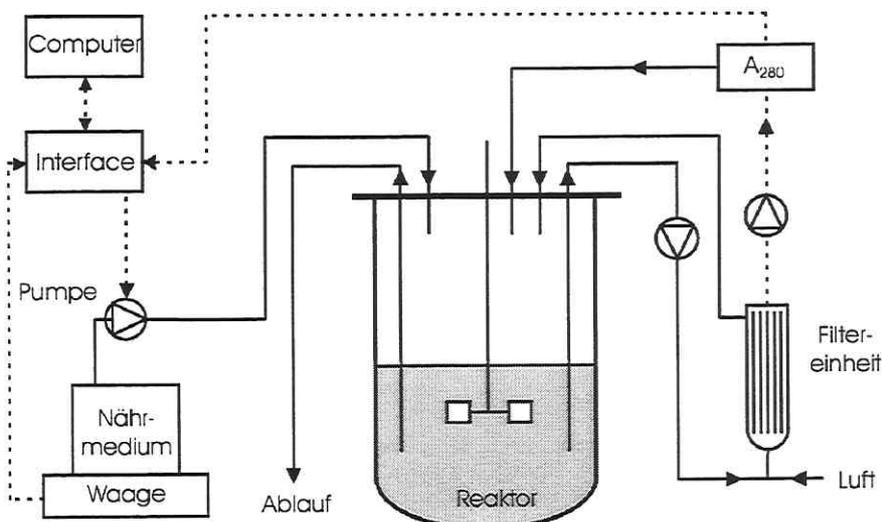


Abb. 5: Schema des experimentellen Aufbaus des Nutristats (ausführlich bei Müller et al., 1997).

Die Kultivierung und Etablierung einer phenolverwertenden Kultur mit  $D = 0,2$  erfolgte in einem Laborfermenter (Braun: Biostat MD) wie unter Abschnitt 2.1.2 beschrieben.

Die Regelung der Phenolkonzentration im Kulturgefäß erfolgte an Hand des Signals der Online-Messung (3 min Zeitverzögerung) der Phenolkonzentration (Uvichord II, Pharmacia, Extinktionsmessung bei 280 nm) (Abb. 5). Die Durchflußküvette des Meßgeräts wurde von einem zellfreien Filtrat durchströmt, das durch Filtration der Kulturflüssigkeit in einer Außenschleife des Fermenters (Filter: Faserschläuche, 0,2  $\mu$ m Polysulfon SPS 9002-4, FRESINIUS; Pumpe: INFORS) gewonnen wurde. Die Dosierpumpe für die Substratzuführung wurde von einem Computer gesteuert, der aus der aktuellen Phenolkonzentration und dem Verbrauch an Nährlösung (Minimalmedium,  $s_0 = 2$  g/l) der vergangenen 20 min die aktuelle Dosierung berechnete. Der Verbrauch an Nährlösung wurde durch das Wägen der Vorratsgefäße mit Nährlösung ermittelt.

Vor Beginn und während der Kultivierung im Nutristat wurden Proben entnommen, von denen die Konzentration von Phenol ermittelt wurde. Dazu wurden 1 ml Kultur bei 10.000 x g (Hermle ZK380) 5 min zentrifugiert und ein Teil des verdünnten Überstandes mittels HPLC-Analytik (C-R4AX-Chromatopac, Shimadzu) analysiert. Die Trennung erfolgte in einer Lichrosper 100-RP18 – Säule (Knauer Säulenteknik Berlin) und einer mobilen Phase bestehend aus 40 % Acetonitril und 60 % 131,5 mM  $H_3PO_4$  pH 2,8 mit einer Flußrate von 1 ml/min.

#### **2.1.4 Bestimmung der Biomassekonzentration**

Die Biomassekonzentration wurde während des Wachstums durch die Messung der optischen Dichte bei 700 nm (Plasteküvette, 10 mm Schichtdicke) im Photometer (Dr. Lange, CADAS 50) verfolgt. Anhand einer Eichkurve für *Acinetobacter calcoaceticus* konnte aus der Trübung der Bakteriensuspension das Trockengewicht berechnet werden.

## **2.2 Probenvorbereitung**

### **2.2.1 Zellgewinnung und Zellaufschluß**

Zur Gewinnung der Zellen wurden die Zellsuspensionen 10 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert (Hermle ZK380) zweimal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 mg/ml Chloramphenicol und 1 mM PMSF) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,5 mg/ml  $MgCl_2$ , 1 mM PMSF und 1,2  $\mu$ l/ml Benzonase/Merck) aufgenommen. Bis zum Zellaufschluß mit Ultraschall konnten sie bei -18°C gelagert werden. Der Ultraschallaufschluß (Branson Sonifier 250) wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen unter Eiskühlung durchgeführt. Es wurde die Mikrospritze verwandt und 3 mal 15 s mit der Intensität 4 beschallt. Zwischen den Beschallungszyklen wurde 30 s zum Kühlen pausiert. Anschließend wurde bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert, um unaufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der zellfreie Extrakt wurde bis zur Proteinbestimmung oder zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

### **2.2.2 Proteinbestimmung**

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde Fertiglösung (Bioquant, Merck) verwendet. Der Test wurde im Konzentrationsbereich 10 - 100  $\mu\text{g}$  durchgeführt und eine entsprechende Eichkurve mit Rinderserumalbumin aufgenommen. Zu 100  $\mu\text{l}$  des verdünnten zellfreien Extraktes wurde 1 ml Bioquantlösung gegeben und gemischt. Die Proben wurden nach 5 min Inkubation bei 595 nm in 10 mm Plastikvetten im Photometer (Dr. Lange, CADAS 50) gemessen.

## **2.3 Trennung und Nachweis von Proteinen mit elektrophoretischen Methoden**

### **2.3.1 Isoelektrische Fokussierung**

#### **2.3.1.1 Isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten**

Die isoelektrische Fokussierung von Proteinen wurde, wenn nicht anders angegeben, in immobilisierten pH-Gradienten mit der Multiphor II Elektrophoresekammer, dem Immobiline DryStripKit und dem Stromversorgungsgerät Electrophoresis Power Supply EPS 3500-XL (alle Pharmacia Biotech) durchgeführt. Zur Fokussierung wurden normalerweise die kommerziell erhältlichen Immobiline DryStrips pH 4-7 L, 18 cm (Pharmacia Biotech) verwendet. Die aufzutragende Menge an Protein (50  $\mu\text{g}$  Protein / Strip) wurde vorher mit dem 5 fachen Volumen an eiskaltem Aceton aus dem zellfreien Extrakt bei 0°C gefällt und 20 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12000 x g und 0°C 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris/HCl pH 6,8 mit 2% Mercaptoethanol und 1% NP40 aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Danach wurden 350  $\mu\text{l}$  Rehydratisierungspuffer (8 M Harnstoff, 1,5 % CHAPS, 0,5 % NP40, 1% IPG-Puffer pH 4-7 L, 0,2 % DTE, 1 mM PMSF, 0,002 % Bromphenolblau) zugegeben und die IPG-Strips über Nacht in dieser Lösung im Immobiline DryStrip Reswelling Tray (Pharmacia Biotech) äquilibriert. Zum Schutz gegen Austrocknung und Verdunstung wurden die Strips mit 2 ml PluseOne Dry Strip Cover Fluid (Pharmacia Biotech) überschichtet. Die äquilibrierten Strips wurden kurz mit Wasser gespült, mit Filterpapier abgetrocknet und zur Fokussierung in das Immobiline DryStrips Tray überführt. Die Apparatur wurde entsprechend der Bedienungsanleitung zusammengesetzt. Die Strips liefen 5 h mit einer Spannung, die linear von 500 - 3500 V anstieg und weitere 15,5 h 3500 V betrug. Dies entspricht 71500 Vh.

Alternativ zur Zugabe der Proben in den Rehydratisierungspuffer wurden die Proben (je 50  $\mu\text{g}$ ) in 50  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (9 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 2% IPG-Puffer pH 4-7 L, 0,2% Biolyte 3-10 Ampholyte, 0,4 % DTE, evtl. 1 mM PMSF, 0,002 % Bromphenolblau) gelöst und in die Immobiline Sample Cups aufgetragen.

**Tab. 1: Spannungsprogramm für die isoelektrische Fokussierung von Proteinen in Immobiline Dry Strips**

Schritt	Zeit in h	Spannung in V	Vh
1	0,01	0-500	0
2	1	500	500
3	5	500-3500	10000
4	17	3500	59500
Gesamt	23		70000

Die IPG-Strips wurden in diesem Fall mit 400  $\mu$ l Rehydratisierungspuffer (9 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 2% IPG-Puffer pH 4-7, 0,2% Biolyte 3-10 Ampholyte, 0,4 % DTE, evtl. 1 mM PMSF, 0,002 % Bromphenolblau) äquilibriert. Die Spannungen während der isoelektrischen Fokussierung betragen wie in Tab. 1 angegeben.

Nach dem Lauf wurden die Strips für 15 min in einem 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 6,8 mit 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 4 % SDS, 2 % DTE und anschließend 10 min einem 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 6,8 mit 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 4 % SDS, 2,5 % Iodoacetamid äquilibriert. Danach wurden die Strips bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert oder gleich anschließend die SDS-Elektrophorese durchgeführt.

### 2.3.1.2 Isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten

Die isoelektrische Fokussierung mit Trägerampholyten wurde in der Protean II xi Cell (Bio-Rad) mit Tube gel adapter durchgeführt. Die Trennung beruht auf der Ausbildung eines pH-Gradienten durch die Trägerampholyte während des Laufes. Diese Methode wurde sowohl für die analytische als auch präperative Trennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt im Rahmen der zweidimensionalen Gelelektrophorese genutzt.

Mit eiskaltem Aceton gefälltes Protein (siehe 2.3.1.1) wurde in Probenpuffer (8,3 M Harnstoff, 3,6 % CHAPS, 1,2 mg PMSF, 3,6 % Bio-Lyte 5/7 ampholyte, 0,4 % Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 4 % Triton X-100 and 2 % Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Proben wurden auf die katodischen Enden der IEF Röhrchengele (1,5mm x 140 mm; 8,1 M Harnstoff, 4,5 % Bio-Lyte 5/7 ampholyte, 2 % Bio-Lyte 3/10 ampholyte, and 2 % Triton X-100) aufgetragen. Für die Katode wurde 0,02 M NaOH und für die Anode 0,06%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  als Elektrodenpuffer benutzt. Zur Trennung wurde für 16 h eine Spannung von 400 V und für weitere 4 h eine Spannung von 800 V angelegt. Dies entspricht 9600 Vh. Nach dem Lauf wurden die Gele 30 min in 62,5 mM Tris/HCl Puffer pH 6,8 mit 10 % Glycerol, 2 % SDS, 5% Mercaptoethanol und 0,005 % Bromphenolblau äquilibriert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur präperativen Trennung wurden Gele mit einem größeren Durchmesser und einer kürzeren Trennstrecke eingesetzt (5 mm x 125 mm). Die Äquilibrierungszeit im Anschluß an die Fokussierung wurde auf 45 min erhöht.

### 2.3.2 SDS-Elektrophorese

Zur SDS-Elektrophorese wurde das diskontinuierliche Puffersystem nach Laemmli (1970) genutzt. Die Trennungen wurden in der Protean II xi Cell (Bio-Rad) oder in der Protean II multi Cell (Bio-Rad) mit dem Power Pac 1000 (Bio-Rad) als Stromversorgungsgerät durchgeführt. Für die Trennung von Proteinen, die anschließend mit immunologischen Techniken gefärbt wurden, wurde die Mini Protean II Cell (Bio-Rad) genutzt, da durch die geringere Größe der Gele der Verbrauch an Reagenzien und Antikörpern minimiert wurde.

Zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen wurden Trenngele (170 mm x 160 mm x 1 mm) aus Acrylamid mit einer Konzentration von 12 % (Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid 37.5:1, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS) gegossen und mit Wasser gesättigtem sekundären Butanol überschichtet. Als Reagenzien zur Polymerisation wurden 0,1 % APS und 0,05 % TEMED eingesetzt. Nach 1 h Polymerisationszeit wurde ein Sammelgel (4% Acrylamide/Bisacrylamide, 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS) gegossen. Die Probenauftragungstaschen wurden durch die Nutzung eines Kammes beim Gießen des Sammelgels vorbereitet. Die Proben (Silberfärbungskonzentration: 1 µg Protein/Spur) wurden mindestens 1:4 mit Probenauftragungspuffer (0,125 M Tris/HCl pH 6,8 , 2% SDS, 10% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau) verdünnt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach dem Befüllen der oberen und unteren Pufferkammer mit Laufpuffer (0,1% SDS, 0,192 M Glycin, 0,025 M Tris) wurden sie anschließend mit einer Mikroliterspritze in die Probentaschen des Sammelgels aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 12°C. Es wurde für 1 h ein Strom von 20 mA/Gel und für weitere 4 - 5 h ein Strom von 40 mA/Gel angelegt.

Bei einer SDS-Elektrophorese zur Auftrennung nach dem Molekulargewicht im Anschluß an die isoelektrische Fokussierung wurden Sammelgele (190 mm x 190 mm x 1 mm) mit einem Gradienten von Acrylamid/Bisacrylamid 10 - 15% (0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS) benutzt. Mit Hilfe des Model 395 Gradientenmischers (Bio-Rad) und der Protean II xi multi gel Casting chamber (Bio-Rad) wurden gleichzeitig 6 Gele gegossen. Sie wurden mit Wasser gesättigtem sekundären Butanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Gele mit bei 80 °C temperierter 0,5% Aggaroselösung (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS) überschichtet und die äquilibrierten IPG-Strips in die Aggarose eingebettet. Die Trennung erfolgte bei 12°C. Es wurde für 1 h ein Strom von 20 mA/Gel und für weitere 4 - 5 h ein Strom von 40 mA/Gel angelegt.

Zur präparativen Trennung von Proteinen in der zweiten Dimension wurden Trenngele mit einer Dicke von 3 mm genutzt, da das Auflegen von Röhrchengelen mit einem Durchmesser von 5 mm erleichtert wurde. Diese wurden bereits mindestens 24 h vor der Trennung gegossen, damit sich Menge an Ammoniumperoxodisulfat im Gel, welches als Reagenz zur Polymerisation benutzt wurde, verringern konnte. Um die aufgetragenen Proteine vor Modifizierungen zu schützen, die eine N-terminale Sequenzierung verhindern, wurde dem Laufpuffer 0,1 mM Thioglycolsäure zugesetzt. Es wurde ein Strom von 80 mA / Gel angelegt. Die Trennung dauerte etwa 7 h.

### 2.3.3 Nativelektrophorese und Aktivfärbung der Katalase

Zur Nativelektrophorese wurden das gleiche diskontinuierliche Puffersystem und dieselben Geräte wie zur SDS-Elektrophorese genutzt. Auf die Zugabe von SDS wurde bei allen Puffern verzichtet. Die Konzentration des Trenngels betrug 7 % und die des Sammelgels 4%. Zu 75  $\mu$ l Probe wurden 25  $\mu$ l Probenpuffer (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 50 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau) zugegeben und je Spur 50  $\mu$ g Protein aufgetragen. Es wurde ein Strom von 40 mA /Gel angelegt und die Leistung auf 10 W / Gel limitiert. Die Trennung erfolgte unter Kühlung bei 8 °C.

Nachdem die Lauffront eine Trennstrecke von mindestens 10 cm erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen und die Aktivfärbung der Katalase (Clare et al., 1984) durchgeführt. Dazu wurde das Trenngel für 45 min mit 50 ml Peroxidaselösung ml (50  $\mu$ g/ml Merrettich-Peroxidase in 50 mM Phosphatpuffer pH 7) inkubiert. Danach wurde zu dieser Lösung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal kurz mit Wasser gewaschen und in die Farbstofflösung (0,5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin in 50 mM Phosphatpuffer pH 7) überführt. Die Färbung erfolgte, bis sich helle Banden vom dunkel werdenden Hintergrund abhoben. Nach dem Ende der Färbung wurde das Gel zweimal 10 min mit Wasser gewaschen, 20 min in 2% Glycerollösung in Wasser inkubiert und anschließend getrocknet (siehe 2.3.7).

### 2.3.4 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Aus einer nativen Elektrophorese wurden nach der Aktivfärbung die Banden der Katalase ausgeschnitten und mit Hilfe des HSB-Elutor E51 (Biometra) das im Gel enthaltene Protein eluiert. Dazu wurde das Gel zerkleinert. Der Elutionspuffer enthielt entsprechend der Vorschrift des Herstellers 50 mM Tris und 50 mM Glycin mit einem pH-Wert von 8,9. Es wurde für 60 min eine Spannung von 100 V angelegt. Das eluierte Protein reicherte sich in 50  $\mu$ l Hochsalzlösung (50 mM Tris, 50 mM Glycin, 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,9) an. Anschließend wurde die Protein enthaltende Hochsalzlösung zur Entsalzung mit 1 ml Wasser verdünnt und mit einem Makrofilter (Centricon-30, Amicon) 30 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert.

### 2.3.5 Blottechniken

#### 2.3.5.1 Westernblot von Proteinen

Die Proteine wurden unter Nutzung des CAPS-Buffersystem (Jin und Cerletti, 1992) mit einer Trans-blot Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad) auf eine Sequi-Blot protein sequencing PVDF Membran (Bio-Rad) geblottet. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend 15 min in 10 mM CAPS pH 11 äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 1 min mit Methanol befeuchtet und anschließend für mindestens 15 min in 10 mM CAPS pH 11 mit 20 % Methanol äquilibriert. Nitrocellulosemembranen (Bio-Rad) wurden sofort in 10 mM CAPS pH 11 mit 20 % Methanol äquilibriert. Folgendes Blotting-

Sandwich wurde in der Richtung von Anode zu Katode zusammengesetzt: extra dickes Filterpapier (Bio-Rad) befeuchtet mit 10 mM CAPS pH 11 mit 20 % Methanol, äquilibrierte Blottingmembran, äquilibriertes Gel und extra dickes Filterpapier (Bio-Rad) befeuchtet mit 10 mM CAPS pH 11 mit 5 % Methanol. Danach wurde für 3 h bei Zimmertemperatur eine Spannung von 25 V angelegt und eine Stromstärke von maximal 3 mA/cm<sup>2</sup> eingestellt.

### **2.3.5.2 Dot-Blot von Proteinen**

Der Dot-Blot wurde mit dem Miliblot System (Millipore Corporation) durchgeführt. Gleichzeitig konnten bis zu 96 Proteinproben mit einem Volumen von 100 - 500 µl auf eine Nitrocellulosemembran von 8 x 11 cm geblottet werden, die anschließend zur Immunfärbung eingesetzt wurde. Die Nitrocellulosemembran und das Filterpapier wurden mit 100 ml 25 mM Tris/HCl pH 7 mit 20 % Methanol befeuchtet. Die Proben wurden für den Blot mit 50 mM Tris/HCl, 0.001 % Bromphenolblau auf ein Volumen von 300 - 500 µl verdünnt. Der Blot erfolgte durch das Anlegen eines schwachen Wasserstrahlvakuum, so daß die Flüssigkeit in den Dots in 2 - 5 min durch die Membran gesaugt wurde.

### **2.3.6 Färbung von Proteinen**

#### **2.3.6.1 Coomassiefärbung**

Die Färbung der Gele oder der geblotteten Membranen mit Coomassiebrilliantblau R250 (Sanchez et al., 1992) wurde in einem automatischen Gelfärber (Hoefer) nach dem unten stehenden Protokoll durchgeführt. Das Volumen der Lösungen wurde in Abhängigkeit von der Gelgröße variiert. Bei der Färbung von geblotteten PVDF-Membranen wurde die Essigsäure durch Wasser ersetzt und die Färb- und Entfärbezeiten auf je 5 min reduziert.

- 2 min mit Wasser waschen
- 30 min färben mit 0,1% Coomassiebrilliantblau R250 in einem Gemisch von 50% Methanol, 10 % Essigsäure und 40 % Wasser
- 3 - 5 mal 10 min entfärben mit einem Gemisch von 50 % Methanol, 10 % Essigsäure und 40 % Wasser

#### **2.3.6.2 Silberfärbung**

Während der Herstellung, dem Lauf der Gele sowie der gesamten Färbezeit wurde auf Sauberkeit geachtet, da die Silberfärbung sehr sensitiv ist. Bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 30 - 60 µg in zweidimensionalen Gelen und 1 - 2 µg pro Spur bei eindimensionaler Trennung läßt sich eine hohe Zahl an Proteinen ohne eine starke Hintergrundfärbung nachweisen. Stammlösungen mit 2 % Silbernitrat in Wasser (im Dunkeln maximal 4 Wochen haltbar) und 1% Natriumthiosulfat in Wasser wurden zur Herstellung der Färbelösung benutzt und die Färbung, wie in Tabelle angegeben, durchgeführt.

**Tab. 2: Protokoll zur Herstellung und Durchführung der modifizierten Silberfärbung nach Blum et al. (1987). Zeitangaben in Klammern Färbung mit einem Automated Gel Stainer (Hoefer).**

Lösung	Herstellung	Färbezeit
Fixierer:	50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 40 % Aqua bidest. 101 $\mu$ l 37 % Formaldehydlösung auf 250 ml vor Verwendung zugeben.	1 h (30min)
Waschlösung I:	30 % Ethanol	3 x 20 min (15 min)
Thiosulfatlösung:	2,5 ml Natriumthiosulfat Stammlösung auf 250 ml	1 min (2min)
Wasser	-	3 x 20 s (1,5 min)
Imprägnierer:	25 ml Silbernitratstammlösung und 100 $\mu$ l 37 % Formaldehydlösung auf 250 ml mit Wasser auffüllen. (kurz vor Verwendung herstellen)	20 min
Wasser	-	2 x 2 min
Entwickler:	15 g Natriumcarbonat (wasserfrei) in Wasser lösen, 60 $\mu$ l 37 % Formaldehydlösung zugeben und 100 $\mu$ l Thiosulfat-stammlösung auf 250 ml mit Wasser auffüllen. (kurz vor Verwendung herstellen)	5 – 20 min
Wasser	-	1,5 min
Stopper:	50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 40 % Aqua bidest.	10min
Waschlösung II:	50 % Methanol	20 min
Preservelösung:	5 ml Glycerol auf 250 ml auffüllen	20 min

### 2.3.6.3 Ponceau S Färbung

Die Nitrocellulosemembranen wurde nach dem Westernblot 3 min mit einer Lösung von 0.2 % Ponceau S und 3 % Trichloressigsäure in Wasser geschüttelt. Anschließend wird mit Wasser entfärbt bis die Banden oder Spots sich gut vom Hintergrund abheben (Sanchez et al., 1992). Die Proteinmuster wurden sofort nach der Entfärbung des Hintergrunds gescannt, da bei weiterer Entfärbung der Kontrast wieder abnahm.

### 2.3.6.4 Immunfärbung

Zur Immunfärbung wurde das Immun-Blot Assay Kit (Bio-Rad) verwandt, das einen sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt mit Merrettichperoxidase enthielt. Folgende primäre Antikörper wurden verwandt:

- Polyklonale Kaninchen anti-GroEl Antikörper (Sigma)
- Polyklonale Kaninchen anti-DanK Antikörper (Upstate Biotechnology)
- Antiseren und affinitätsgereinigte Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen N-terminale Peptide der Proteine AhpC und ClpB (hergestellt von Pepscan Immunoanalytik)

Die folgende Tabelle gibt die Zusammensetzung der zum Test verwandten Lösungen wieder. Sie wurden entsprechend der Vorschrift aus den Stammlösungen des Immun-Blot Assay Kit (Bio-Rad) hergestellt (Tab. 3).

**Tab. 3: Lösungen zur Immunfärbung mit dem Immun-Blot Assay Kit (Bio-Rad)**

Lösung	Zusammensetzung
TBS (Tris gepufferte Saline)	20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5
TTBS	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5
Blocklösung	3% Gelatin in TBS
Antikörperpuffer	1% Gelatin in TTBS
Primärer Antikörperpuffer	je nach Antikörper und Anwendung 2 –10 $\mu\text{g}$ / ml in Antikörperpuffer
Sekundärer Antikörperpuffer	33 $\mu\text{l}$ sekundärer Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG) in 100 ml Antikörperpuffer
Merrettich-Peroxidase-Entwicklungspuffer	20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5 mit ColorReagent A(4-Chloronaphtol)+B(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )

Die Nitrocellulosemembranen wurden nach dem Blotten (Westernblot nach ein- oder zweidimensionaler Elektrophorese oder Dot-Blot) und einer reversiblen Proteinfärbung mit Ponceau S (siehe 2.3.6.3) entsprechend der unten stehenden Tabelle (Tab. 4) inkubiert. Dabei wurde mindestens 1 ml Puffer pro cm<sup>2</sup> Nitrocellulosemembran eingesetzt. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schütteln bei Raumtemperatur.

**Tab. 4: Protokoll zur Immunfärbung mit dem Immun-Blot Assay Kit (Bio-Rad)**

Zeit in min	Puffer
60	Blocklösung
10	TTBS
60 - 90	Primärer Antikörperpuffer
2 x 10	TTBS
60	Sekundärer Antikörperpuffer
2 x 5	TTBS
5	TBS
5 - 30	Merrettich-Peroxidase- Entwicklungspuffer
2 x 10	Aqua dest.

### 2.3.7 Trocknung der Gele

Nach den Färbungen wurden die Gele zwischen zwei Cellophanfolien gelegt und im GelAir Dryer (Bio-Rad) im kontinuierlichen Warmluftstrom 2 h getrocknet. Die getrockneten Gele sind unbegrenzt haltbar.

## 2.4 Auswertung von Proteinmustern

### 2.4.1 Bildaufnahme

Getrocknete Gele und Blotmembranen wurden mit einem Flachbettscanner (Powerlook 2000, Umax) eingescannt. Die erhaltenen Bitmaps wurden für die weitere Verarbeitung mit

Bildauswertesoftware im TIF-Dateiformat gespeichert. Die in der Software MagicScan 4.1 genutzten Einstellungen sind in Tab. 5 aufgeführt.

**Tab. 5: Einstellungen und der Software MagicScan 4.1 bei der Bildaufnahme mit dem Flachbettscanner (Powerlook 2000, Umax)**

Einstellung	Silberfärbung /Coomassiefärbung	Western Blots / Dot-Blots
Vorlage	Durchsicht	Aufsicht
Betriebsart	Graustufen / Echtfarben	Graustufen
Auflösung	200 dpi	200 dpi
Entrastern	ohne Entrastern	ohne Entrastern
Filter	ohne Filter	ohne Filter
Lichter	0	Auto
Schatten	255	Auto
Gamma	1	Auto

#### 2.4.2 Auswertung eindimensionaler Gele

Die Banden in eindimensionalen Proteinmustern wurden mit Hilfe der Intelligent Quantifier Software (Bio Image) quantifiziert. Das Molekulargewicht der Banden wurde ebenfalls mit dieser Software anhand der benutzten Molekulargewichtsstandards bestimmt.

#### 2.4.3 Auswertung zweidimensionaler Gele

Bilddateien von Gelen, die zu einem Experiment gehören, wurden gemeinsam zur Auswertung in die Phoretix 2D Full Software (NonLinear Dynamics Ltd.) geladen. Die optische Dichte wurde mit Hilfe der Funktion „Intensity calibration“ an einem Standardbild (photographic step tablet, Kodak) im Bereich von 0,0 – 1,27 kalibriert und auf die Bilder des Experimentes übertragen. Die Funktionen „Spot detection“ (Einstellungen: Sensitivity 50, Operator size 21 oder 29, Noise factor 7 oder 9 und Background 100) und die anschließende „Spot measurement“ (Einstellungen: Min spot area 30 und Split factor 9) führten zur Erkennung und Quantifizierung einzelner Spots in den Bildern (Abb. 6A und Abb. 6B). Mit der Funktion „Spot editing“ wurden die erkannten Spots manuell nachbearbeitet. Dicht beieinander liegende, als ein Spot erkannte Spots wurden getrennt. Nicht erkannte aber vorhandene Spots wurden hinzugefügt (nicht gezeigt) sowie falsch erkannte Spots (Streifen/Schmier) wurden gelöscht (rote Pfeile in Abb. 6C und Abb. 6D). Nach dem Festlegen des Referenzgels, normalerweise das Kontrollgel des Experimentes, wurden die Gele miteinander durch die Software verglichen, das heißt, die zueinander gehörigen Spots im Muster zweier Gele wurden durch die Software gesucht. Das Setzen von „User seeds“, von Markern für zueinander gehörende Spots nach visuellen Vergleich beider Gele, erleichtert und beschleunigt diesen Vorgang (Abb. 6E, rote Spots sind Referenzspots, blaue Spots sind Spots des Geles, das verglichen werden soll).

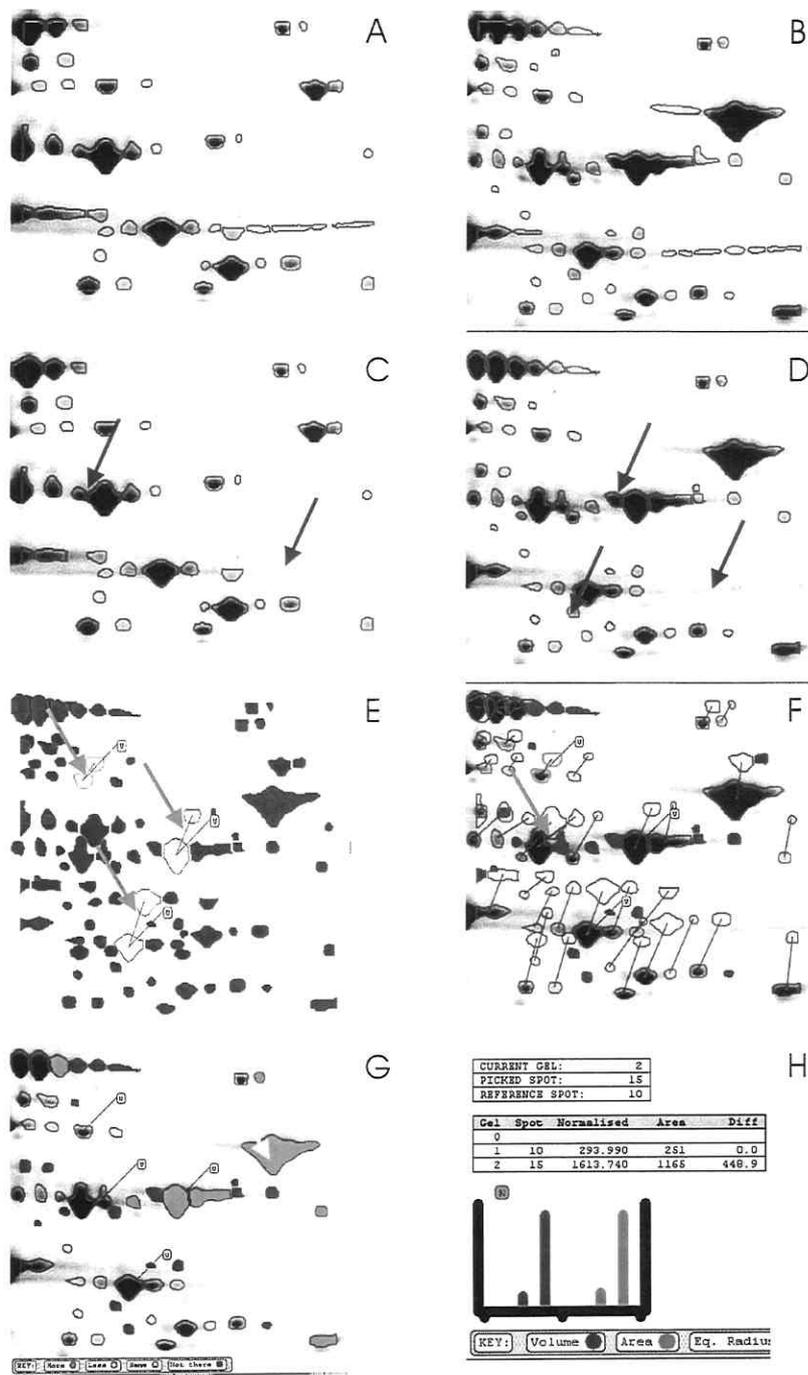


Abb. 6: Schritte bei der Auswertung und beim Vergleich zweidimensionaler Proteinmuster mit der Phoretix 2D Full Software (NonLinear Dynamics Ltd.). Weitere Erläuterungen siehe Text im Abschnitt 2.4.3.

Unkorrekt zugeordnete Spots bzw. Regionen wurden an nicht parallelen Vektoren oder Vektoren mit unterschiedlicher Länge innerhalb einer Region erkannt (Abb. 6F). Dies konnte durch das Einfügen weiterer „User seeds“ korrigiert werden. Spots bzw. die entsprechenden Proteine, deren Menge sich im Verhältnis zur Gesamtmenge aller Proteine eines Gels nach Einwirkung eines Stressors im Vergleich zur Kontrolle mindestens verdoppelt hatten (Abb. 7), wurden als verstärkt betrachtet (grün gefüllte Spots in Abb. 6G). Spots bzw. die entsprechenden Proteine, die in der Kontrolle nicht vorhanden waren, wurden als neu betrachtet und sind in Abb. 6G blau ausgefüllt.

$$\text{Verstärkungsfaktor} = \frac{\frac{\text{Menge eines Proteins im behandelten Gel}}{\text{Menge aller Proteine im behandelten Gel}}}{\frac{\text{Menge eines Proteins im Kontrollgel}}{\text{Menge aller Proteine im Kontrollgel}}}$$

**Abb. 7: Berechnung der Verstärkung eines Proteins**

Die Daten einzelner Spots oder aller Spots können graphisch und tabellarisch dargestellt werden (Abb. 6F). Um die Datenmengen, hervorgerufen durch die große Anzahl an Spots, zu bewältigen, wurde das Ergebnis mit Hilfe gezielter Suchfunktionen und Darstellungsoptionen mit der Phoretix 2D Database (NonLinear Dynamics Ltd.) analysiert. Neue und verstärkte Spots, die mit Hilfe der Datenbank gefunden wurden, wurden noch einmal auf korrektes Matching und eine korrekte Quantifizierung überprüft. Eventuell fehlerhaft ausgewählte Spots wurden aus den Suchergebnissen entfernt. Die Eichung des Molekulargewichte und des isoelektrischen Punkte der Proteine erfolgte durch interne Standardproteine, deren Molekulargewichte und isoelektrische Punkte vorher mit Hilfe des 2D-SDS Page Standards (Bio-Rad) bestimmt wurden.

#### **2.4.4 Auswertung von Dot-Blots**

Die Auswertung der Dot-Blots erfolgte mit der Phoretix Array Software (NonLinear Dynamics Ltd.). Die Intensität der einzelnen Dots wurde quantifiziert und die Verstärkung bezogen auf den Kontrollwert berechnet.

#### **2.5 N-terminale Sequenzierung von Proteinen und Datenbankrecherche**

Die Proteinspots von Interesse wurden aus den Coomassie Brilliant Blau R250 gefärbten Western Blots ausgeschnitten. Die Proteine wurden von Dr. Bär (Institut für Biochemie, Universitätsklinikum, Universität Leipzig) mit einem model 473A protein sequencer (Applied Biosystems Inc.) sowie von Dr. A. Dubin und Dr. P Mak (Biocentrum Krakow, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Polen) mit dem Proteinsequencer Procise ABI491 (Applied Biosystems-Perkin Elmer) sequenziert.

Um die Funktion eines N-terminal sequenzierten Proteins zu ermitteln, wurde in Datenbanken nach Proteinen mit ähnlichen Sequenzen gesucht. Der im Internet angebotene Suchdienst Bicsw (Compugen's Bic2's Smith & Waterman algorithm implementation for protein database

searches; [http://www2.ebi.ac.uk/bic\\_sw/](http://www2.ebi.ac.uk/bic_sw/)?) wurde verwendet, da er eine Suche in mehreren Datenbanken (SWISS-PROT, TREMBL, SWISSNEW und TREMBLNEW) gleichzeitig ermöglicht.

## 2.6 Messung von physiologischen Parametern

### 2.6.1 Bestimmung der Überlebensrate gegenüber lethalem Streß

Zellsuspensionen von *Acinetobacter calcoaceticus*, die unter verschiedenen Streßbedingungen vorinkubiert wurden, wurden  $10^{-3}$  verdünnt. Vor der Zugabe von  $H_2O_2$  mit einer Endkonzentration von 2 mM wurden Kontrollproben entnommen, nochmals  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  verdünnt und je 100  $\mu$ l auf Standardagarplatten 310 mg Phosphat/l pH 7 mit 0,22 % Acetat ausplattiert. Nach 3, 6 und 10 min Inkubation mit  $H_2O_2$  wurden Proben entnommen und genauso wie die Kontrollen ausplattiert. Nach 48 h Inkubation in einem Brutschrank bei 30°C wurde die Zahl der Kolonien, die der Zahl der teilungsfähigen Zellen entspricht, gezählt. Die Überlebensrate zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde in Prozent bezogen auf die Kontrolle angegeben.

### 2.6.2 Messung der Katalase

Die Enzymaktivität der Katalase wurde im Rohextrakt gemessen. Das Gesamtvolumen des Enzymtests betrug 300  $\mu$ l. Es wurden maximal 200  $\mu$ l unverdünnter Rohextrakt eingesetzt. Die Differenz zu 200  $\mu$ l wurde mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7 aufgefüllt. Der Test wurde mit 100  $\mu$ l 30 mM  $H_2O_2$  in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 gestartet. Die Änderung der Extinktion in einer 1 cm Küvette wurde in einem Spektrometer (Shimadzu, UV-210PC) bei 240 nm über 1 min verfolgt. Die Aktivität in U/mg ( $\mu$ mol/min/mg) wurde aus der Abnahme von  $H_2O_2$  unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{240} = 0.00394$  l/mmol/mm) im Zeitraum von 10 - 30 s berechnet.

### 2.6.3 Messung der Atmungsraten

Die Atmungsraten von Zellsuspensionen wurde bei 30°C mit einer polarographischen Sauerstoffelektrode (Cyclobios Oxygraph, A. Paar KG, Österreich) in 1 ml 20 mM Imidazolpuffer pH 7 gemessen. Der Puffer wurde während der Messung gerührt. Zum Puffer wurden 20  $\mu$ l Zellsuspension (Trockengewicht 6 - 8 mg/ml) gegeben und für mindestens 1 min die endogene Atmung verfolgt (Loffhagen et al., 1997). Die Hemmung der durch 0,22 % Acetat stimulierten Atmung wurde nach Zugabe der Chemikalien Ethanol, Butanol, Hexanol Catechol und Phenol mit verschiedenen Endkonzentrationen ermittelt.

### 2.6.4 Messung der ATP-Synthese

Für die Messung der ATP-Synthese wurde *Acinetobacter calcoaceticus* auf 0,22 % Acetat in Standardnährlösung kultiviert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 - 0,7 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 x g geerntet und anschließend zweimal mit Wasser

gewaschen. Die Zellen wurden in 20 mM Imidazolpuffer pH 7 aufgenommen und ein Trockengewicht von 6 - 8 mg/ml eingestellt. In je 2 ml der Zellsuspension wurden als Energiequelle 0,22 % Acetat, als Stickstoffquelle 0,15 % Ammoniumchlorid und die Chemikalien Ethanol, Butanol, Hexanol Catechol und Phenol in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Sie wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben 30 min bei 250 U/min und 30°C inkubiert. Die Extraktion aus den Zellen und die Messung des ATP erfolgte wie bei Loffhagen et al. (1997) angegeben. Dazu wurde die Inkubation der Zellsuspensionen durch Mischen mit 1 ml eiskalter 1,3 M Perchlorsäure, die 23 mM EDTA enthielt, gestoppt. Nach 30 min bei 4°C wurde der Zellextrakt 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde mit 0,72 M KOH, die 0,16 M KHCO<sub>3</sub> enthält, neutralisiert und nochmals wie oben zentrifugiert. Die ATP-Konzentrationen in den Überständen wurde über die Luciferin-Luciferase-Reaktion durch Vermessung der Biolumineszenz in einem LKB Wallac Luminometer 1250 bestimmt. Die Reaktionsküvette enthielt 750 µl 20 mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer (mit 2 mM EDTA und 10 mM MgSO<sub>4</sub>) und 20 µl des verdünnten Überstandes. Im Küvettenschacht wurden 250 µl der gelösten Luciferin-Luciferase Mischung (ATP-Lumineszenz CLS, Boehringer, Mannheim) zugegeben und die maximale Lichtintensität aufgezeichnet. Die Löschung der Biolumineszenz durch Bestandteile des Perchlorsäureextraktes wurde durch die Zugabe eines internen ATP-Standards (Lundin und Thore 1975) bestimmt und bei der Berechnung berücksichtigt (Abb. 8). Dabei ist I<sub>1</sub> der Wert der Probe allein und I<sub>2</sub> der Wert der Probe gemeinsam mit dem zugegebenem ATP-Standard (C<sub>st</sub>).

$$C_{\text{ATP}} = \frac{C_{\text{st}} \times I_1}{I_2 - I_1}$$

**Abb. 8: Berechnung der ATP-Konzentration unter Berücksichtigung eines internen ATP-Standards Standards (Lundin und Thore 1975)**

## 2.7 Chemikalien

Wenn nicht in Tab. 6 angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma MERCK bezogen. Alle Chemikalien wurden mit der Reinheit „zur Analyse“ verwandt. Zur Herstellung wässriger Lösungen wurde immer Reinstwasser verwandt.

**Tab. 6:** Liste der Chemikalien und der Hersteller

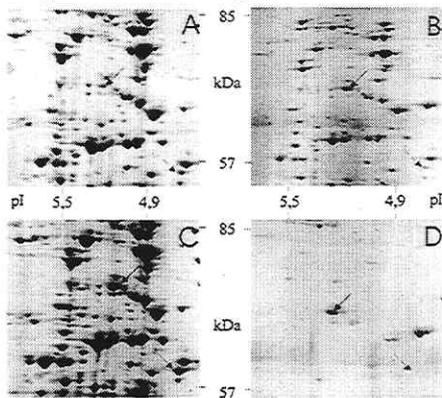
Hersteller	Substanz
SERVA	Rinderserumalbumin
Pharmacia Biotech	IPG-Puffer 4-7 L, IPG-Puffer 3-10 NL
Bio-Rad Laboratories	Bio-Lyte 5/7 ampholyte, Bio-Lyte 3/10 ampholyte
ICN Biomedicals	NP40
SIGMA	3,3'-Diaminobenzidin
RIEDEL-de HAEN	Formaldehyd

### 3 Ergebnisse

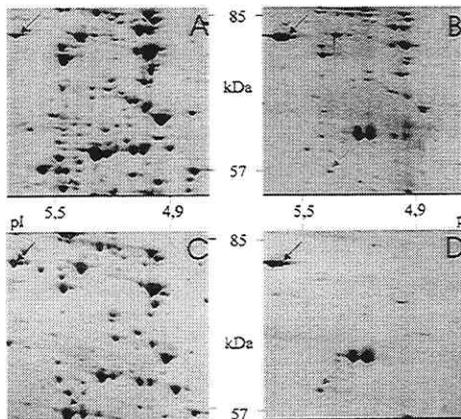
#### 3.1 Nachweis von Proteinen in zweidimensionalen Proteinmustern

##### 3.1.1 Nachweis von Proteinen durch Mustervergleich

Nach Einwirkung von  $H_2O_2$  oder Catechol und nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase konnten zwei verschiedene Katalasen in der nativen Elektrophorese nachgewiesen werden (siehe 3.3.2.3 und 3.4.2.2.2).



**Abb. 9: Identifizierung der durch  $H_2O_2$  induzierten Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern.** IEF mit Trägerampholyten. A: Wachstum auf Acetat (Kontrolle), B: Wachstum auf Acetat (Kontrolle) +  $3,75\mu g$  Eluat der  $H_2O_2$  induzierten Katalase aus einer nativen Elektrophorese, C: Wachstum auf Acetat und 60 min Catecholstreß, D:  $8\mu g$  eluiertes Protein aus der Bande der  $H_2O_2$  induzierten Katalase einer nativen Elektrophorese. Schwarzer Pfeil:  $H_2O_2$  unduzierbare Katalase. Grauer Pfeil: anderes durch Catechol induziertes Protein.



**Abb. 10: Identifizierung der stationären Phase-Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern.** IEF mit Trägerampholyten. A: Wachstum auf Acetat (Kontrolle), B: Wachstum auf Acetat (Kontrolle) +  $8\mu g$  Eluat der Stationären-Phase-Katalase aus einer nativen Elektrophorese, C: 16 h Wachstum auf Acetat (stationäre Phase), D:  $3,75\mu g$  eluiertes Protein aus der Bande der Stationären-Phase-Katalase einer nativen Elektrophorese. Schwarzer Pfeil: stationäre-Phase-Katalase. Grauer Pfeil: anderes durch Stationäre-Phase induziertes Protein.

Um die Positionen beider Katalasen im zweidimensionalen Gel bestimmen zu können, wurden im Anschluß an eine präparative native Elektrophorese die beiden Banden, die eine Enzymaktivität enthielten, ausgeschnitten und das Eluat zu Zellextrakten nach Wachstum auf Acetat (Kontrolle) zugemischt. Durch Vergleich des zweidimensionalen Proteinmusters mit und ohne Eluat sowie des Eluates allein konnte ihre Position ermittelt werden. Der entsprechende Spots sollte folgende Bedingungen erfüllen:

1. Er kommt im Eluat vor.
2. Die Zugabe des Eluates zur Kontrolle führt zu seiner Verstärkung.
3. Außerdem ist er unter induzierenden Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle verstärkt.

Sowohl für die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbare Katalase (Abb. 9) als auch für die Stationäre-Phase-Katalase (Abb. 10) konnte je ein Spot ermittelt werden. Das Molekulargewicht der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbaren Katalase von *Acinetobacter calcoaceticus* ist ähnlich dem des homologen Proteins von *Escherichia coli* (Tab. 7), das mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese ermittelt wurde. Das Molekulargewicht der Stationären-Phase-Katalase von *Acinetobacter calcoaceticus* beträgt 80 kDa und entspricht damit in etwa dem errechneten Molekulargewicht der stationäre Phase-Katalase von *Escherichia coli*.

**Tab. 7: Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der Katalasen von *Acinetobacter calcoaceticus* und *Escherichia coli* in zweidimensionalen Proteinmustern.** Daten des Proteins P13029 aus SWISS-2DPAGE. \*pI/Molekulargewicht von P13029 und P21179 wurden rechnerisch aus den Aminosäuresequenzen mit dem EXPASY "Compute pI/Mw tool" ermittelt. HP: Abkürzung für Hydroperoxidase (Synonym für Katalase)

	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Escherichia coli</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzierbare Katalase	70; 5.23	P13029 (Proteinname: HPI, Genname: KatG) 74; 5.16 / 80; 5.14*
stationäre Phase-Katalase	80; 5.65	P21179 (Proteinname: HP1I, Genname: KatE) 84; 5.54*

### 3.1.2 Nachweis von Proteinen durch N-terminale Sequenzierung

Um die Funktion von Proteinen, die in Ergebnis der Auswertung der Streßexperimente typisch für diese Bedingungen waren, zu beschreiben, wurden ihre N-terminalen Aminosäuresequenzen bestimmt. Um möglichst ausreichend Protein für die Anforderungen der N-terminalen Sequenzierung zu haben, wurden die präparativen zweidimensionale Gele von Proben, in denen das betreffende Protein ausreichend induziert war (zum Beispiel: Hitzeschockproteine durch Hitzeschock), angefertigt und anschließend auf PVDF-Membranen geblottet (Abb. 11). Insgesamt wurden 9 Proteine sequenziert (Tab. 8 - Tab. 10), darunter waren 7 durch Streß induzierbare Proteine und 2 Proteine, die in *Acinetobacter calcoaceticus* konstitutiv exprimiert wurden. Zwei weitere Sequenzierungsversuche waren nicht erfolgreich, weil die Proteinmenge zu gering bzw. der ausgeschnittene Spot noch mit anderem Protein verunreinigt war. Die Länge der erhaltenen Sequenzen wurde ebenfalls durch die Menge und die Reinheit des Proteins beeinflusst.

**Tab. 8: N-terminale Aminosäuresequenzen von Hitzeshockproteinen.** Ausgeschnittene Spots aus gebliederten präparativen zweidimensionalen Gelen wurden durch Edmannabbau sequenziert. Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren; identische Aminosäuren mit Sequenzen aus Datenbanken. \*pI/Molekulargewicht wurden rechnerisch aus den Aminosäuresequenzen mit dem EXPASY "Compute pI/Mw tool" ermittelt. \*\* pI/Molekulargewicht wurden aus der Datenbank SWISS-2DPAQE entnommen.

Protein; Accession number	Mw (kDa); pI	Organismus (mit Stammbezeichnung)	% Identität
DnaK	71; 4,6	<i>Acinetobacter 204-I</i>	60
DnaK	70; 4,95*	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	72
DnaK; O32482	70; 4,81**	<i>Legionella pneumophila</i>	66
DnaK; P04475		<i>Escherichia coli</i>	
HspG; P56116	71; 5,41*	<i>Helicobacter pylori</i>	46
HspG	70; 4,75	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	53
Hsp82; P02829	89; 4,78**	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
GroEL	59; 4,82	<i>Acinetobacter 204-I</i>	55
GroEL	56; 5,03*	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	75
GroEL; P48216	57; 4,85**	<i>Pseudomonas putida</i>	66
GroEL; P06139		<i>Escherichia coli</i>	
ClpB; P44403	95,8; 5,26*	<i>Haemophilus influenzae</i>	55
ClpB	84; 5,21	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	50
ClpB; P03815	95,5; 5,37*	<i>Escherichia coli</i>	
	88,4; 5,3**/73,9; 5,38**		

1 G R I I G I D L G T T N S D V A V L D G 20	1 M S N Q E V T F Q T E I N Q 14
1 A K I I G I D G L F T N S W N A V L E S D K V H V 25	1 S E X A S Q N X S F Q A E V A Q 16
1 M A K I I G I D L G T T N S C V A V M E G D K P K V 26	1 M A S E T F E H Q A B I T Q 14
1 G K I I G I D L G T T N S C V A I M D 19	
1 A A K Q V K F S X D A R T R M A K G V D 20	1 A A K D V K F G D S A R K M L V G V N V L A D 24
1 S A K D V K F G D S A R S M I A G V N V I A D 24	1 M A A K D V K F G D S A R K M L V G V N V L A D 25
1 M A A K D V K F G D S A R K M L V G V N V L A D 25	1 A A K D V K F G I N D A R V K M L R G V N V L A D 24
1 M N I E K F T T K F E A L S E R Q S L 20	
1 M X F E X F T N R L Q A L S D A Q S L 20	
1 M R L D R L E I N K F Q L A L A D A Q S L 20	

**Tab. 9: N-terminale Aminosäuresequenzen durch oxidativen Streif induzierbarer Proteine.** Ausgeschnittene Spots aus geblotteten präparativen zweidimensionalen Gelen wurden durch Edmannabbau sequenziert. Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren: identische Aminosäuren mit Sequenzen aus Datenbanken. \*pI/Molekulargewicht wurden rechnerisch aus den Aminosäuresequenzen mit dem EXPASY "Compute pI/Mw tool" ermittelt. \*\* pI/Molekulargewicht wurden aus der Datenbank SWISS-2DPAGE entnommen.

Protein; Accession number	Mw (kDa); pI	Organismus (mit Stammbezeichnung)	% Identität
AhpF; O06465	56.9; 5.28*	<i>Xanthomonas campestris</i>	75
AhpF	56; 4.76	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	
AhpF; P35340; P77251; P77462	56.1; 5.47*	<i>Escherichia coli</i>	69
AhpC; O82863	20.5; 4.98*	<i>Pseudomonas putida</i>	64
AhpC	25; 4.78	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	
AhpC; O06464	20.4; 6.15*	<i>Xanthomonas campestris</i>	72

**Tab. 10: N-terminale Aminosäuresequenzen von degradativer und konstitutiver Proteine.** Ausgeschnittene Spots aus geblotteten präparativen zweidimensionalen Gelen wurden durch Edmannabbau sequenziert. Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren: identische Aminosäuren mit Sequenzen aus Datenbanken. \*pI/Molekulargewicht wurden rechnerisch aus den Aminosäuresequenzen mit dem EXPASY "Compute pI/Mw tool" ermittelt. \*\* pI/Molekulargewicht wurden aus der Datenbank SWISS-2DPAGE entnommen.

Protein; Accession number	Mw (kDa); pI	Organismus (mit Stammbezeichnung)	% Identität
CatA; P07773	34.3; 4.82*	<i>Acinetobacter calcoaceticus BD143/ADP1</i>	14
CatA	35; 4.76	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	
CatA; Q43984	33.6; 5.01*	<i>Acinetobacter calcoaceticus NCIB 82.50</i>	71
Rsl; P0234; P77352	65; 4.99**/42; 4.99**	<i>Escherichia coli</i>	90
Rsl	66; 4.89	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	
Rsl; Q48082	60; 5.13*	<i>Haemophilus influenzae</i>	71
AtpB; P43715	50; 4.96*	<i>Haemophilus influenzae</i>	75
AtpB	51; 4.96	<i>Acinetobacter calcoaceticus 69-V</i>	
AtpB; Q07232; O51872	51; 5.99*	<i>Buchnera aphidicola</i>	69

Mit Hilfe des Bic-sw Suchdienstes konnten für alle erhaltenen Sequenzen homologe Proteine in den Datenbanken (Swiss all) gefunden werden. Die Sequenzen zeigten 46 % (HtpG) bis 90 % (RS1) Identität zu homologen Proteinen anderer Bakterienspezies (Tab. 8 - Tab. 10). Die bestimmten Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der respektiven Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus* entsprechen mit wenigen Ausnahmen denen der homologen Proteine (Tab. 8 - Tab. 10).

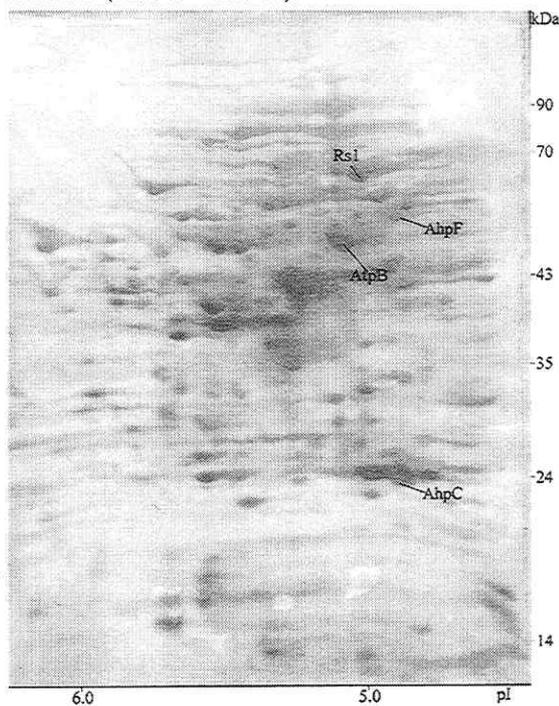


Abb. 11: Westernblot eines präparativen zweidimensionalen Gels. 1,5 mg Protein von *Acinetobacter calcoaceticus*, 60 min gewachsen in Gegenwart von 0,15 mM  $H_2O_2$ , wurden zur Trennung eingesetzt.

### 3.1.3 Nachweis von Proteinen durch spezifische Bindung polyklonaler Antikörper

#### 3.1.3.1 Einsatz kommerzieller polyklonaler Antikörper zum Nachweis der Proteinen GroEl und DnaK

Proteinproben von *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pseudomonas putida* aus der exponentiellen Wachstumsphase und nach Temperaturerhöhung wurden mittels eindimensionaler SDS-Elektrophorese getrennt und auf Nitrocellulosemembran geblottet. Bei der anschließenden Immunfärbung mit kommerziell verfügbaren polyklonalen Antikörpern, die gegen GroEl bzw. DnaK von *Escherichia coli* gerichtet sind, konnte in allen drei Organismen eine Bindung zu ihren Antigenen nachgewiesen werden (Abb. 12). Die Molekulargewichte der nachgewiesenen Proteine entsprechen mit 60 kDa bzw. 70 kDa den Werten für die Proteine GroEl und Dank von *Escherichia coli*. Bei *Escherichia coli* und

*Acinetobacter calcoaceticus* wurden außerdem noch einige Proteine mit niedrigeren Molekulargewicht gebunden. Sie deuten auf eventuelle Abbauprodukte von GroEl oder DnaK hin. Gegenüber den Proben aus der exponentiellen Phase hat sich nach Temperaturerhöhung die Menge der beiden Hitzeschockproteine erhöht.

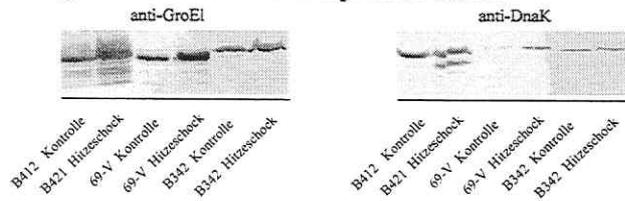


Abb. 12: Immunfärbung von GroEl und DnaK nach SDS-Elektrophorese zellfreier Extakte von *Escherichia coli* B421, *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V und *Pseudomonas putida* B342. ( $2\mu\text{g}$  primärer Antikörper / ml)

Um die Proteine GroEl und DnaK mit Hilfe der polyklonalen Antikörper eindeutig in zweidimensionalen Proteinmustern nachzuweisen, wurden Westernblots von zweidimensionalen Gelen vorübergehend mit Ponceau S zum Nachweis der Proteine gefärbt und anschließend die Immunfärbungen durchgeführt. Die Bindung der anti-GroEl-Antikörper erfolgte hauptsächlich an ein Protein mit 59 kDa (Abb. 13) und die Bindung der anti-DnaK-Antikörper an ein Protein mit 71 kDa (Abb. 14). Die Menge beider Proteine erhöhte sich in Antwort auf eine Temperaturerhöhung. Zusätzliche besonders nach einer Temperaturerhöhung neu erscheinende Spots könnten Abbauprodukte der beiden Proteine sein, die ebenfalls durch die Antikörper gebunden werden (Abb. 13 und Abb. 14). Ihre Positionen im Proteinmuster sind ähnlich den Positionen von Proteinen, die nach Temperaturerhöhung in zweidimensionalen silbergefärbten Proteinmustern als induzierte Proteine betrachtet wurden (siehe Abb. 40).

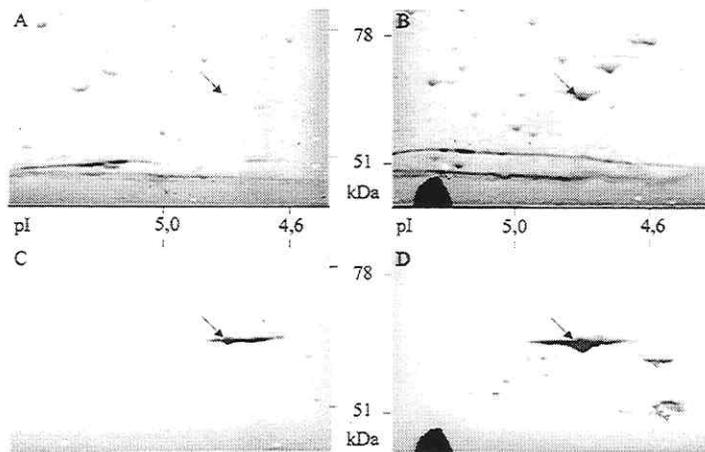
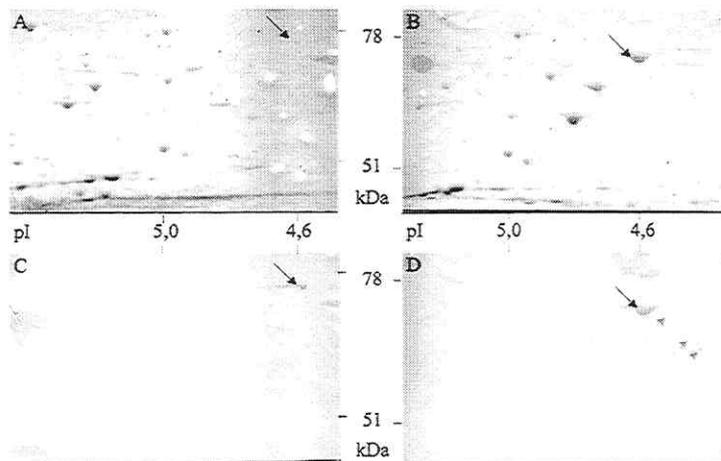
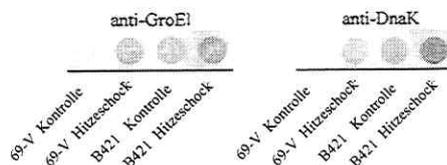


Abb. 13: Immunfärbung von GroEl in Westernblots zweidimensionaler Gele von *Acinetobacter calcoaceticus*.  $50\mu\text{g}$  Protein / Gel. A, C: Kontrolle. B, D: Temperaturerhöhung. A, B: Proteinfärbung mit Ponceau S. C, D: Immunfärbung mit polyklonalen Kaninchen anti-GroEl-Antikörpern ( $2\mu\text{g}$  primärer Antikörper / ml). Schwarze Pfeile: GroEl. Graue Pfeile: Isoformen von GroEl.



**Abb. 14: Immunfärbung von DnaK in Westernblots zweidimensionaler Gele von *Acinetobacter calcoaceticus*.** 50 µg Protein / Gel. A, C: Kontrolle. B, D: Temperaturerhöhung. A, B: Proteinfärbung mit Ponceau S. C, D: Immunfärbung mit polyklonalen Kaninchen anti-DnaK-Antikörpern (2µg primärer Antikörper / ml). Schwarze Pfeile: DnaK. Graue Pfeile: Isoformen von DnaK.

Die nachgewiesenen spezifischen Bindungen der Antikörper an ihre Antigene, die Hitzeschockproteine GroEl und DnaK von *Acinetobacter calcoaceticus*, ermöglichen den Nachweis und eine Quantifizierung auch ohne elektrophoretische Trennung. Die Immunfärbung wurde mit dem Protein zellfreier Extrakte, das direkt auf die Nitocellulosemembran geblottet wurde, durchgeführt. Nach Temperaturerhöhung war die Zunahme von GroEl und DnaK im Dot-Blot gut ersichtlich (Abb. 15).



**Abb. 15: Dot-Blot zellfreier Extrakte von *Escherichia coli* B421, *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V mit anschließender Immunfärbung.** 25 µg Protein / Dot

### 3.1.3.2 Herstellung und Einsatz polyklonaler Antikörper zum Nachweis der Proteine ClpB und AhpC

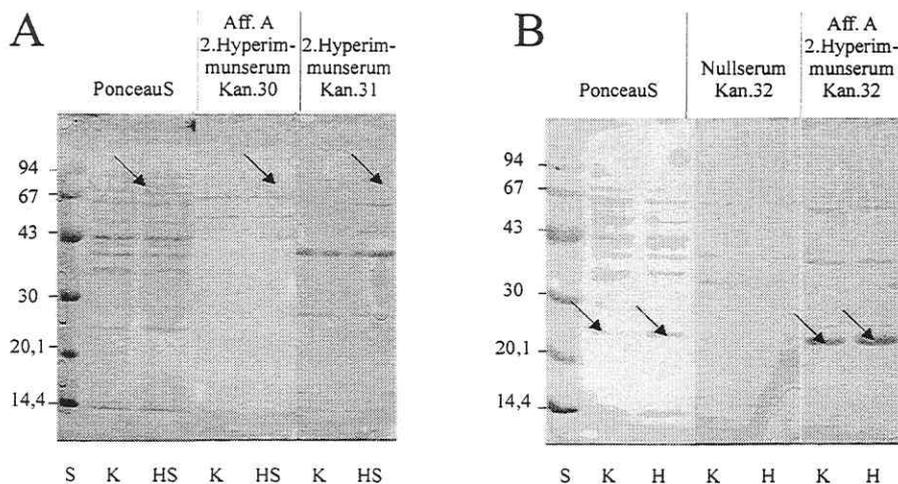
Die Proteine AhpC und ClpB wurden ausgewählt, um Antikörper zu gewinnen, die anschließend als Biomarker für Chemostreß in *Acinetobacter calcoaceticus* genutzt werden sollten. Die Peptidsynthese, die Immunisierung und die ELISA-Tests wurden von der Firma pepScan Immunoanalytik als Dienstleistung erbracht. Basierend auf den N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden zwei Peptide mit 15 Aminosäuren synthetisiert, über das C-terminale Ende an KLH gekoppelt (Tab. 11) und je zwei Kaninchen immunisiert. Bei den

ELISA-Tests (nicht gezeigt) konnte in den zweiten Hyperimmunseren aller Kaninchen eine Reaktivität gegenüber den zur Immunisierung eingesetzten Peptiden gemessen werden. Die Titer der mit dem Peptid PE0416 (ClpB) behandelten Kaninchen waren mit einem Wert von 1:100.000 deutlich höher als die Titer der mit dem Peptid PE0417 (AhpC) behandelten Kaninchen mit Werten von 1:4000 und 1:16000. Die zweiten Hyperimmunseren mit dem höchsten Antikörpertiter gegenüber den Peptiden wurden zur Protein A – Affinitätsreinigung eingesetzt, um die IgG- Fraktion zu isolieren (pepScan Immunoanalytik).

**Tab. 11: N-terminale Proteinsequenzen der Proteine ClpB und AhpC und die zur Herstellung von Antikörpern ausgewählten Peptidsequenzen.**

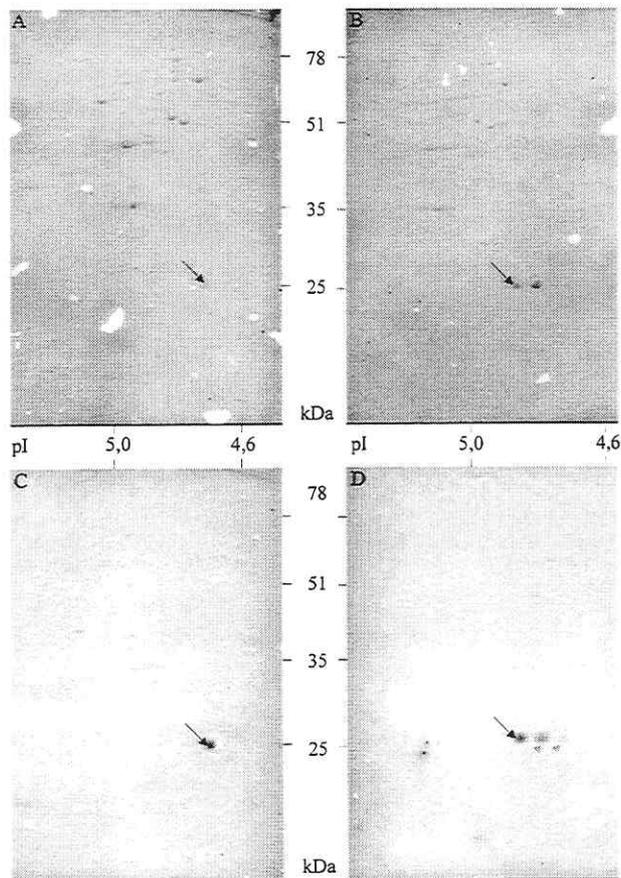
Organismus (mit Stammbezeichnung)	Sequenz
N-Terminus ClpB <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V Peptid PE0416	1 M X F E X F T N R L O O A L S D A O S L 20 1 T N R L Q Q A L S D A Q S L C 15
N-Terminus AhpC <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69-V Peptid PE0417	1 S L I N T E V K P P F O A T A Y H N G O F V E V N E 25 1 S L I N T E V K P P Q A T A C 15

Die Affinität der Protein A gereinigten Antikörper wurde in Westernblots von eindimensional getrennten Proteinen getestet (Abb. 16). Die gegen das von ClpB abgeleitete Peptid gerichteten Antikörper (Aff. A gereinigtes 2.Hyperimmunserum Kan. 30) zeigten trotz des hohen Titers im ELISA-Test keine Bindung, obwohl in der Proteinfärbung mit Ponceau S die entsprechende Bande nach Erhöhung der Wachstumstemperatur im Westernblot sichtbar war (Abb. 16A).



**Abb. 16: Immunfärbung zum Nachweis der Proteine ClpB (A) und AhpC (B) von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V mit in Kaninchen hergestellten anti-Seren in eindimensionalen Proteinmustern. 25 µg Protein / Spur; S: Molekulargewichtsstandard. K: Kontrolle; HS: Hitzeschock; H: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 10 µg primärer Antikörper / ml wurden eingesetzt.**

Der Test mit dem zweiten Hyperimmunserum des anderen Kaninchens (Kan. 30) zeigte eine schwache Bindung am Zielprotein ClpB, die aber in einem ungünstigen Verhältnis zur Bindung anderer Proteine durch die Antikörper steht (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu weisen die Protein A gereinigten Antikörper, die gegen das von AhpC abgeleitete Peptid gerichtet sind, eine deutliche Immunreaktion im Westernblot auf (Abb. 16B). Der Anteil an unspezifischen Wechselwirkungen ist gering. Da das Nullserum keine Bindung zeigte, wurde die Affinität des Antikörper durch die Immunisierung verursacht (Abb. 16B). Nach Inkubation mit  $H_2O_2$  ist im Vergleich zur Probe nach exponentiellem Wachstum auf Acetat eine Verstärkung der Bande des Proteins AhpC auch im immunefärbten Westernblot nachweisbar. Bei der Immunfärbung von geblotteten zweidimensionalen Gelen gegen AhpC (Abb. 17) stellte sich heraus, daß in Antwort auf die Einwirkung von  $H_2O_2$  gegenüber der Kontrolle zwei weitere Proteinspots mit identischen Molekulargewicht von den Antikörpern gebunden wurden.



**Abb. 17: Immunfärbung von AhpC in Westernblots zweidimensionaler Gele von *Acinetobacter calcoaceticus*. 50  $\mu$ g Protein / Gel. A, C: Kontrolle. B, D: Einwirkung von  $H_2O_2$ . A, B: Proteinfärbung mit Ponceau S. C, D: Immunfärbung mit polyklonalen Kaninchen anti-AhpC-Antikörpern (10  $\mu$ g/ml) als primären Antikörper. Schwarze Pfeile: AhpC. Graue Pfeile: Isoformen von AhpC.**

Die isoelektrischen Punkte sind gegenüber dem ersten Spot um etwa 0,1 und 0,2 pI-Einheiten in den sauren pH-Bereich verschoben. Der Vergleich der Immunfärbung mit der Proteinfärbung derselben Blots und silbergefärbten Proteinmuster (Abb. 36 und Abb. 37) zeigt, daß der mittlere Spot, welcher nach Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowohl in der Protein- als auch in der Immunfärbung in großer Menge neu erscheint, mit dem Spot identisch ist, von dem ursprünglich die N-terminale Aminosäuresequenz ermittelt wurde. Die Affinität der Antikörper zu der „mittleren“ Isoform ist geringer als die zur „linken“ Isoform, was sich im veränderten Verhältnis zwischen Anfärbbarkeit durch die Proteinfärbung Ponceau S und durch die Immunfärbung äußert.

### **3.2 Einfluß von Chemikalien und von Temperaturerhöhung auf die Wachstumsrate, Atmungsrate und ATP-Synthese von *Acinetobacter calcoaceticus***

Der Einfluß verschiedener Chemikalien und einer Temperaturerhöhung auf die Wachstumsrate, die Atmungsrate und die ATP-Synthese wurde mit Zellen getestet, die sich zu Testbeginn in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden. Ihr Einfluß auf die Wachstumsrate wurde über einen Zeitraum von einer Stunde anhand der Messung der optischen Dichte der Kulturen bestimmt. Die Inkubation von *Acinetobacter calcoaceticus* für die anschließende Messung der Atmung und für die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte in einer aufkonzentrierten Zellsuspension, die Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle enthielt. Sowohl die Messung der Atmungsaktivität als auch die Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde nach 30 min Inkubation durchgeführt. Die Einwirkung aller Chemikalien führte bereits bei den niedrigsten Konzentrationen zu einer Verringerung der Wachstumsraten (Abb. 18). Mit Ausnahme von Phenol hemmten die höchsten Konzentrationen der Chemikalien das Wachstum vollständig. Abgesehen von Ethanol und Butanol verursachten alle Konzentrationen der eingesetzten Chemikalien ebenfalls eine Hemmung der Atmungsaktivität (Abb. 18). Die Stimulierung der Atmung bzw. ihre geringe Hemmung nach Einwirkung von Ethanol und Butanol ist nicht auf eine Veratmung dieser Substanzen zurückzuführen. Wahrscheinlich veränderten die hohen Mengen beider Substanzen die Löslichkeit von Sauerstoff im Meßpuffer so stark, daß dadurch die gemessenen Atmungsraten verfälscht wurden. Die ATP-Gehalte liegen zwischen 72 % und 43 % der Kontrolle für die jeweils niedrigsten Konzentrationen der Chemikalien und zwischen 41 % und 23 % der Kontrolle für die jeweils höchsten Konzentrationen der Chemikalien (Abb. 18). Bei fast allen Substanzen verliefen die Hemmungen von Wachstum, Atmung und ATP-Synthese „parallel“. Nur die Einwirkung von Catechol hatte einen stärkeren Hemmeffekt auf das Wachstum als auf die Atmung und die ATP-Synthese. Die Erhöhung der Temperatur auf 42°C und 45°C führt zur Reduzierung des ATP-Gehaltes auf etwa 45%. Nach Inkubation bei 48°C war fast kein ATP mehr meßbar (5 %).

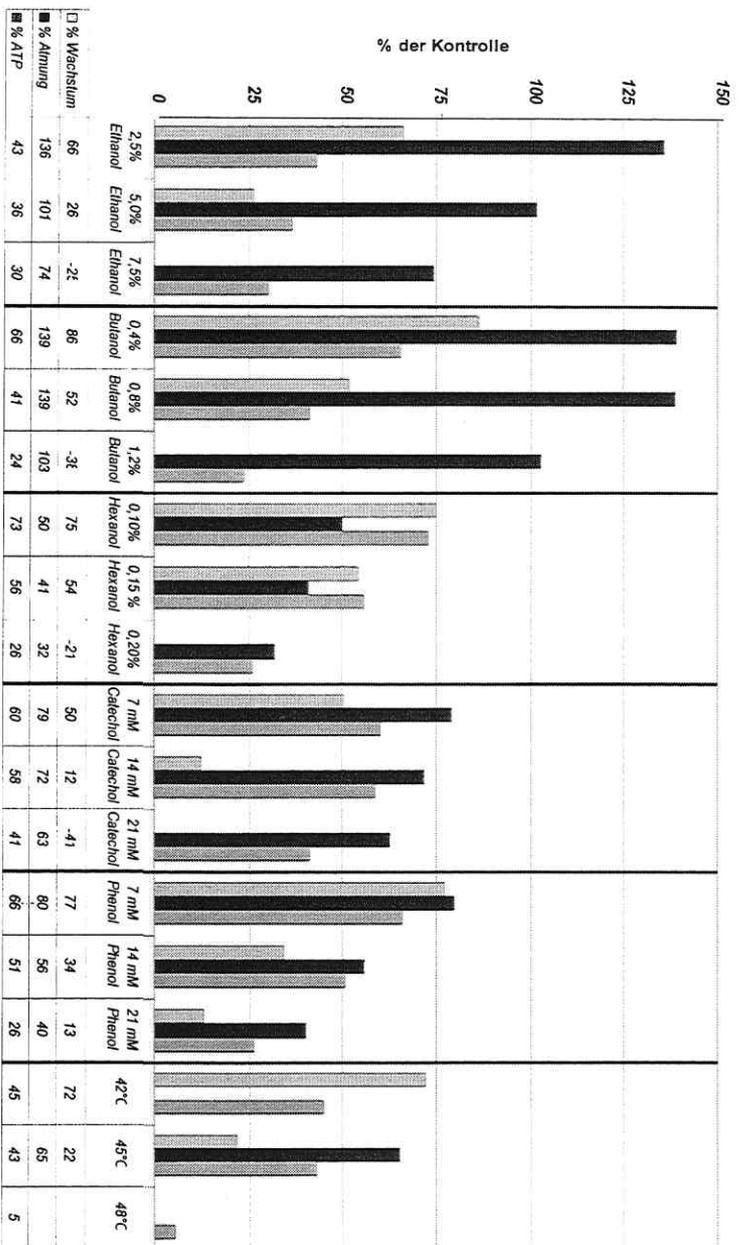


Abb. 18: Hemmung des Wachstums auf Acetal, der Atmung und der ATP-Synthese von *Acinetobacter calcoaceticus* durch Xenobiotika. Negative Werte in Zeile Wachstum: vollständige Hemmung des Wachstums (Abnahme der optischen Dichte bei 700 nm). Zellen ohne Inhalt. Werte wurden nicht bestimmt.

### 3.3 Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Chemostreß in Anwesenheit von Xenobiotika

#### 3.3.1 Einfluß von primären Alkoholen und Temperaturerhöhung

##### 3.3.1.1 Einfluß auf das Wachstum

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde auf 0,22 % Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle bei 30 °C kultiviert. Nachdem die Kulturen die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurden verschiedene Mengen primärer Alkohole zugesetzt oder die Wachstumstemperatur der Kultur auf 45°C erhöht. Die Einwirkung der primären Alkohole und der erhöhten Temperatur führte zur Verringerung der Wachstumsrate (Abb. 19, Temperaturerhöhung wird nicht gezeigt). Mit steigender Konzentration der primären Alkohole nahm die Hemmung des Wachstums zu. Konzentrationen ab 7,5 % Ethanol, 2% Butanol oder 0,15 % Hexanol verursachten eine vollständige Hemmung des Wachstums.

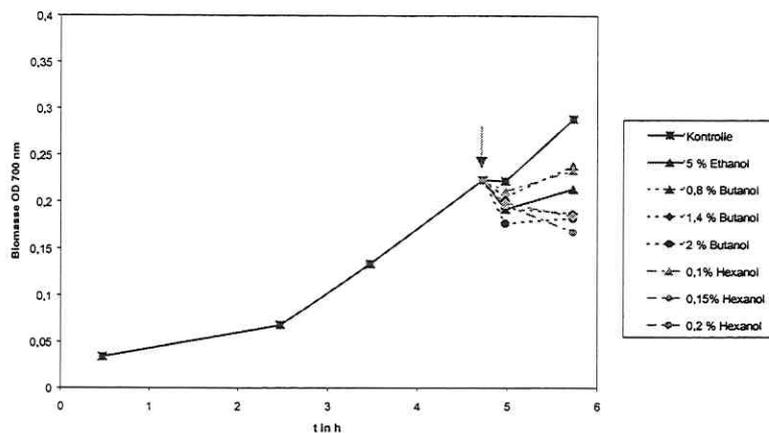


Abb. 19: Hemmung des Wachstums von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Acetat durch primäre Alkohole und Temperaturerhöhung. Pfeil: Einwirkungsbeginn.

Außer bei Butanol sind die dazugehörigen Konzentrationen in der Lipidschicht der cytoplasmatischen Membran mit Werten um 0,2 M ähnlich groß (Tab. 12). Die Berechnung der Membrankonzentration erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Konzentration der primären Alkohole und ihren Verteilungskoeffizienten  $\log k_{\text{Membran/Puffer}}$  zwischen Lipid der Membran und der wässrigen Phase. Der  $\log k_{\text{Membran/Puffer}}$  wurde aus dem Verteilungskoeffizient  $\log k_{\text{Ok tan ol/Wasser}}$  zwischen Oktanol und Wasser berechnet (Abb. 20).

$$\log k_{\text{Membran/Puffer}} = 0,97 \times \log k_{\text{Ok tan ol/Wasser}} - 0,64$$

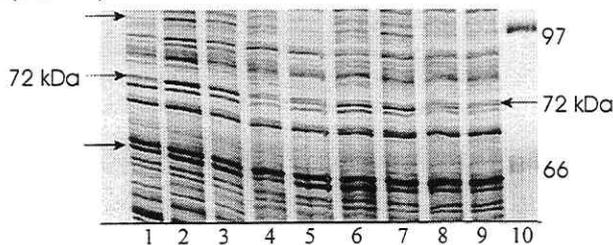
Abb. 20: Berechnung des Verteilungskoeffizienten primärer Alkohole zwischen Membran und Puffer. (Sikkema et al., 1994).

**Tab. 12: Membrankonzentration primärer Alkohole, Wachstumshemmung und Menge des 72 kDa Proteins (siehe 3.3.1.2) von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von primären Alkoholen und Temperaturerhöhung**

	zugegebener Alkohol in %	Molare Konzentration in Wasser [M]	Molare Konzentration in der Membran [M]	Wachstumsrate in % der Kontrolle	Induktion des 72 kDa Proteins bezogen auf die Kontrolle
Ethanol	2,5	0,543	0,07	68	1,4
	5	1,087	0,13	41	1,9
	7,5	1,630	0,20	kein Wachstum	1,4
Butanol	0,8	0,108	0,18	58	2,1
	1,4	0,189	0,31	12	0,4
	2	0,270	0,44	kein Wachstum	0,4
Hexanol	0,1	0,010	0,15	39	1,5
	0,15	0,015	0,22	kein Wachstum	1,4
	0,2	0,020	0,29	kein Wachstum	0,5
Hitzeschock	-	-	-	22	2,6

### 3.3.1.2 Einfluß auf die Proteinmuster

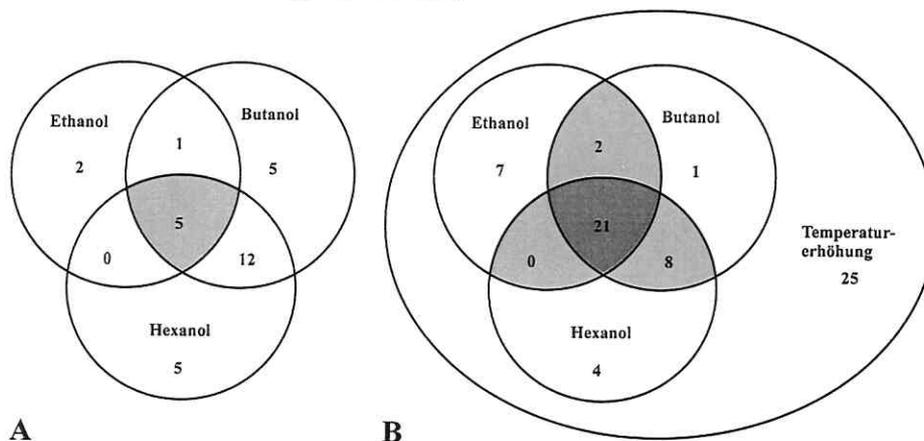
Nach der Inkubation der Kulturen mit primären Alkoholen und Temperaturerhöhung wurde die Biomasse geerntet und die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Die in den zellfreien Extrakten enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Elektrophorese getrennt. In den erzeugten eindimensionalen silbergefärbten Proteinmustern wurden gegenüber der Kontrolle verstärkte Banden (Abb. 21) nachgewiesen. Eine besonders auffällige Bande mit dem Molekulargewicht von 72 kDa wurde quantifiziert. Die anhand der respektiven  $\log k_{\text{Membran / Puffer}}$  kalkulierten Membrankonzentrationen primärer Alkohole, die zur maximalen Induktion des 72 kDa Proteins führten, sind mit Werten zwischen 0,13 - 0,18 M sehr ähnlich (Tab. 12).



**Abb. 21: Induktion von Proteinen durch primäre Alkohole und Temperaturerhöhung in *Acinetobacter calcoaceticus*.** Ausschnitt aus einem silbergefärbten eindimensionalen Proteinmuster ( $1\mu\text{g}$  / Spur). Spur 1: Kontrolle, Spur 2: 5 % Ethanol, Spur 3: 0,8 % Butanol, Spur 4: 1,4 % Butanol, Spur 5: 2 % Butanol, Spur 6: 0,05 % Hexanol, Spur 7: 0,1 % Hexanol, Spur 8: 0,15 % Hexanol, Spur 9: 0,2 % Hexanol, Spur 10: Molekulargewichtsstandard (BIO-RAD SDS Low-Range).

Die Proteinproben von *Acinetobacter calcoaceticus*, bei denen die stärksten Veränderungen in eindimensionalen Proteinmuster beobachtet wurden (5 % Ethanol, 0,8 % Butanol, 0,1 % Hexanol und Temperaturerhöhung), wurden mit Hilfe der zweidimensionalen

Gelelektrophorese getrennt. In den silbergefärbten zweidimensionalen Proteinmustern wurden mindestens 91 zweifach verstärkte oder neu synthetisierte Proteine nachgewiesen (Abb. 23-Abb. 27, Seiten 42 - 44). 21 Proteine wurden durch alle Streßarten generell induziert (Abb. 22). Im Vergleich zur Temperaturerhöhung, bei der 25 spezifisch induzierte Proteine nachgewiesen wurden, ist die Zahl der nur durch einen Alkohol spezifisch induzierten Proteine geringer (2-5, Abb. 22A). Neben den spezifischen und den generell durch einen Streß induzierten Proteinen gibt es noch zwei weitere Gruppen von Proteinen. Zur ersten Gruppe gehören 7 (gelb, Abb. 22B) Proteine, die gemeinsam durch Temperaturerhöhung oder Ethanol induziert wurden, während zur zweiten Gruppe 8 durch Butanol, Hexanol oder Temperaturerhöhung induzierte Proteine gehören (Abb. 22B). Außerdem existiert noch eine größere Gruppe von 12 Proteinen, die allein durch die beiden höheren Alkohole Butanol und Hexanol induziert wurden (gelb, Abb. 22A).

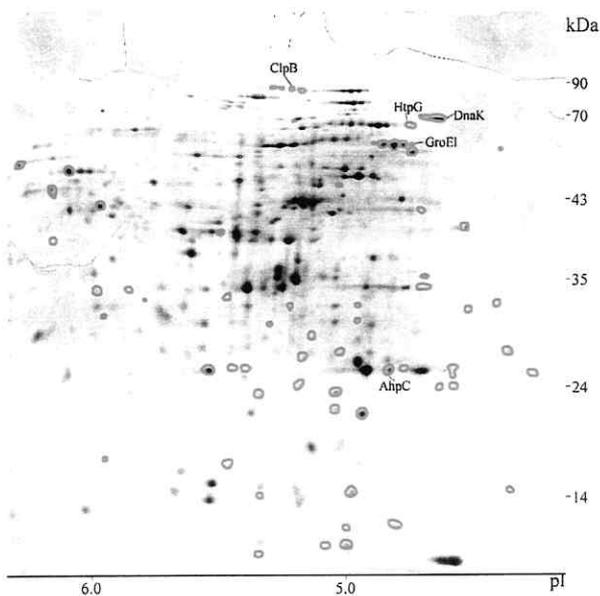


**Abb. 22: Generell (blau), dreifach (grün), zweifach (gelb) und spezifisch (weiß) induzierte Proteine in *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von primären Alkoholen. In Abbildung A werden nur Proteine dargestellt, die nicht durch Temperaturerhöhung induziert wurden. In Abbildung B werden nur Proteine dargestellt, die auch durch Temperaturerhöhung induziert wurden.**

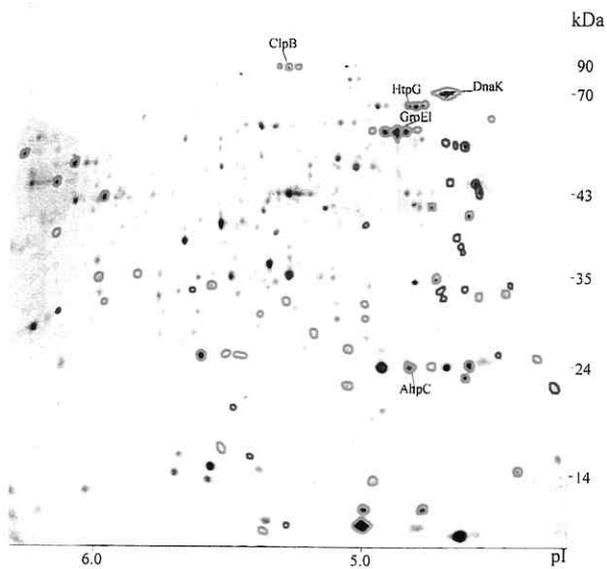
Von den in den Proteinmustern induzierten Proteinen wurden die Funktion von 5 Proteinen mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 29) nachgewiesen. Zu ihnen gehörten die 4 Hitzeschockproteine GroEl, DnaK, HtpG, ClpB sowie das durch oxidativen Streß induzierbare Protein AhpC. Das im eindimensionalen Proteinmuster nach Einwirkung von primären Alkoholen und nach Temperaturerhöhung auffällige Protein ist das Hitzeschockprotein DnaK. Die Induzierbarkeit der meisten Proteine nahm mit zunehmender Kettenlänge der primären Alkohole ab (Tab. 13). Das Hitzeschockprotein GroEl wurde außer durch Temperaturerhöhung allein durch Ethanol induziert. Die anderen Hitzeschockproteine wurden durch alle eingesetzten primären Alkohole induziert. Das oxidative Streß Protein AhpC wurde sowohl durch Temperaturerhöhung als auch durch alle primären Alkohole induziert. Die größten Induktionsraten wurden bei den Proteinen HtpG und ClpB gefunden, die unter Kontrollbedingungen mit einem geringen Grundniveau vorkamen (nicht gezeigt).

**Tab. 13: Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von primären Alkoholen und Temperaturerhöhung.** Hellgrau: mindestens 2fach induziert. Dunkelgrau: mindestens 10fach induziert.

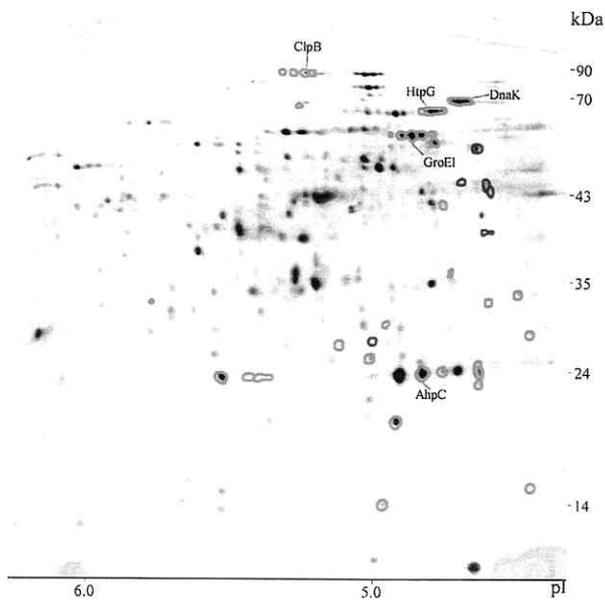
	GroEl	DnaK	HtpG	ClpB	AhpC
MW	60	72	67	84	26
pI	4,79	4,65	4,73	5,21	4,77
Temperaturerhöhung	3,2	5,3	15,5	12,0	5,5
5 % Ethanol	2,4	5,1	13,2	3,2	4,6
0,8 % Butanol	1,0	2,2	4,0	4,1	3,1
0,1 % Hexanol	0,8	2,0	3,3	5,7	2,6



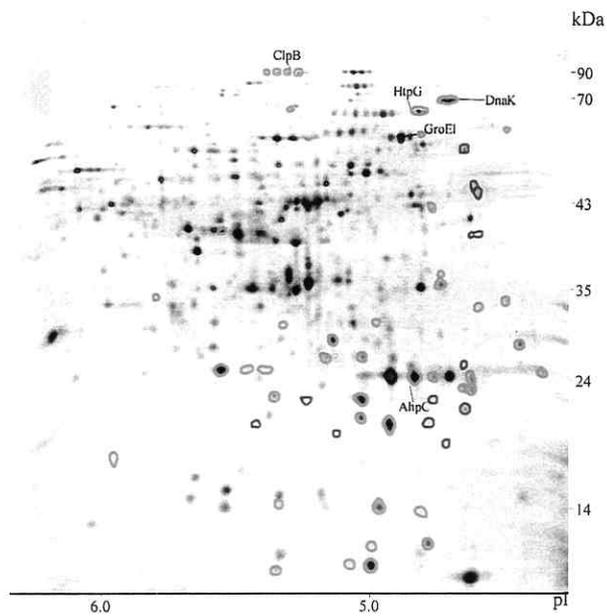
**Abb. 23: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinnmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat (Kontrolle).** Grün hervorgehoben: nach Einwirkung von primären Alkoholen oder nach Temperaturerhöhung verstärkt induzierte Proteine (vergleiche Abb. 24 - Abb. 27).



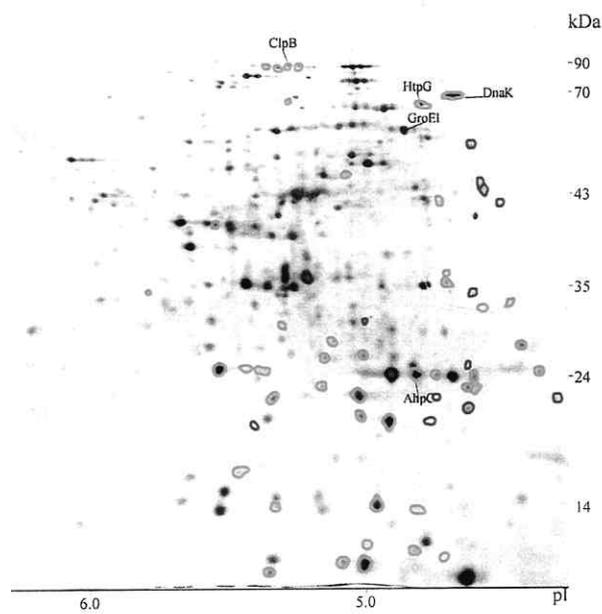
**Abb. 24:** Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation bei 45 °C. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach einer Temperaturerhöhung gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach einer Temperaturerhöhung gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) neu sind.



**Abb. 25:** Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation mit 5 % Ethanol. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Ethanol gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Ethanol gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) neu sind.



**Abb. 26:** Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation mit 0,8 % Butanol. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Butanol gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Butanol gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) neu sind.



**Abb. 27:** Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation mit 0,1 % Hexanol. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Hexanol gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Hexanol gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) neu sind.

### 3.3.1.3 Einfluß von Ethanol und Butanol auf die Synthese von Hitzeschockproteinen

Wie bereits in Abschnitt 3.3.1.1 dargestellt wurde, ist die Induktion von Proteinen durch primäre Alkohole abhängig von der eingesetzten Konzentration. Am Beispiel von Ethanol und einiger Hitzeschockproteine wurde dieser Zusammenhang näher untersucht. Dazu wurde eine Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* während des Wachstums auf Acetat 30 min mit 3 verschiedenen Ethanolkonzentrationen oder bei einer Temperatur von 45°C inkubiert. Die Menge der Hitzeschockproteine wurde nach zweidimensionaler Trennung der Proteine (nicht gezeigt) quantifiziert. In Gegenwart von 5 % Ethanol wurden alle Hitzeschockproteine außer GroEl am stärksten induziert (Tab. 14). Die Proteine HtpG und ClpB zeigen im Vergleich zu DnaK und GroEl nach Inkubation bei höherer Temperatur oder mit 5 % Ethanol eine starke Induktion.

Tab. 14: Einfluß der Konzentration von Ethanol auf die Synthese von Hitzeschockproteinen in *Acinetobacter calcoaceticus*. (Verstärkungsfaktoren gemessen in zweidimensionalen Proteinmustern)

Protein	Verstärkungsfaktor gegenüber der Kontrolle			
	Temperaturerhöhung	2,5 % Ethanol	5 % Ethanol	7,5 % Ethanol
GroEl	2,9	2,2	1,9	1,3
HtpG	7,3	1,5	4,3	0,7
DnaK	3,3	1,9	2,0	1,0
ClpB	15,2	2,3	7,3	1,2

Die Gehalt GroEl und DnaK derselben Proben von *Acinetobacter calcoaceticus* wurde zusätzlich im Dot-Blot gemessen (Abb. 28). Im Blot ist die Zunahme beider Hitzeschockproteine nach Temperaturerhöhung und Einwirkung von Ethanol ebenfalls nachweisbar.

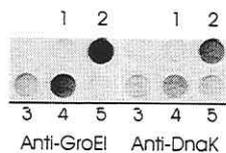


Abb. 28: Dot-Blot mit anschließender Immunfärbung der Hitzeschockproteine GroEl und DnaK. 25 µg Protein/Dot. Dot 1: Kontrolle, Dot 2: Temperaturerhöhung auf 45 °C, Dot 3: 2,5 % Ethanol, Dot 4: 5 % Ethanol, Dot 5: 7,5 % Ethanol.

Nach Temperaturerhöhung hat sich die Menge des Hitzeschockproteins GroEl im Vergleich zur Kontrolle um das 43 fache erhöht, die des Proteins DnaK um das 18 fache (Abb. 29). Die ermittelten Verstärkungsfaktoren nach Einwirkung von Ethanol und nach Temperaturerhöhung (Abb. 29) sind deutlich höher als die Werte, die für diese Proben mit Hilfe der Auswertung zweidimensionaler Proteinmuster (Tab. 14) bestimmt wurden. Trotzdem wird auch mit dieser Methode die Tendenz bestätigt, daß die optimale Ethanolkonzentration für die Induktion von Hitzeschockproteinen bei 5 % liegt.

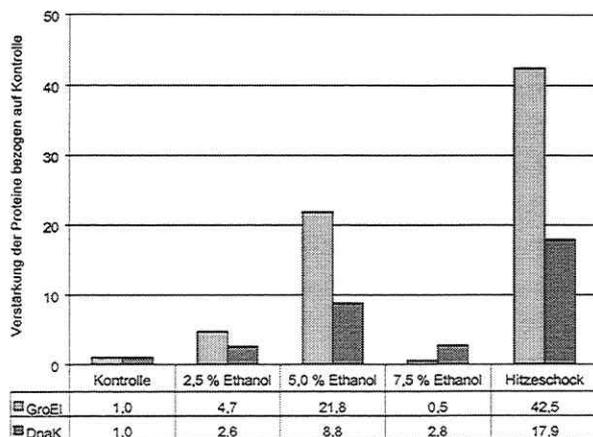


Abb. 29: Messung der Verstärkung der Hitzeschockproteine GroEl und DnaK von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von Ethanol und nach Temperaturerhöhung im Dot-Blot.

Die Kombination einer Temperaturerhöhung und der Inkubation mit Ethanol führte zur verstärkten Synthese von Hitzeschockproteinen (Abb. 30). In Gegenwart von 5% Ethanol reichte eine Temperaturerhöhung von 30 auf 37°C aus, um die Hitzeschockproteine in vergleichbaren Mengen wie bei 45 °C allein zu induzieren. Bei 45°C dagegen führte die Zugabe von 8 % Ethanol zur Inhibierung der Hitzeschockantwort (Abb. 30). Am Beispiel des Proteins HtpG, das in silbergefärbten zweidimensionalen Proteinmustern (nicht gezeigt) quantifiziert wurde, konnte demonstriert werden, daß die gemeinsame Wirkung von Ethanol und einer Temperaturerhöhung die Summe der Einzelwirkungen deutlich übersteigt (Abb. 31).

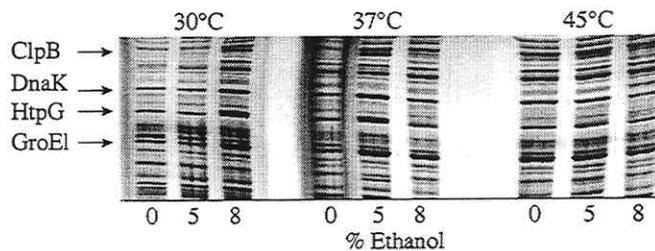


Abb. 30: Induktion von Hitzeschockproteinen durch gemeinsame Einwirkung von Ethanol und Temperaturerhöhung in *Acinetobacter calcoaceticus*. Silbergefärbtes Gel nach SDS-Elektrophorese von Zellextrakten (1µg / Spur).

Nach Einwirkung von Ethanol, Butanol oder der Kombination beider Substanzen wurden die Induktion der Proteine GroEl und DnaK in Dot-Blots untersucht. Ethanolkonzentrationen bis 2 % führten zu keiner Induktion des Proteins GroEl und nur zu einer leichten Induktion des Proteins DnaK (Abb. 32). Die optimale Konzentration für die Induktion von GroEl und Dank durch Butanol lag bei 1,2 %, wobei das Proteins GroEl maximal nur 1,9 fach induziert wurde.

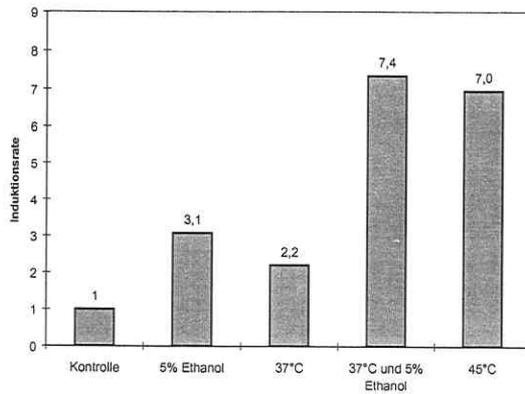


Abb. 31: Induktion des Proteins HtpG (High temperature protein G) von *Acinetobacter calcoaceticus* durch Ethanol und Temperaturerhöhung. Vergleich von silbergefärbten zweidimensionalen Proteinmustern.

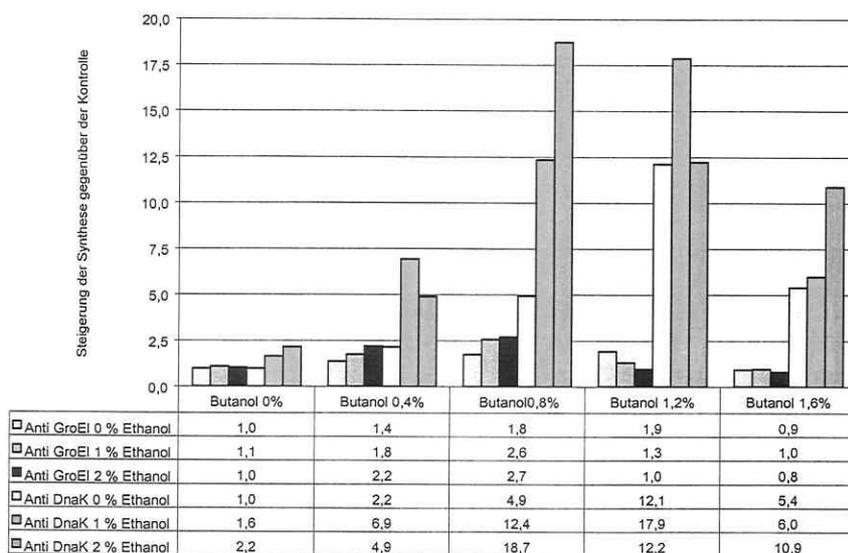


Abb. 32: Induktion der Hitzeschockproteine GroEl und DnaK von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von Butanol und Ethanol. Gemessen in immungefärbten Dot-Blots (25 µg Protein/Dot).

Die Kombination beider Substanzen führte zur Verstärkung der Synthese beider Proteine und verringerte gleichzeitig die zur maximalen Induktion nötige Butanolkonzentration von 1,2 % auf 0,8 % (bei gleichzeitiger Zugabe von 2 % Ethanol). Die gemessene 18,7 fache Verstärkung des Proteins DnaK nach gleichzeitiger Einwirkung von 0,8 % Butanol und 2 % Ethanol war deutlich größer als die Summe der Verstärkungen, die durch die Substanzen einzeln hervorgerufen wurden (0,8 % Butanol 4,9 fach und 2 % Ethanol 2,2 fach).

### 3.3.2 Einfluß von Phenol, Catechol, Wasserstoffperoxid und Temperaturerhöhung

#### 3.3.2.1 Einfluß auf das Wachstum

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde auf 0,22 % Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert. Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen unter Wachstumsbedingungen 1 h in Gegenwart von 6 x 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 mM Catechol, 14 mM Phenol oder bei 45°C inkubiert. Die mehrfache Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war erforderlich, um ihren enzymatischen Abbau durch die Kulturen zu kompensieren. Die Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catechol und Phenol führte zur Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Acetat (Abb. 33), während die Inkubation bei 45°C das Wachstum vollständig inhibierte. Bei Atmungsmessungen von Zellsuspensionen nach einstündiger Inkubation mit Phenol oder Catechol wurden keine Erhöhungen der Atmungsaktivitäten mit Phenol bzw. Catechol als Substrat gemessen (nicht gezeigt), was belegt, daß innerhalb dieser Zeit Phenol und Catechol nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet wurden.

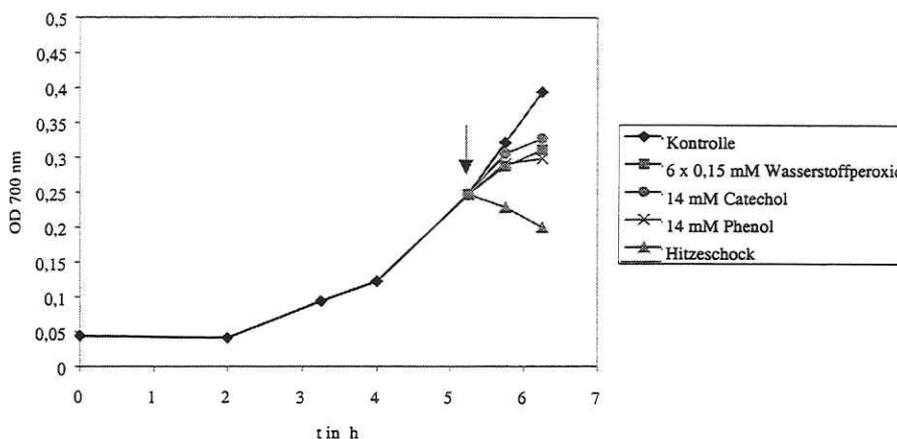
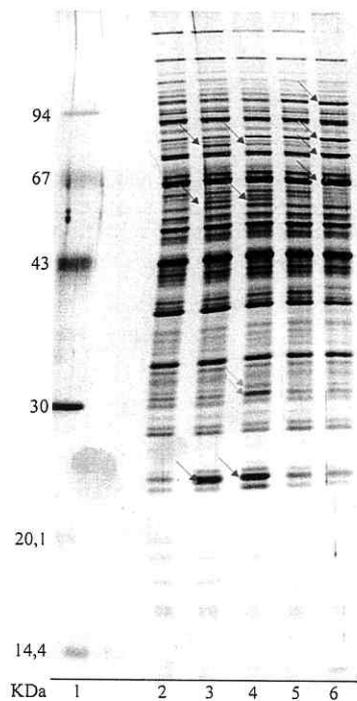


Abb. 33: Hemmung des Wachstums von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Acetat durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catechol, Phenol oder eine Temperaturerhöhung. Pfeil: Einwirkungsbeginn.

#### 3.3.2.2 Einfluß auf die Proteinmuster

Die Proteine zellfreier Extrakte wurden mit Hilfe der SDS-Elektrophorese getrennt. Das Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catechol und nach Temperaturerhöhung führte zur Induktion von Proteinen, die bereits in eindimensionalen Proteinmustern als Verstärkung von Banden (markiert durch Pfeile in Abb. 34) nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu ist nach Einwirkung von Phenol in eindimensionalen Proteinmustern keine Induktion von Proteinen nachweisbar.



**Abb. 34: Induktion von Proteinen durch  $H_2O_2$ , Catechol, Phenol und Temperaturerhöhung in *Acinetobacter calcoaceticus*.** Silbergefärbte eindimensionale Proteinmuster ( $1\mu g$  Protein / Spur). Spur 1: Molekulargewichtsstandard (Pharmacia), Spur 2: Kontrolle, Spur 3:  $0,15\text{ mM } H_2O_2$ , Spur 4:  $14\text{ mM Catechol}$ , Spur 5:  $14\text{ mM Phenol}$ , Spur 6: Temperaturerhöhung auf  $45\text{ }^\circ C$ . Blaue Pfeile: durch  $H_2O_2$  und Catechol verstärkte Banden; grüne Pfeile durch Catechol verstärkte Banden; rote Pfeile durch Temperaturerhöhung verstärkte Banden.

Die Antworten auf Catechol und  $H_2O_2$  sind sich sehr ähnlich (blaue Pfeile, Abb. 34) und unterscheiden sich deutlich von der Antwort auf Temperaturerhöhung (rote Pfeile, Abb. 34). Nach Einwirkung von Catechol konnten noch zwei weitere verstärkte Banden (grüne Pfeile, Abb. 34) nachgewiesen werden.

Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden insgesamt 64 verstärkte und 47 neue Proteine in den silbergefärbten Proteinmustern (Abb. 36 - Abb. 40, Seiten 51 - 53) nachgewiesen. 17 Proteine wurden durch alle Streßarten generell induziert (blau, Abb. 35B). Die Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Catechol zeigt eine höhere Ähnlichkeit zur Antwort auf Wasserstoffperoxid als die Antwort auf Phenol, da die Anzahl der gemeinsam induzierten Proteine mit 7 gegenüber 2 größer ist (gelb, Abb. 35A). Im Gegensatz dazu sind sich die Antworten auf Phenol und Temperaturerhöhung ähnlicher als die Antworten auf Catechol und Temperaturerhöhung ist (gelb, Abb. 35B). Obwohl sich die Antworten der beiden aromatischen Substanzen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit zu  $H_2O_2$ -Streß und Temperaturerhöhung unterscheiden, gibt es 5 Proteine, die allein durch beide Substanzen induziert wurden (gelb, Abb. 35A). Wie bereits aus eindimensionalen Proteinmustern zu erwarten war, führt die Einwirkung von Catechol zur Induktion zu einer Reihe von spezifischen Spots mit relativ großem Volumen, die deshalb sehr markant für diese Antwort sind (Protein 3, Abb. 38).

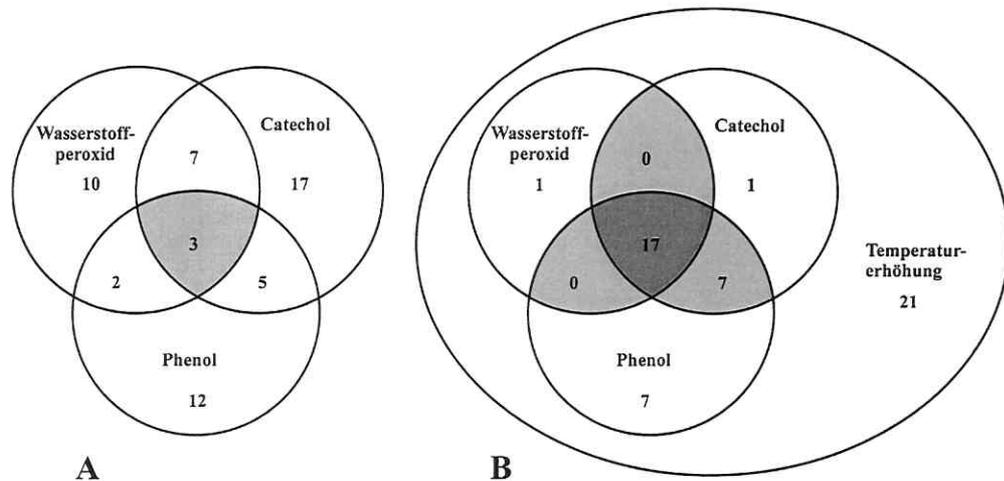


Abb. 35: Generell (blau), dreifach (grün), zweifach (gelb) und spezifisch (weiß) induzierte Proteine in *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von Phenol, Catechol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Temperaturerhöhung. In Abbildung A werden nur Proteine dargestellt, die nicht durch Temperaturerhöhung induziert wurden. In Abbildung B werden nur Proteine dargestellt, die auch durch Temperaturerhöhung induziert wurden.

Aus der Vielfalt der induzierten Proteine wurden 6 Proteine zur Ermittlung der Funktion ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 29). Die Position der durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Katalase (HPI) wurde durch den Vergleich von Proteinmustern ermittelt (siehe 3.1.1). Die oxidativen Streß-Proteine AhpC, AhpF und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbare Katalase wurden am stärksten durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Catechol induziert, während die Hitzeschockproteine DnaK, HtpG, ClpB am stärksten durch Phenol und Temperaturerhöhung wurden (Tab. 15). Diese Gruppierungen bestätigen die Resultate der Analyse der neuen und verstärkten Proteine bezüglich der Ähnlichkeit der Antworten. Die Proteine 1 - 4 sind weitere Beispiele für dieses Verhalten. Die Proteine 2 und 4 zeigen in ihrem Induktionsmuster ein ähnliches Verhalten wie die durch Phenol und Hitze induzierten Proteine. Das Protein 1 ist ein Beispiel für ein allein durch Phenol oder Catechol induziertes Protein (Abb. 38 und Abb. 39). In diesem Experiment ist durch keinen Einfluß eine Erhöhung des Hitzeschockproteins GroEl nachweisbar.

Tab. 15: Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catechol, Phenol und Temperaturerhöhung. Hellgrau: mindestens 2fach induziert. Dunkelgrau: mindestens 10fach induziert. Hellgrau, schwarz umrahmt: neu induziert.

	GroEl	DnaK	HtpG	ClpB	Protein 2	Protein 4	AhpF	HPI	AhpC	Protein 1	Protein 3
MW	60	72	67	84	48	33	56	71	26	22	32
pI	4,79	4,65	4,73	5,21	4,48	4,64	4,76	5,23	4,77	5,41	5,6
6 x 0,15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,4	1,2	1,5	0,4	1,3		5,0	5,3	41,6	0,3	
14 mM Catechol	1,3	2,2	1,9	2,3	2,2		4,6	2,0	11,7	10,3	4.798
14 mM Phenol	1,4	2,3	2,6	4,5	8,4	206	1,8	1,7	3,4	5,2	
Temperaturerhöhung	1,4	6,6	16,9	11,0	27,9	2.291	1,8	0,5	6,2	0,0	

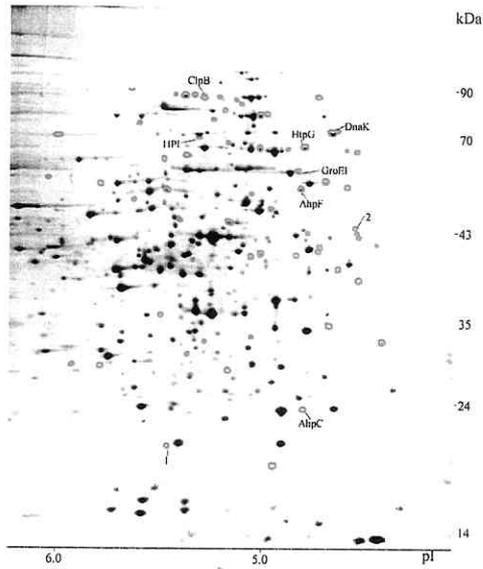


Abb. 36: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat (Kontrolle). Grün hervorgehoben: nach Einwirkung von  $H_2O_2$ , Catechol, Phenol oder Temperaturerhöhung verstärkt induzierte Proteine (vergleiche Abb. 37 - Abb. 40).

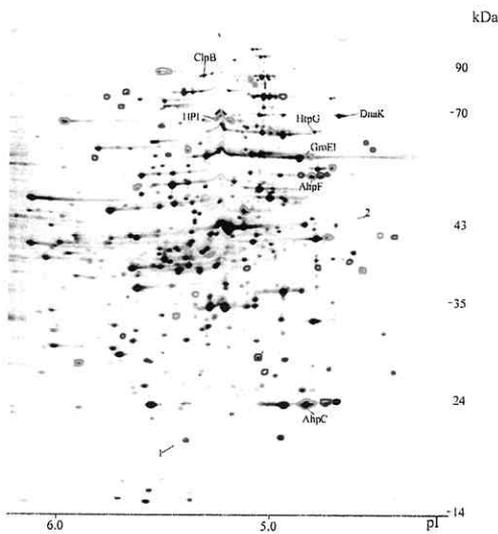


Abb. 37: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Einwirkung von  $6 \times 0,15$  mM  $H_2O_2$ . Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von  $H_2O_2$  gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von  $H_2O_2$  gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) neu sind.

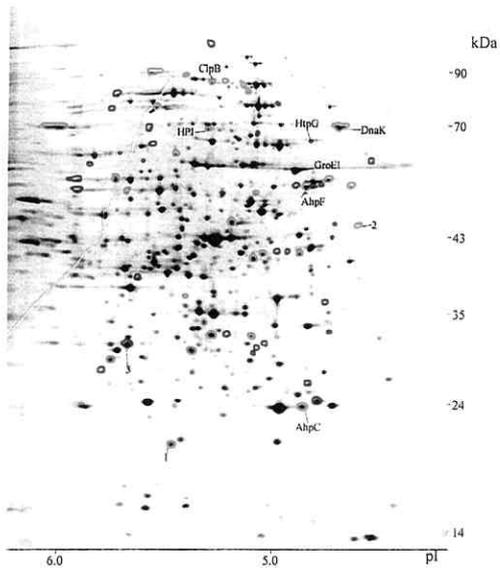


Abb. 38: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Einwirkung von 14 mM Catechol. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Catechol gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Catechol gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) neu sind.

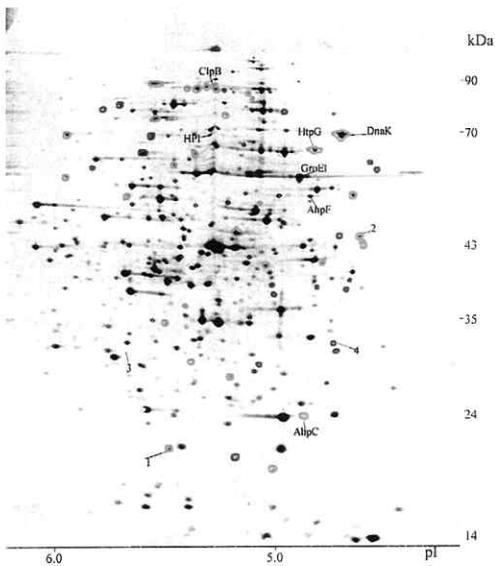


Abb. 39: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Einwirkung von 14 mM Phenol. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Phenol gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Phenol gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) neu sind.

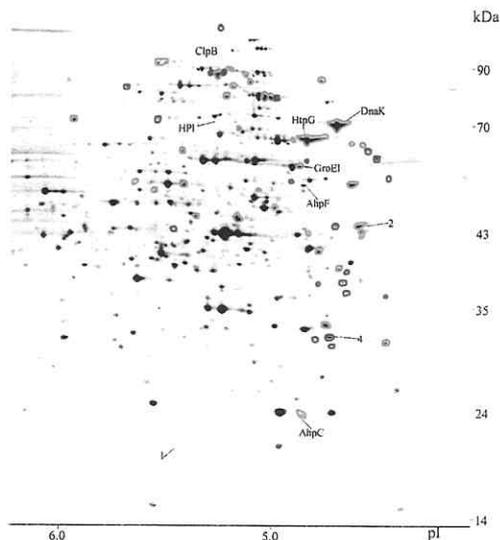


Abb. 40: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat und 60 min Inkubation bei 45 °C. Grün hervorgehoben: Proteine, die nach Temperaturerhöhung gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die nach Einwirkung von Temperaturerhöhung gegenüber der Kontrolle (Abb. 36) neu sind.

### 3.3.2.3 Einfluß auf die Aktivität der Katalase

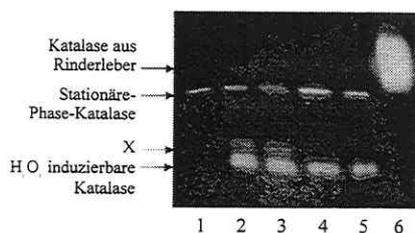
Nach Ultraschallaufschluß wurde in zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* die Enzymaktivität der Katalase gemessen (Tab. 16). Der Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catechol, Phenol und einer Temperaturerhöhung führte in allen Fällen zur Erhöhung der spezifischen Aktivität der Katalase. Der höchste Verstärkungsfaktor (3,8fach), bezogen auf die Kontrolle, wurde nach Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen.

Tab. 16: Spezifische Aktivität und Verstärkungsfaktoren der Katalase in zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus*

	Kontrolle	6 x 0,15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14 mM Catechol	14 mM Phenol	Temperaturerhöhung auf 45°C
spezifische Aktivität in U / mg	5,9	22,6	14,9	18,9	13,2
Verstärkungsfaktor der Katalase		3,8	2,5	3,2	2,2

Die Proteine zellfreier Extrakte wurden mit Hilfe der nativen Elektrophorese getrennt. Nach der Aktivfärbung der Gele zeigte sich, daß sich die Aktivität auf mindestens 2 Isoenzyme der Katalase verteilt (Abb. 41). Nach Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Catechol war eine schwache dritte Bande nachweisbar. Das Isoenzym mit dem niedrigsten scheinbaren Molekulargewicht (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbare Katalase, HPI) erhöht sich in Antwort auf alle verschiedenen Einflüsse. Die Verstärkung der Bande ist am stärksten nach Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gefolgt von Catechol,

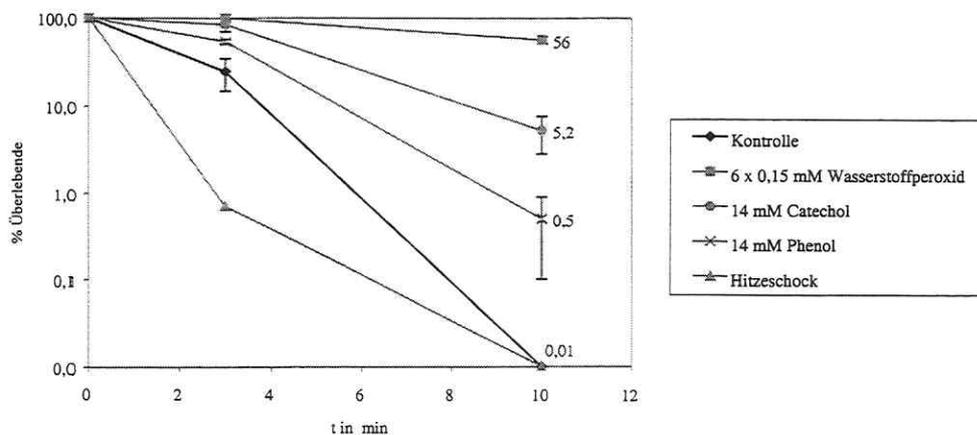
Phenol und Temperaturerhöhung. Bei dem Isoenzym mit dem höchsten scheinbaren Molekulargewicht (Stationäre Phase-Katalase HPII, siehe 3.4.2.2.2) ist nur in Antwort auf Phenol eine Verstärkung der Bande zu beobachten. Eine genauere Quantifizierung ist bei dieser Art von Aktivfärbung jedoch nicht möglich.



**Abb. 41: Aktivfärbung zum Nachweis von Katalase nach nativer Elektrophorese von zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus*.** Spur 1: Kontrolle, Spur 2: 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Spur 3: 14 mM Catechol, Spur 4: 14 mM Phenol, Spur 5: Temperaturerhöhung auf 45 °C, Spur 6: Katalase aus Rinderleber.

### 3.3.2.4 Einfluß auf die Resistenz gegenüber letalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen

Zellsuspensionen von *Acinetobacter calcoaceticus*, die eine Stunde in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catechol, Phenol oder erhöhter Temperatur kultiviert wurden, wurden anschließend einer letalen Dosis von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgesetzt (Abb. 42). Das Verhältnis zwischen Kolonienbildenden Einheiten (KBE) vor und nach der Einwirkung von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diente als Maß für die Resistenz. Die Vorinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachte die stärkste Resistenz. Nach 10 min Inkubation konnten noch 56 % KBE nach der Vorinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegenüber 0,01% KBE der Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 42).



**Abb. 42: Resistenz von *Acinetobacter calcoaceticus* gegenüber 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Kultivierung der Zellen auf 0,22 % Acetat und anschließend 1h Vorinkubation mit 6 x 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 mM Catechol, 14 mM Phenol und Temperaturerhöhung auf 45°C unter Wachstumsbedingungen.

Von Zellsuspensionen, die mit Catechol oder Phenol vorinkubiert wurden, konnten nach 10 min noch 5,2% bzw. 0,5% KBE erfaßt werden. Die Erhöhung der Temperatur verringerte die Fähigkeit, hohe Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu überleben (Abb. 42).

### 3.4 Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Chemostreß während des Wachstums auf Xenobiotika

#### 3.4.1 Wachstum auf primären Alkoholen

##### 3.4.1.1 Einfluß der Ausgangskonzentration auf das Wachstum

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde auf 0,2 % oder 4% Ethanol und auf 0,05 % oder 0,4 % Butanol als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert. Die Ausgangskonzentrationen von 4 % Ethanol und 0,05 % bzw. 0,4 % Butanol verursachten im Vergleich zur Kultivierung auf 0,2 % Ethanol eine lag-Phase von 1-2 h (Abb. 43). Trotz der lag-Phase bei Wachstum auf 4 % Ethanol ist die erreichte maximale Wachstumsrate mit  $\mu = 0,7 \text{ h}^{-1}$  ähnlich wie die ohne lag-Phase bei Wachstum auf 0,2 % Ethanol meßbare. Beim Wachstum auf 0,05 % und 0,4 % Butanol betragen die Wachstumsraten  $\mu = 0,45 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,30 \text{ h}^{-1}$ . Nachdem die Kulturen optische Dichten (700 nm) von 0,13-0,2 erreicht hatten, wurden die Zellen geerntet.

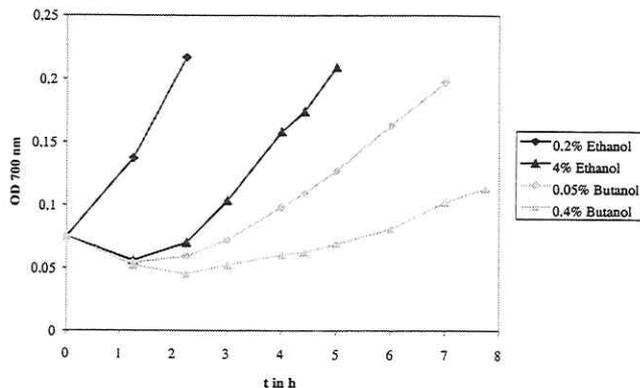


Abb. 43: Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Ethanol und Butanol

##### 3.4.1.2 Einfluß der Ausgangskonzentration auf die Proteinmuster

Die in den zellfreien Extrakten enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese getrennt. Der Vergleich der silbergefärbten Proteinmuster nach Wachstum auf primären Alkoholen mit denjenigen Mustern nach Wachstum auf 0,22 % Acetat zeigt einige verstärkte Proteine (schwarze Pfeile in Abb. 44 - Abb. 47, Seiten 57 - 58), die den Gesamteindruck der Muster veränderten. Die Molekulargewichte der beiden wichtigsten Proteine betragen 42 und 52 kDa. Sie entsprechen in etwa den Molekulargewichten der NAD-abhängigen Alkohol-dehydrogenase EC 1.1.1.1 aus *Escherichia coli* (Swissprot accession

number: P37686) und der NAD-abhängigen Aldehyddehydrogenasen EC 1.2.1.3 aus *Escherichia coli* (Swissprot accession number: P23883).

Die Proteinmuster nach Wachstum auf 0,2% und 4% Ethanol sowie nach Wachstum auf 0,05 % und 0,4 % Butanol wurden miteinander verglichen (Abb. 44 - Abb. 47). Nach Wachstum in Gegenwart der hohen Konzentrationen von Ethanol oder Butanol wurden 71 bzw. 62 neue und verstärkte Proteine in den Proteinmustern gefunden (Tab. 17).

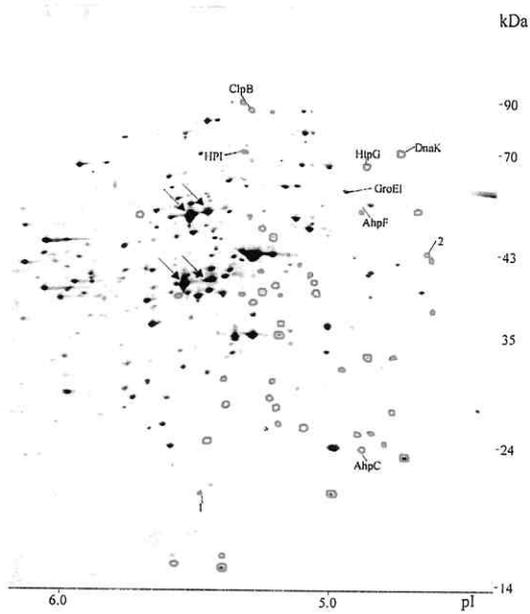
**Tab. 17: Neue und verstärkte Proteine nach Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf hohen Konzentrationen primärer Alkohole**

	Zahl der verstärkten Proteine	Zahl der neuen Proteine
4 % Ethanol	50	21
0,8 % Butanol	39	23

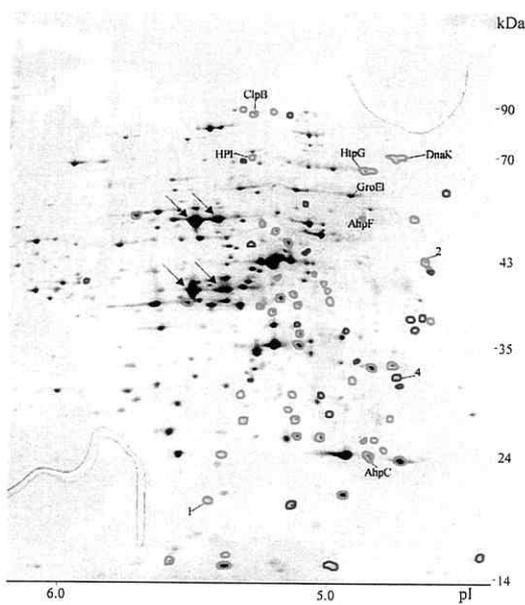
Davon wurden 27 Proteine gemeinsam durch hohe Konzentration beider Alkohole induziert. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören die Hitzeschockproteine DnaK, ClpB und das oxidative Streß Protein AhpC (Tab. 18), die mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung nachgewiesen wurden (siehe 3.1.2). Die Proteine 2 und 4, die typisch für die Hitzeschockantwort sind, zählen ebenfalls zu dieser Gruppe. Das Hitzeschockprotein HtpG, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbare Katalase (HPI), das oxidative Streßprotein AhpF und das Protein 1 wurden nur während des Wachstums bei hohen Konzentrationen von einem der beiden Alkohole induziert.

**Tab. 18: Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf primären Alkoholen.** Hellgrau: mindestens 2fach induziert. Dunkelgrau: mindestens 10fach induziert. Hellgrau, schwarz umrahmt: neu induziert.

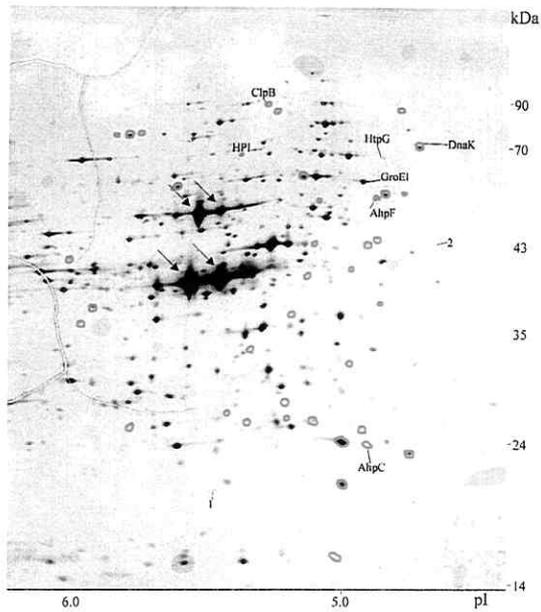
	GroEl	DnaK	HtpG	ClpB	Protein 2	Protein 4	AhpF	HPI	AhpC	Protein 1
MW	60	72	67	84	48	33	56	71	26	22
pI	4,79	4,65	4,73	5,21	4,48	4,64	4,76	5,23	4,77	5,41
Verstärkungsfaktor nach Wachstum auf 4 % Ethanol bezogen auf die Kontrolle (Wachstum auf 0,2 % Ethanol)	1,6	3,8	4,1	3,0	5,7	1287,0	1,9	3,3	12,2	9,9
Verstärkungsfaktor nach Wachstum auf 0,4 % Butanol bezogen auf die Kontrolle (Wachstum auf 0,05 % Butanol)	0,8	4,2	1,9	2,5	1026,0	256,0	4,7	1,8	5,4	1,8



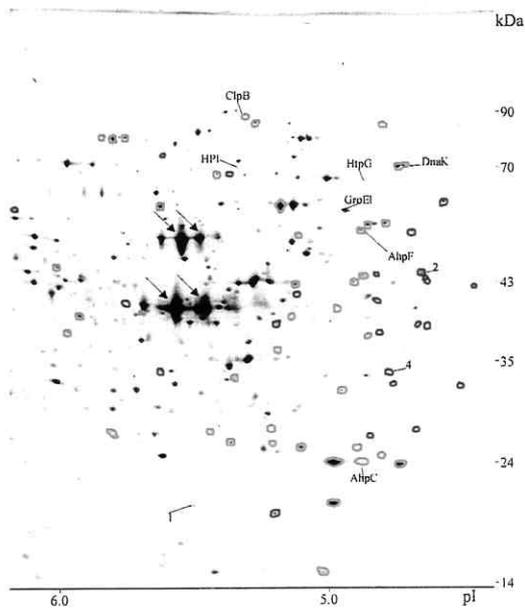
**Abb. 44: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 0,2 % Ethanol.** Grün umrandete Spots: nach Wachstum auf 4 % Ethanol in Abb. 45 verstärkte Proteine. Schwarze Pfeile: durch Wachstum auf Ethanol gegenüber dem Wachstum auf Acetat verstärkte Proteine.



**Abb. 45: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 4 % Ethanol.** Grün umrandete Spots: nach Wachstum auf 4 % Ethanol gegenüber Abb. 44 verstärkte Proteine. Rot umrandete Spots: nach Wachstum auf 4 % Ethanol gegenüber Abb. 44 neue Proteine. Schwarze Pfeile: durch Wachstum auf Ethanol gegenüber dem Wachstum auf Acetat verstärkte Proteine.



**Abb. 46: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 0,05 % Butanol.** Grün umrandete Spots: nach Wachstum auf 0,4 % Butanol in Abb. 47 verstärkte Proteine. Schwarze Pfeile: durch Wachstum auf Butanol gegenüber dem Wachstum auf Acetat verstärkte Proteine.



**Abb. 47: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 0,4 % Butanol.** Grün umrandete Spots: nach Wachstum auf 0,4 % Butanol gegenüber Abb. 46 verstärkte Proteine. Rot umrandete Spots: nach Wachstum auf 0,4 % Butanol gegenüber Abb. 46 neue Proteine. Schwarze Pfeile: durch Wachstum auf Butanol gegenüber dem Wachstum auf Acetat verstärkte Proteine.

### 3.4.1.3 Einfluß der Ausgangskonzentrationen auf die Induktion der Katalase

In den zellfreien Extrakten wurde die Aktivität der Katalase bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten (Tab. 19) nach Wachstum auf 4% Ethanol oder 0,4 % Butanol waren um mehr als das 3fache gegenüber dem Wachstum auf niedrigen Konzentrationen der primären Alkohole gemessenen Aktivitäten erhöht. Nach nativer Elektrophorese dieser Rohextrakte mit anschließender Aktivfärbung der Katalase konnten zwei Isoenzyme (Abb. 48) nachgewiesen werden, wobei besonders die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbare Katalase HPI (siehe 3.3.2.3) in Gegenwart der hohen Konzentrationen beider Alkohole verstärkt war.

Tab. 19: Spezifische Aktivität und Verstärkungsfaktoren der Katalase in Rohextrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf primären Alkoholen

	0.2% Ethanol	4% Ethanol	0.05% Butanol	0.4% Butanol
spezifische Aktivität in U/mg	46,2	177	45,5	157,4
Verstärkungsfaktor der Katalase		3,8		3,5

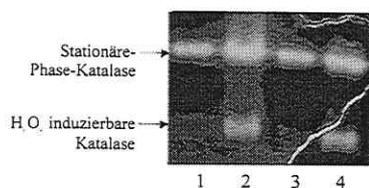


Abb. 48: Aktivfärbung der Katalase nach nativer Elektrophorese von Rohextrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf primären Alkoholen. Spur 1: 0,2 % Ethanol, Spur 2: 4 % Ethanol, Spur 3: 0,05 % Butanol, Spur 4: 0,4 % Butanol.

Die nach Wachstum in Gegenwart hoher Konzentrationen der primären Alkohole im Enzymtest gemessene starke Erhöhung der Gesamtaktivität der Katalasen wurde (Tab. 19) durch die Zunahme der Aktivität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbaren Katalase HPI verursacht, die in nativ gefärbten Gelen nachgewiesen wurde (Abb. 48). Nach Auswertung der entsprechenden zweidimensionalen Proteinmuster ist jedoch die Verstärkung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbaren Katalase (HPI) nach Wachstum auf 0,4 % Butanol geringer als auf Grund der Gesamtaktivität und der Ergebnisse der nativen Elektrophorese erwartet werden konnte (siehe Tab. 18, Seite 56).

## 3.4.2 Wachstum auf Phenol

### 3.4.2.1 Batchkultivierung

#### 3.4.2.1.1 Einfluß der Ausgangskonzentration auf das Wachstum

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde in Batchkulturen auf verschiedenen Konzentrationen von Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle vermehrt. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 700 nm verfolgt (Abb. 49). Mit zunehmender Phenolkonzentration im Medium verlängerte sich die lag-Phase von 2 h bei Wachstum auf 0,5 mM Phenol bis auf mehr als 6 h bei Wachstum auf 5 mM Phenol. Bereits ab 7 mM Phenol ist

nach mehr als 24 h kein Wachstum mehr nachweisbar. Um zu prüfen, ob *Acinetobacter calcoaceticus* durch das Wachstum auf einer niedrigen Konzentration von 2 mM Phenol befähigt wird, anschließend in Gegenwart höherer Phenolkonzentrationen zu wachsen, wurden die Phenolkonzentrationen um 1-9 mM Phenol erhöht (Abb. 50).

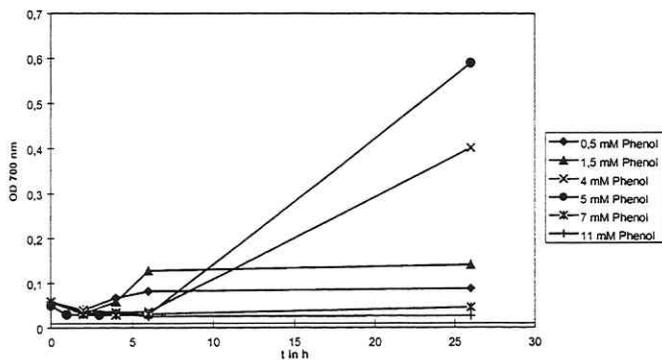


Abb. 49: Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf verschiedenen Phenolkonzentrationen als Kohlenstoff- und Energiequelle

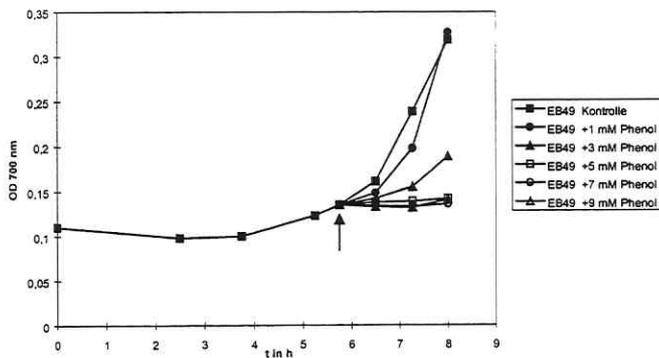


Abb. 50: Hemmung des Wachstums von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Phenol. Pfeil: Zeitpunkt der Zugabe von Phenol.

Durch Zugabe von Phenol wurde das Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Phenol ähnlich wie in der lag-Phase gehemmt. Zellsuspensionen von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 2 mM Phenol wurden genutzt, um den phenolabhängigen Sauerstoffverbrauch mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode zu messen. Konzentrationen von 1-50  $\mu$ M Phenol aktivierten die Atmung, während oberhalb von 1 mM Phenol eine deutliche Inhibierung der Atmung erfolgte (Abb. 52). Mit Hilfe der Formel nach Haldane (Abb. 51; Leonard und Lindley, 1999), die die Substratinhibierung mathematisch beschreibt,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \times \left( 1 + \frac{k_s}{s} + \frac{s}{k_i} \right)$$

Abb. 51: Formel nach Haldane

konnten näherungsweise folgende Parameter für die Phenolatmung phenolgewachsener Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* ermittelt werden:  $V_{\max} = 680 \text{ nmol O} / (\text{min} \cdot \text{mg})$  Trockengewicht,  $k_s = 4 \text{ } \mu\text{M}$  und  $k_i = 1,12 \text{ mM}$ .

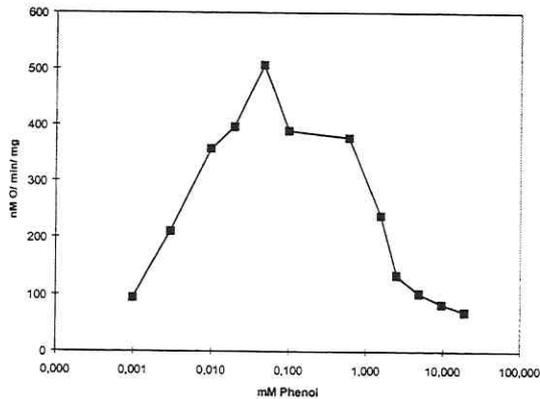


Abb. 52: Phenolatmung von *Acinetobacter calcoaceticus* in Abhängigkeit von der Phenolkonzentration

### 3.4.2.1.2 Einfluß auf die Aktivität der Katalase

Die Enzymaktivität der Katalase in zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 4 mM Phenol war sowohl in der frühen als auch in der späten exponentiellen Wachstumsphase höher als nach Wachstum auf 4 mM Catechol oder 0,22 % Acetat (Tab. 20). Eine Abnahme der Aktivität der Katalase während des Wachstums, von der frühen exponentiellen zur späten exponentiellen Phase, wurde bei allen Substraten beobachtet. Die höhere Aktivität beim Wachstum auf Phenol wurde dabei durch das Vorhandensein eines hohen Anteils der Stationäre-Phase-Katalase (HPII) bereits in der frühen exponentiellen Phase verursacht (Abb. 53).

Tab. 20: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Katalase in zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* vom Wachstumssubstrat und der Wachstumsphase

	4 mM Phenol	4 mM Catechol	0,5 % Acetat
spezifische Aktivität in der frühen exponentiellen Phase (U / mg)	45,6	30,3	22,2
spezifische Aktivität in der späten exponentiellen Phase (U / mg)	37,9	12,5	13,7

Obwohl sich nach Wachstum auf Catechol und Acetat die Gesamtaktivitäten der Katalase kaum unterscheiden, verteilt sich die Aktivität unterschiedlich auf die beiden Isoenzyme. Nach Wachstum auf Catechol war die  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierbare Katalase (HPI) das Hauptenzym, während bei Wachstum auf Acetat die Stationäre-Phase-Katalase (HPII) den größten Anteil an der Gesamtaktivität hatte.

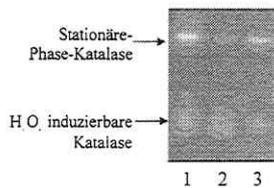


Abb. 53: Aktivfärbung der Katalase nach nativer Elektrophorese von zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Spur 1: Wachstum auf 4 mM Phenol, Spur 2: Wachstum auf 4 mM Catechol, Spur 3: Wachstum auf 0,22 % Acetat.

### 3.4.2.2 Kontinuierliche Kultivierung im Chemostat

#### 3.4.2.2.1 Einfluß der Durchflußrate auf die Restkonzentration von Phenol

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde im Chemostat auf Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert. Es wurden Durchflußraten von 0,1- 0,4 h<sup>-1</sup> eingestellt. Während nach Wachstum bei Durchflußraten zwischen 0,1 h<sup>-1</sup> und 0,3 h<sup>-1</sup> kein Phenol im Kulturüberstand nachweisbar war, wurde bei einer Durchflußrate von 0,4 h<sup>-1</sup> Phenol mit einer Konzentration von 1,58 mM im Medium akkumuliert.

#### 3.4.2.2.2 Einfluß der Durchflußrate auf die Katalaseaktivität

Die Gesamtaktivität der Katalase in zellfreien Extrakten wurde bestimmt. Die Aktivität nach kontinuierlicher Kultivierung auf Phenol mit einer Durchflußrate von  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$  war etwa 5fach höher (Tab. 21) als die Aktivität bei batchweiser Kultivierung auf Phenol (Tab. 20). Sie nahm mit zunehmender Durchflußrate bei Kultivierung auf Phenol mit der Ausnahme  $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$  ab und erreichte bei einer Durchflußrate von  $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$  Werte, deren Größenordnungen einer Batch-kultivierung auf Phenol oder Acetat entsprachen.

Tab. 21: Spezifische Aktivität und Anteil der Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern nach Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* im Chemostat auf Acetat oder Phenol.

Substrat	0,5 % Acetat	0,05 % Phenol	0,05 % Phenol	0,05 % Phenol	0,05 % Phenol
Durchflußrate D	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4
spezifische Aktivität in U / mg	680	226	37	11	26
Verstärkungsfaktor der Katalase	61,8	20,5	3,4	1,0	2,4
normalisiertes Spotvolumen in zweidimensionalen Gelen	3432	1526		65	
Verstärkungsfaktor der stationären Phase Katalase	52,8	23,5		1,0	

Die Aktivität der Katalase nach kontinuierlicher Kultivierung auf Acetat bei einer Durchflußrate von  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$  war mit 680 U/mg etwa dreimal so hoch wie nach kontinuierlicher Kultivierung auf Phenol mit derselben Durchflußrate (Tab. 21). Der Anteil

der Stationären-Phase-Katalase in silbergefärbten zweidimensionalen Proteinmustern (Abb. 54) wurde bestimmt. Die anhand der Gesamtaktivität der Katalase und des Anteiles der Stationären-Phase-Katalase in Proteinmustern ermittelten Verstärkungsfaktoren (Bezugswert 1 bei 0,05 % Phenol  $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ) zeigten eine gute Korrelation (Tab. 21). Die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierbare Katalase war in allen zweidimensionalen Proteinmustern mit unverändertem Anteil und geringer Gesamtmenge nachweisbar, so daß sie kaum einen Einfluß auf die Gesamtaktivität hatte.

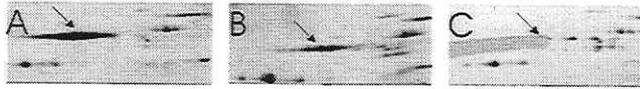


Abb. 54: Ausschnitte aus zweidimensionalen Proteinmustern von *Acinetobacter calcoaceticus* nach kontinuierlicher Kultivierung im Chemostat. Schwarzer Pfeil: Position der stationären Phase Katalase in zweidimensionalen Proteinmustern (Isoelektrische Fokussierung in IPG-Strips pH 3-10 NL). A:  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ , 0,5% Acetat. B:  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ , 0,05% Phenol. C:  $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ , 0,05% Phenol.

### 3.4.2.3 Kontinuierliche Kultivierung im Nutristat

#### 3.4.2.3.1 Einfluß der Phenolkonzentration auf das Wachstum

*Acinetobacter calcoaceticus* wurde im Chemostat auf Phenol mit einer Durchflußrate von  $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$  kultiviert. Anschließend wurde die Kultivierung auf das Nutristatprinzip umgestellt. Die Phenolkonzentration sollte auf 10 mM eingestellt werden. Anhand der Extinktionsmessung des zellfreien Filtrates bei 280 nm konnte verfolgt werden, wie innerhalb einer Stunde eine konstante Phenolkonzentration etabliert wurde (nicht gezeigt). Die Messung der Phenolkonzentration im Medium mittels der HPLC-Analytik zu den Probenahmezeitpunkten nach 1, 4 und 24 h bestätigte, daß sich eine konstante Konzentration eingestellt hatte. Sie war aber mit Werten zwischen 7,4 -7,8 mM niedriger als erwartet (Abb. 55).

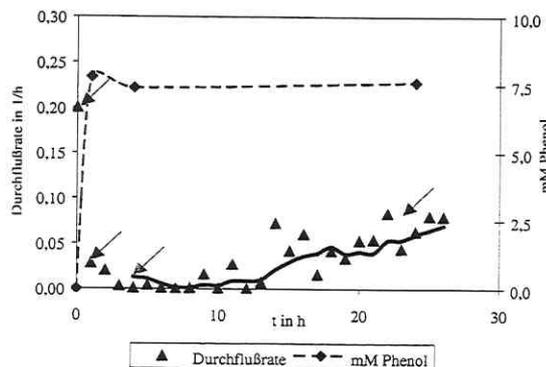


Abb. 55: Durchflußrate und Phenolkonzentration während der kontinuierlichen Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* nach dem Nutristatprinzip. Graue Pfeile: Zeitpunkte der Probenahme.

Die Erhöhung der Phenolkonzentration auf 7,5 mM im Nutristat verursachte eine fast vollständige Hemmung des Wachstums von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Phenol. Nach 4 h betrug die ermittelte Durchflußrate nur noch 0,002 h<sup>-1</sup>. Nach 9 h nahm die Durchflußrate wieder zu. Sie erreichte nach etwa 24 h einen Wert von D=0,07 h<sup>-1</sup> (Abb. 55). Die Überdosierung von Phenol führte zur Erhöhung der Phenolkonzentration (gemessen mit HPLC) auf 18,5 mM und zum beginnenden Auswaschen der Kultur. Die noch im Kulturgefäß verbliebende restliche Biomasse wurde geerntet.

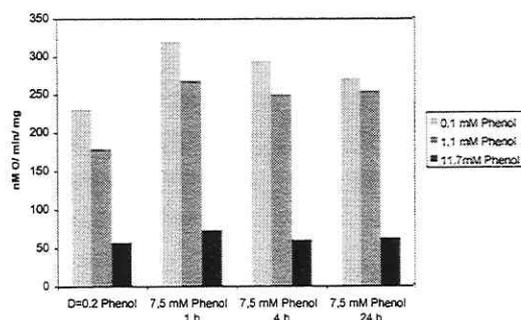


Abb. 56: Phenolatmung von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Kultivierung auf Phenol im Chemostat und im Nutristat

Von den Zellen nach 1 h , 4 h und 24 h Kultivierung im Nutristat wurde die Phenolatmung gemessen. Es wurden 3 verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt. Die Gegenwart von 7,5 mM Phenol im Nutristat verursachte zu allen Zeitpunkten eine leichte Erhöhung der Phenolatmung mit 0,1 mM und 1,1 mM als Substrat gegenüber der Phenolatmung der Kontrollzellen aus dem Chemostat (Abb. 56). Mit 11,7 mM Phenol als Substrat war keine Zunahme der Atmungsaktivität der im Nutristat kultivierten Zellen nachweisbar.

### 3.4.2.3.2 Einfluß der Phenolkonzentration auf Proteinmuster

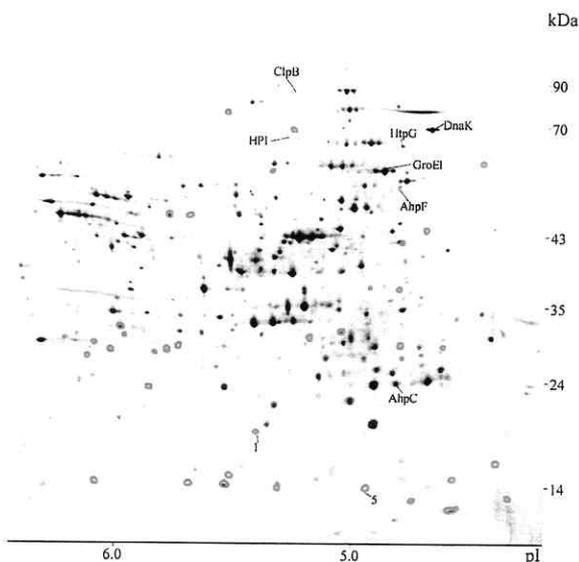
Nach kontinuierlicher Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* im Chemostat auf Phenol wurden im Vergleich zur kontinuierlichen Kultivierung auf Acetat 36 verstärkte und 45 neue Proteine in silbergefärbten zweidimensionalen Proteinmustern gefunden (Abb. 57 und Abb. 58). Das am stärksten während Phenolwachstum induzierte Protein war die mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung nachgewiesene Catechol-1,2-dioxygenase (CatA) (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 29).

Das Proteinmuster nach kontinuierlicher Kultivierung im Chemostat auf Phenol wurde als Kontrolle für die nach Wachstum im Nutristat erzeugten Proteinmuster genutzt. Insgesamt wurden nach Wachstum auf Phenol im Nutristat 68 verstärkte und 39 neue Proteine nachgewiesen (Abb. 59-Abb. 63, Seiten 66 - 68). Neben spezifisch induzierten Proteinen für jeden Zeitpunkt der Kultivierung im Nutristat gibt es 6 generell durch hohe Phenolkonzentration induzierte Proteine. Zu dieser Gruppe gehört das Protein 1 (Tab. 22). Das Protein 5 und die Catechol-1,2-dioxygenase sind Vertreter einer Gruppe von 20

Proteinen, die nach 24 h Wachstum im Nutristat bei 7,5 mM Phenol und nach Einwirkung von 18,5 mM Phenol verstärkt synthetisiert wurden. Die beiden Proteine wurden auch durch den Wechsel der Kohlenstoff- und Energiequelle im Chemostat von Acetat zu Phenol verstärkt. Die identifizierten Proteine ClpB (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 29) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbare Katalase (siehe Abschnitt 3.1.1 auf Seite 28) gehören zu einer kleinen Gruppe von Proteinen, die 1h und 4h nach Kultivierung im Nutristat sowie durch Gegenwart von 18,5 mM Phenol induziert wurden. Außerdem gibt es noch 14 Proteine, die nur nach 1h und 4h nach Kultivierung im Nutristat verstärkt induziert wurden. Die Proteine GroEl, DnaK und AhpF (siehe Abschnitt 3.1.2 auf Seite 29) wurden zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung induziert (Tab. 22).

**Tab. 22: Verstärkungsfaktoren einiger Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Phenol im Nutristat.** Hellgrau: mindestens 2fach induziert.

	GroEl	DnaK	HtpG	ClpB	AhpF	HPI	AhpC	Protein 1	Protein 5	CatA
MW	60	72	67	84	56	71	26	22	19	35
pI	4,79	4,65	4,73	5,21	4,76	5,23	4,77	5,41	4,91	4,76
1 h Nutristat, 7,5 mM Phenol	0,7	1,0	0,5	2,4	0,7	4,5	1,0	2,5	1,0	0,9
4 h Nutristat, 7,5 mM Phenol	0,7	1,0	0,6	2,8	0,4	5,5	1,4	3,9	1,1	0,7
24 h Nutristat, 7,5 mM Phenol	0,8	1,3	0,6	1,1	0,8	1,6	1,4	4,7	2,5	2,3
18,5 mM Phenol	0,9	1,8	2,0	3,3	1,3	4,0	2,1	5,5	3,7	2,0



**Abb. 57: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Acetat im Chemostat (Kontrolle).** Grün hervorgehoben: nach Wachstum im Chemostat auf Phenol verstärkt induzierte Proteine (vergleiche Abb. 58).

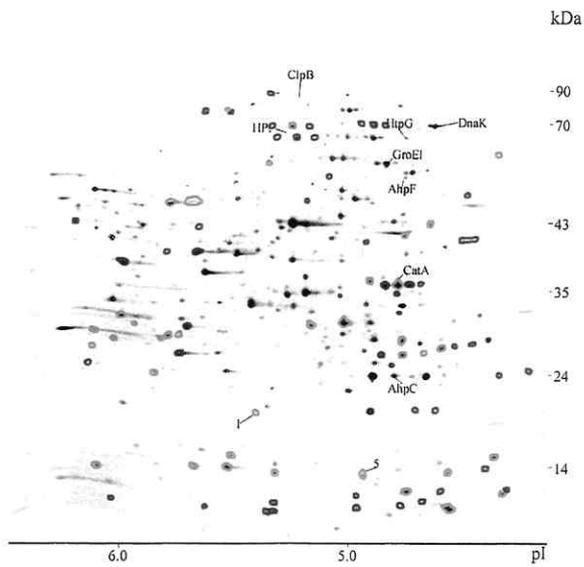


Abb. 58: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Phenol im Chemostat. Grün hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 57) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 57) neu sind.

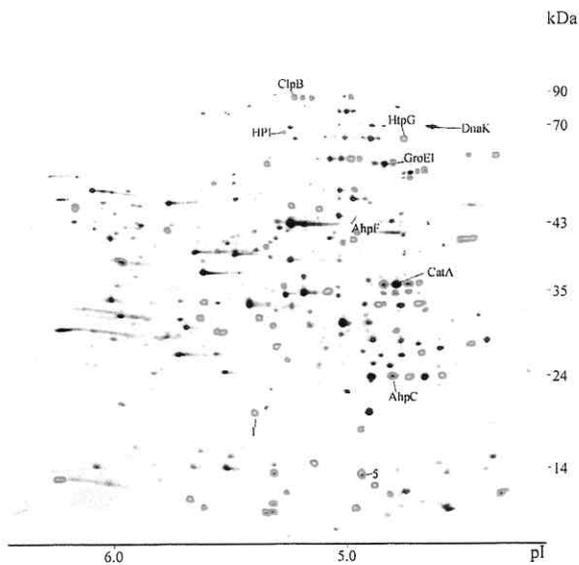
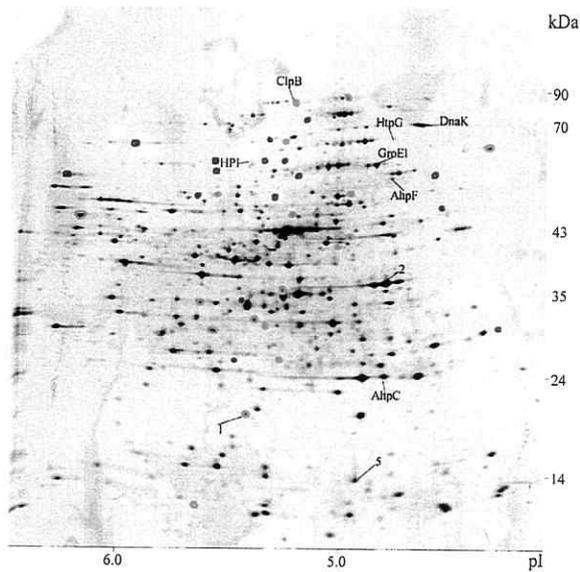
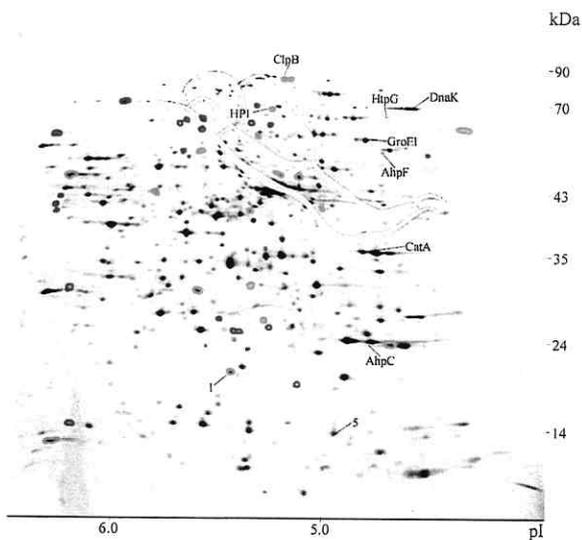


Abb. 59: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf Phenol im Chemostat (Kontrolle). Grün hervorgehoben: nach Wachstum im Nutristat auf Phenol verstärkt induzierte Proteine (vergleiche Abb. 60 - Abb. 63).



**Abb. 60:** Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach 1 h Wachstum auf 7,5 mM Phenol im Nutristat. Grün hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) neu sind.



**Abb. 61:** Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach 4 h Wachstum auf 7,5 mM Phenol im Nutristat. Grün hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) neu sind.

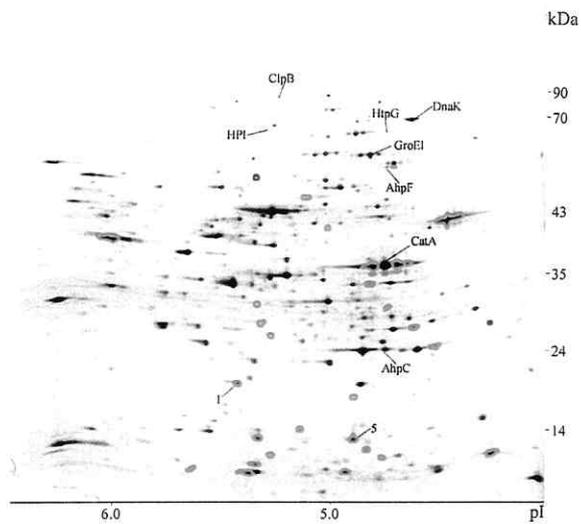


Abb. 62: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach 24 h Wachstum auf 7,5 mM Phenol im Nutristat. Grün hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) neu sind.

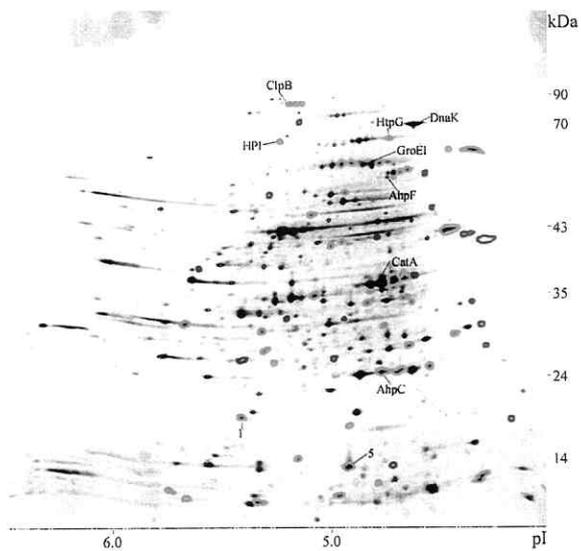


Abb. 63: Silbergefärbtes zweidimensionales Proteinmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Wachstum auf 18,5 mM Phenol im Nutristat. Grün hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) verstärkt sind. Rot hervorgehoben: Proteine, die gegenüber der Kontrolle (Abb. 59) neu sind.

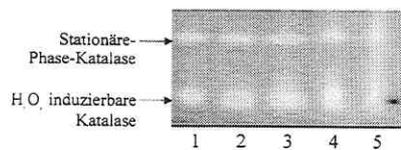
### 3.4.2.3.3 Einfluß der Phenolkonzentration auf die Aktivität der Katalase

Die Aktivität der Katalase in zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus* nahm nach 24 h Kultivierung im Nutristat gegenüber der Kultivierung im Chemostat auf fast das Doppelte zu (Tab. 23). Die weitere Erhöhung der Phenolkonzentration, nach Überdosierung von Phenol, verursachte eine zusätzliche Steigerung der Aktivität.

**Tab. 23: Aktivität der Katalase und Phenolkonzentration nach Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* im Nutristat**

Probe	Chemostat D=0,2 h <sup>-1</sup> (Kontrolle)	Nutristat 10 mM Phenol	Nutristat 10 mM Phenol	Nutristat 10 mM Phenol	Nutristat 10 mM Phenol
Zeit in h	24	1,5	4	24	
Phenol in mM	0	7,8	7,4	7,6	18,5
Wachstumsrate $\mu$	0,20	0,02	0,002	0,07	
spezifische Aktivität in U/mg	29,5	46,8	45,8	56,2	73,0

Nach der nativen Elektrophorese der zellfreien Extrakte mit anschließender Aktivfärbung konnte nicht eindeutig gezeigt werden, durch welche Isoform der Katalase die Zunahme der Gesamtaktivität hervorgerufen wurde (Abb. 64). Bei allen Proben wird ein leichter Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierbaren Katalase (HPI) vermutet.



**Abb. 64: Aktivfärbung der Katalase nach nativer Elektrophorese von zellfreien Extrakten von *Acinetobacter calcoaceticus*. 50  $\mu$ g Protein /Spur. Spur 1: Chemostat D=0,2 h<sup>-1</sup>, Spur 2: 1 h Nutristat 7,5 mM Phenol, Spur 3: 4 h Nutristat 7,5 mM Phenol, Spur 4: 24 h Nutristat 7,5 mM Phenol, Spur 5: 18,5 mM.**

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Antwort auf Chemikalienstreß in *Acinetobacter calcoaceticus*

*Acinetobacter calcoaceticus* antwortet auf die Einwirkung von Chemikalien und auf Bedingungen wie Hitzeschock, oxidativer Streß, Limitation oder Wechsel der Kohlenstoff- und Energiequelle mit der Synthese von Proteinen, die anhand ihrer Aktivität oder in zweidimensionalen Proteinmustern nachgewiesen wurden. Die Zahlen der induzierten Proteine als Antwort auf einen Streß liegt zwischen 35 und 81 und entsprechen denen, die auch bei anderen Bakterien wie *Escherichia coli* (Blom et al., 1992), *Pseudomonas putida* (Givskov et al., 1994), *Brucella abortus* (Rafie-Kolpin et al., 1996) und *Enterococcus faecalis* (Flahaut et al., 1996) als Antwort auf die Veränderung von Milieufaktoren wie Chemikalien, Temperatur und pH-Wert gefunden wurden. Der Grad der Ähnlichkeit der Proteinmuster untereinander, repräsentiert durch gemeinsam induzierte Proteine, von denen einige markante durch Vergleich der N-terminalen Aminosäuren identifiziert wurden, wurde zur Beurteilung der Antwort auf Chemikalien herangezogen. Die Antworten auf Hitzeschock, oxidativen Streß, Limitation und Wechsel der Kohlenstoff- und Energiequelle dienten dafür als Referenz. Darüber hinaus gibt es in *Acinetobacter calcoaceticus* wie bei *Escherichia coli* (Blom et al., 1992; Gage und Neidhardt, 1993), *Pseudomonas putida* (Lupi et al., 1995) und *Listeria monocytogenes* (Phan-Thanh und Gormon, 1997) zahlreiche durch Chemikalieneinwirkung oder durch einzelne Substanzen induzierte Proteine, deren Funktion ungeklärt ist.

### 4.2 Die Antwort auf Hitzeschock als Schutz gegen hydrophobe Substanzen

#### 4.2.1 Die Antwort auf Hitzeschock von *Acinetobacter calcoaceticus*

Bereits vor Beginn der Arbeit war bekannt, daß *Acinetobacter calcoaceticus* auf Hitzeschock mit der Synthese von Proteinen reagiert (Benndorf, 1996). Die größere Anzahl von 54 bzw. 69 gegenüber 24 Proteinen (Benndorf, 1996), die durch Hitzeschock induziert wurden, ist sowohl auf eine verbesserte Trennleistung der zweidimensionalen Elektrophorese, eine optimierte Färbung der Proteine als auch auf die Senkung der Nachweisbarkeitsgrenze von verstärkten Proteinen zurückzuführen. Die zunächst anhand ihrer isoelektrischen Punkte und Molekulargewichte vermutete Existenz der Hitzeschockproteine GroEl und DnaK konnte durch N-terminale Sequenzierung bestätigt werden. Die ermittelten Aminosäuresequenzen der Proteine GroEl und DnaK (Benndorf et al., 1999) sind nur zu 55 % bzw. 60 % identisch mit den Sequenzen der respektiven Proteine eines halophilen Spezies der Gattung *Acinetobacter* (Tokunaga et al., 1997). Sie zeigen aber jeweils eine höhere Homologie von 75 % zu GroEl von *Pseudomonas putida* und von 72 % zu DnaK von *Legionella pneumophila*. Beide Bakterien gehören wie *Acinetobacter calcoaceticus* zur  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien. Eine Ursache für die geringere Homologie zwischen den N-terminalen Aminosäuresequenzen der Hitzeschockproteine innerhalb der Gattung *Acinetobacter* könnte die genetische und

biochemische Heterogenität innerhalb dieser Gattung (Ino und Nishimura, 1989) sein. Die beiden Hitzeschockproteine, GroEl und DnaK, wurden in den Proteinmustern auch durch Immunfärbung mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Die geringere Affinität der anti-DnaK Antikörper zu dem DnaK Protein von *Acinetobacter calcoaceticus* als zu dem von *Escherichia coli* deutet auf Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der DnaK-Proteine beider Organismen hin (Eremeeva et al., 1998). Die in den Proteinmustern nach Hitzeschock zusätzlich zu GroEl und DnaK mit den Antikörpern angefärbten Proteine sind wahrscheinlich Abbauprodukte derselben. Die spezifische Anfärbbarkeit der Proteine GroEl und DnaK ermöglicht ihre schnelle und mit geringen Aufwand durchführbare Quantifizierung in Dotblotts von zellfreien Extrakten. Neben den Proteinen DnaK und GroEl wurden außerdem noch das Vorhandensein der Hitzeschockproteine HtpG (Benndorf et al., 1999) und ClpB in den zweidimensionalen Proteinmustern anhand ihrer N-terminalen nachgewiesen. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen sind zu 46 % mit dem Protein HtpG von *Helicobacter pylori* bzw. zu 55 % mit dem Protein ClpB von *Haemophilus influenzae* identisch. Die Existenz der Proteine GroEl, DnaK, HtpG und ClpB läßt die Vermutung zu, daß die zur Funktion der Chaperonkomplexe oder der proteolytischen Aktivität außerdem noch notwendigen Hitzeschockproteine GroEs, DnaJ, GrpE und ClpP ebenfalls in *Acinetobacter calcoaceticus* vorhanden sind. Ein Protein mit dem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 12 kDa, welches nach Hitzeschock induziert wurde, ist wahrscheinlich das Hitzeschockprotein GroEs. Darüber hinaus kann angenommen werden, daß bei *Acinetobacter calcoaceticus* auf Grund seiner Zugehörigkeit zur  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien der Sigmafaktor  $\sigma^{32}$ , dessen Aminosäuresequenzen innerhalb dieser Gruppe hoch konserviert sind (Nakahigashi et al., 1995; Nakahigashi et al., 1998), an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt ist.

#### **4.2.2 Die Induktion von Hitzeschockproteinen durch hydrophobe Chemikalien als Resistenzmechanismus**

*Acinetobacter calcoaceticus* antwortet auf die Gegenwart der primären Alkohole Ethanol, Butanol und Hexanol mit der Synthese von Hitzeschockproteinen. Für die maximale Induktion des Hitzeschockproteins DnaK wurden mit steigender Kettenlänge immer geringere Mengen der primären Alkohole gebraucht. Interessanterweise verursachten etwa dieselben Abstufungen der Konzentrationen der primären Alkohole vergleichbare Hemmeffekte auf die Wachstumsrate, die Atmungsrate und die ATP-Synthese von *Acinetobacter calcoaceticus*. Ein analoger Zusammenhang zwischen Toxizität der primären Alkohole und der Synthese des DnaK homologen Hitzeschockproteins in Eukaryoten konnte bereits bei Glioma-Zellen von Ratten beobachtet werden (Neuhaus-Steinmetz et al., 1993). Beide Befunde an zwei sehr unterschiedlichen Systemen lassen die Schlußfolgerung zu, daß eine Korrelation zwischen der Toxizität und der Lipophilizität der primären Alkohole besteht. Die mit steigender Kettenlänge der primären Alkohole zunehmende Lipophilizität, repräsentiert durch ihren

Verteilungskoeffizienten im System Oktanol und Wasser ( $\log k_{\text{Oktanol/Wasser}}$ ), verursacht trotz immer kleinerer äußerer Konzentrationen ähnliche Gleichgewichtskonzentrationen in der cytoplasmatischen Membran.

Zusätzlich zu DnaK wurden in *Acinetobacter calcoaceticus* auch die Hitzeschockproteine HtpG und ClpB durch die eingesetzten primären Alkohole induziert. Das Protein GroEl wurde nur durch Ethanol und Wärme induziert. Ein sich anhand der Induktion von GroEl andeutender Unterschied in der Induktion von Hitzeschockproteinen nach Einwirkung von Ethanol einerseits und von Butanol und Hexanol andererseits konnte auch anhand der Induktionsmuster weiterer funktionell nicht charakterisierter Proteine beobachtet werden. Neben den generellen Proteinen, die durch alle drei Alkohole und Hitze induziert wurden und zu denen auch einige als Abbauprodukte von GroEl und DnaK identifizierte Proteine gehören, gab es zwei weitere Gruppen von Proteinen. Die einen wurden nur durch Ethanol und Hitze induziert, die anderen nur durch Butanol, Hexanol und Hitze. Trotz der Unterschiede der Antwort auf den Einfluß der primären Alkohole in Abhängigkeit von der Kettenlänge kann angenommen werden, daß zumindest einige der an der Hitzeschockantwort beteiligten Proteine in ihrer Funktion als molekulare Chaperone durch die Faltung von Proteinen und als Proteasen durch den Abbau denaturierter Proteine zur Resistenz gegenüber primären Alkoholen beitragen. Die unterschiedlich starke Induktion der Hitzeschockproteine als Antwort auf die Einwirkung primärer Alkohole könnte ein Hinweis auf verschiedene Mechanismen der Regulation der Hitzeschockantwort bei *Acinetobacter calcoaceticus* sein.

Die synergistische Wirkung von Ethanol und Temperaturerhöhung auf die Synthese von Hitzeschockproteinen in *Acinetobacter calcoaceticus*, die auch in dem Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet wurde (Piper, 1995), legt die Vermutung nahe, daß ein gemeinsamer Mechanismus der Induktion der Hitzeschockproteine durch Ethanol und Hitzeschock vorliegt. Die Tatsache, daß Ethanol und Butanol in *Acinetobacter calcoaceticus* ebenfalls synergistischen Einfluß auf die Synthese des Hitzeschockproteins DnaK haben, könnte darauf hinweisen, daß dieser Mechanismus auch für die Antwort auf höhere primäre Alkohole in Frage kommt. Als gemeinsamer Wirkungsort von primären Alkoholen und Wärme wurde schon oft die cytoplasmatische Membran der Bakterien (Ingram, 1976) beschrieben. Sowohl Wärme (Mejia et al. 1995) als auch primäre Alkohole verursachen eine Erhöhung der Fluidität von Membranen. Um die Fluidität konstant zu halten, reagieren Bakterien, auch *Acinetobacter calcoaceticus*, mit der Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membranen (Loffhagen et al., 1995). Deshalb könnte die Änderung der Fluidität ein weiteres Signal (Vigh et al., 1998) für die Synthese der Hitzeschockproteine sein. Diese These wird zunehmend durch Ergebnisse bestätigt, die eine Assoziation sowohl niedermolekularer Hitzeschockproteine (Jobin et al., 1997) als auch von GroEl mit der cytoplasmatischen Membran (Bochkareva et al., 1998) zeigen. Die Veränderung der Fluidität

könnte aber auch sekundäre Folgen, wie die Verringerung der ATP-Syntheserate zum einen durch Hemmung des Elektronentransports in der Membran und zum anderen durch Störung des Protonengradienten über die Membran, haben. Der Mangel an intrazellulären Energieresourcen verursacht durch die Elektronentransportphosphorylierung entkoppelnde Substanz Dinitrophenol, führte in *Escherichia coli* tatsächlich zur verstärkten Synthese von Hitzeschockproteinen (Gage und Neidhardt, 1993). Der Energiemangel soll zur Verringerung des energieabhängigen Exportes naszierender Proteine und deren Akkumulation im Cytoplasma führen, welches dann das eigentliche Signal für die Induktion der Hitzeschockproteine ist. Dieser zweite Mechanismus der Initiierung der Hitzeschockantwort ist für *Acinetobacter calcoaceticus* unwahrscheinlich, da durch Anwesenheit von Dinitrophenol keine erhöhte Hitzeschockproteinsynthese nachgewiesen wurde (Benndorf et al., 1997; Benndorf 1996). Geht man vom ersten Modell aus, könnten die Unterschiede zwischen der Induktion der Hitzeschockantwort durch Ethanol und durch die beiden höheren primären Alkohole damit erklärt werden, daß sich Ethanol auf Grund seiner geringeren Lipophilizität eher im Bereich der polaren Kopfgruppen in die cytoplasmatische Membran einlagert, während sich Butanol und Hexanol eher in der „Tiefe“ der Membran zwischen den Fettsäureresten anordnen (Ingram, 1976), was zu einer unterschiedlichen Initiation der membranabhängigen Triggermechanismen führt. Darüber hinaus könnte die Gegenwart hoher Ethanolkonzentrationen zur verstärkten Denaturierung von Proteinen im Cytoplasma führen, was ebenfalls ein Signal für die Induktion der Hitzeschockantwort wäre.

Ausgehend von der Tatsache, daß die Lipophilizität einer Substanz ihre Fähigkeit zur Induktion der Hitzeschockproteine bestimmt, sollten Chemikalien wie Phenol und Catechol entsprechend ihres Verteilungskoeffizienten im System Oktanol und Wasser ( $\log k_{\text{Oktanol/Wasser}}$ ) ebenfalls zur Synthese von Hitzeschockproteinen führen. Tatsächlich verursachten beide Substanzen bei gleichen eingesetzten Mengen die Induktion der Hitzeschockproteine DnaK und ClpB. Die Induktion beider Hitzeschockproteine war als Antwort auf Phenol, die Substanz mit dem größeren  $\log k_{\text{Oktanol/Wasser}}$ , stärker als auf Catechol. Das Hitzeschockprotein HtpG wurde allein durch Phenol mehr als zweifach induziert. Eine erhöhte Expression der htpG, dnaK und clpB Gene von *Escherichia coli* durch Phenol wurde bereits anhand der lacZ (Van Dyk et al., 1994), luxCDABE (Mason et al., 1999) bzw. gfp (Cha et al., 1999) Reportersysteme nachgewiesen. Die Proteinmuster nach Einwirkung von Phenol waren der Antwort auf Hitzeschock ähnlicher als die nach Einwirkung von Catechol. Um eine gleich starke Induktion von Hitzeschockproteinen in Antwort auf Catechol zu erreichen, hätte die geringere Lipophilizität von Catechol durch eine höhere Menge an Catechol kompensiert werden müssen. Dies war nicht möglich, da Catechol bereits bei gleich großen Mengen wie Phenol und annähernd gleicher Hemmung von Atmungsrate und ATP-Synthese eine deutlich stärkere Hemmung der Wachstumsrate verursachte, was ein Indiz für einen toxischen Effekt sein könnte, der nicht auf einem „lipophilen Angriff“ beruht.

*Acinetobacter calcoaceticus* ist in der Lage, Phenol und die primären Alkohole, deren Anwesenheit zur Induktion von Hitzeschockproteinen führte, als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Experimente, bei denen das Wachstumssubstrat durch den Einsatz höherer Ausgangskonzentrationen gleichzeitig zur toxischen Substanz wurde, sollten die Frage beantworten, ob Hitzeschockproteine induziert werden. Die hohen Mengen primärer Alkohole und von Phenol verursachten die Verlängerung der lag-Phasen und die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Nach Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf hohen Konzentrationen von Ethanol und Butanol konnte neben der Induktion vieler funktionell nicht charakterisierter Proteine vor allem die Induktion der Hitzeschockproteine DnaK und ClpB festgestellt werden. Die Syntheserate von ClpB war aber fast um die Hälfte niedriger als nach einstündiger Einwirkung von Ethanol und Butanol während des Wachstums auf Acetat. Das Hitzeschockprotein HtpG wurde nur nach Ethanoleinwirkung induziert. Ursache für die schwache Induktion der Hitzeschockantwort könnte einerseits der Einsatz geringerer Mengen der primären Alkohole in diesem Versuch sein. Andererseits wurde bereits beschrieben, daß die Menge der Hitzeschockproteine nach Überwindung der Schocksituation sich im Rahmen einer längerfristigen Adaptation an einen Stressor wieder verringert. Dabei kann sich ein erhöhtes stationäres Niveau an Hitzeschockproteinen einstellen (Herendeen et al., 1979; Heitzer et al., 1992), das auch nach Überwindung der Schocksituation notwendig ist, um den durch die dauerhafte Einwirkung des Stressors erhöhten Bedarf an Chaperonen für die Renaturierung oder an Proteasen für den Abbau geschädigter Proteine bereitzustellen. Der Vergleich der kontinuierlichen Kultivierungen von *Acinetobacter calcoaceticus* im Chemostat und im Nutristat auf Phenol zeigt, daß das in der „Phenolschocksituation“ (1h und 4h nach Erhöhung der Phenolkonzentration von 0 mM auf 7,5 mM) induzierte Hitzeschockprotein ClpB bei der langfristigen Auseinandersetzung mit hohen Phenolmengen (24 h in Gegenwart von 7,5 mM) nicht mehr induziert war. In einer weiteren Schocksituation, nach Steigerung auf insgesamt 18,5 mM Phenol, wurde es erneut induziert. Im Falle der langfristigen Anpassung an hohe Konzentrationen von Phenol wird im stärkeren Maße als bei der langfristigen Anpassung an hohe Konzentrationen primärer Alkohole deutlich, daß neben Hitzeschockproteinen, die in der Schockphase die Zellen durch Wiederherstellung oder Abbau geschädigter Proteine stabilisieren, andere Proteine maßgeblich zur Adaptation beitragen.

#### **4.3 Die Antwort auf oxidativen Streß als Schutz gegen reaktive Substanzen**

##### **4.3.1 Die Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf oxidativen Streß**

*Acinetobacter calcoaceticus* antwortet auf die Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit der Synthese von Proteinen, von denen einige bereits nach eindimensionaler Trennung detektiert werden konnten. Die Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gleicht derjenigen, die auch bei *Escherichia coli* (Belkin et al., 1996) und *Bacillus subtilis* (Engelmann und Hecker, 1996) zur Induktion von

Proteinen durch oxidativen Streß führen. Die Erhöhung der Resistenz gegenüber lethalen  $H_2O_2$ -Streß durch die Vorinkubation mit niedrigen Konzentrationen von  $H_2O_2$  läßt die Vermutung zu, daß die Synthese einiger Proteine als Antwort auf oxidativen Streß die Schädigung der Zelle verhindert. Tatsächlich konnte die Induktion einer Katalaseaktivität gezeigt werden. Aber nur ein Isoenzym zeigte eine starke Induktion nach Einwirkung von  $H_2O_2$ . Das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt und das Induktionsverhalten dieser Katalase gleichen der durch den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor OxyR regulierten Katalase (HP I, Hydroperoxidase I) von *Escherichia coli*, die vom KatG Gen codiert wird. Die Synthese Alkylhydroperoxidreduktaseeinheiten AhpC und AhpF, die ebenfalls nach Einwirkung von  $H_2O_2$  stark induziert wurden, könnte auch durch den Transkriptionsfaktor OxyR von *Acinetobacter calcoaceticus* reguliert werden, der bereits als Gen in *Acinetobacter* sp. ADP1 nachgewiesen wurde (Geißdörfer et al., 1999). Beide Proteine sind zu 72 % bzw. 75 % identisch mit den homologen Proteinen von *Xanthomonas campestris* (Loprasert et al., 1997), eines Bakteriums, das wie *Acinetobacter calcoaceticus* zur  $\gamma$ - Gruppe der Proteobakterien gehört. Die spezifische Immunfärbung von AhpC mit polyklonalen Antikörpern führte zum überraschenden Nachweis von zwei weiteren Isoformen mit identischen Molekulargewichten und verschiedenen isoelektrischen Punkten. Eine Isoform ist bereits unter nicht induzierenden Bedingungen vorhanden, währenddessen das Protein, von dem die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt wurde (wenn die Induktion des Proteins AhpC im Zusammenhang mit Chemikalien- oder Hitzeschock genannt wird, ist immer dieses Protein gemeint), und ein weiteres Protein nur nach  $H_2O_2$ -Streß induziert wurden. Die Verschiebung ihrer isoelektrischen Punkte im Vergleich zu dem unter Kontrollbedingungen bereits vorhandenen Protein um etwa 0,1 bzw. 0,2 pI-Einheiten ins Saure könnte ein Hinweis auf eine Modifizierung als Antwort auf oxidativen Streß sein. Eine Modifizierung durch Bindung von Glutathion, wie es für die AhpC von *Escherichia coli* vorgeschlagen wurde (Asad et al., 1998), kommt nicht in Frage, da die reduzierenden Bedingungen während der zweidimensionalen Elektrophorese zur Spaltung der Disulfidbrücke zwischen AhpC und Glutathion geführt hätten. Die geringere Affinität der Antikörper zu den modifizierten Enzymformen deutet darauf hin, daß wenigstens eine Modifizierung im Bereich der 14 N-terminalen Aminosäuren, die zur Immunisierung eingesetzt wurden, stattfindet. Als Modifizierungen, die zur Verschiebung des pI- Wertes von Proteinen ins Saure führen, sind Desaminierung, Glykosylierung und Phosphorylierung u.a. denkbar. Der Nachweis der Phosphorylierung als Modifizierung könnte einerseits durch die Behandlung von Zellextrakten mit Proteinphosphatasen und anschließender zweidimensionaler Elektrophorese geführt werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, die Phosphorylierung von Proteinen unter Streß anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem [ $^{32}P$ ]-Phosphat in Proteine anhand zweidimensionaler Proteinmuster (Seeger et al., 1996) zu verfolgen. Ob die Modifizierung des Enzyms als Antwort auf oxidativen Streß letztendlich zur Erhöhung der

Resistenz gegenüber Peroxiden beiträgt, müßte nach der weiteren Charakterisierung der Isoenzyme beurteilt werden.

#### **4.3.2 Die Induktion von Proteinen der Antwort auf oxidativen Streß durch reaktive Chemikalien als Resistenzmechanismus**

*Acinetobacter calcoaceticus* antwortet auf die Einwirkung von Phenol und Catechol mit der Synthese einiger Proteine, die zum oben diskutierten oxyR-Regulon gehören. Obwohl gleiche Konzentrationen beider Verbindungen eingesetzt wurden, unterschieden sich die beiden Antworten qualitativ und quantitativ. Während als Antwort auf Phenol nur das Protein AhpC leicht induziert wurde, verursachte Catechol die Induktion aller drei zum OxyR-Regulon gehörenden Proteine, der Katalase HPI und beider Untereinheiten der Alkylhydroperoxidreduktase AhpC und AhpF. Ihre Induktion führte auch zu einer stärkeren Erhöhung der Resistenz von *Acinetobacter calcoaceticus* gegenüber lethalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Vorinkubation mit Catechol im Vergleich zur Vorinkubation mit Phenol. Die größere Zahl von gemeinsamen Proteinen als Antwort auf Catechol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einwirkung im Vergleich zu den gemeinsamen Proteinen als Antwort auf Phenol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einwirkung ist ein weiterer Hinweis, daß die Anwesenheit von Catechol eine Antwort der Zellen hervorruft, die für oxidativen Streß typisch ist.

Ausgehend von der Tatsache, daß die vom Transkriptionsfaktor OxyR abhängige Antwort auf oxidativen Streß durch das Vorhandensein erhöhter Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wird (Belkin et al., 1996), kann angenommen werden, daß vor allem auch die Einwirkung von Catechol zu dessen Bildung führt. Die Quantifizierung einer verstärkten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (Gonzalez-Flecha und Demple, 1997) während der Einwirkung von Catechol würde eine Bestätigung dieser Annahme ermöglichen. Wie aber bereits bei verschiedenen Organismen (Bryant und Schultz, 1994; Bogé und Roche, 1996; Selassie et al., 1998) gezeigt wurde, könnte die Toxizität von Catechol wahrscheinlich auf der Reaktivität der Diphenole, die eine Bildung von Sauerstoffradikalen durch den Mechanismus des Redoxcyclings an der Atmungskette verursachen, beruhen. Semichinone, die durch Oxidation dieser Diphenole entstehen, sind in der Lage Elektronen von Reduktasen der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff (Kappus und Sies, 1981) zu übertragen. Das entstehende Superoxidanion wird wahrscheinlich durch eine Superoxiddismutase zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt, welches der Induktor der oxyR-abhängigen Antwort sein könnte. Obwohl als Antwort auf Catechol einige Proteine spezifisch induziert wurden und bereits das Gen einer Superoxiddismutase von *Acinetobacter calcoaceticus* beschrieben wurde (Geißdörfer et al., 1997), konnte dieses Enzym bisher noch nicht in zweidimensionalen Proteinmustern nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der Diphenole, wie auch von Catechol, sich in Membranen lösen zu können, bestimmt neben der Reaktivität der Verbindung ihre Toxizität. Die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale durch Catechol, die Membranen, Proteine und Nukleinsäuren von *Acinetobacter calcoaceticus* schädigen, ist wahrscheinlich die Ursache für die stärkere Hemmung des Wachstums durch

Catechol im Vergleich zu Phenol bei durchaus ähnlicher Hemmung der Atmung und ATP-Synthese.

Während des Wachstums auf Phenol wird Catechol als erstes Zwischenprodukt bei der Oxidation von Phenol in *Acinetobacter calcoaceticus* gebildet. Dabei kann es sich auch vorübergehend im Wachstumsmedium anreichern (Paller et al., 1995). Entsprechend der oben beschriebenen Vermutung könnte auf die Anreicherung von Catechol eine verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen folgen, was zu einer Hemmung des Wachstums auf Phenol führen könnte. Deshalb wurde die Induktion der OxyR-abhängigen Katalase HPI als ein Marker für den toxischen Einfluß von akkumuliertem Catechol genutzt. Obwohl die Katalase HPI tatsächlich während der „Phenolschocksituationen“ beim Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Phenol im Nutristat induziert wurde, kann das nicht auf die Wirkung von Catechol zurückgeführt werden, da zu keinem Zeitpunkt Catechol im Medium nachweisbar war. Wurde jedoch Catechol selbst als Substrat eingesetzt, konnte eine schwache Induktion von HPI gezeigt werden. Bei Bakterien, die Verbindungen wie Pentachlorphenol oxidieren, entstehen Zwischenprodukte wie zum Beispiel Tetrachlorhydrochinon, die einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Catechol haben könnten, aber um ein Vielfaches toxischer sind. Diese Bakterien halten deshalb die intrazellulären Konzentrationen dieser Verbindungen so niedrig wie möglich (McCarthy et al., 1997). Gleichzeitig könnten bei diesen Mikroorganismen die durch oxidativen Streß induzierbaren Proteine zur Detoxifizierung der entstehenden Radikale beitragen.

Faktoren wie hohe Mengen primärer Alkohole, Phenol und selbst Hitzeschock verursachen auch eine leichte Induktion eines oder mehrerer OxyR-abhängiger Proteine. Die Induktion der Proteine könnte dadurch hervorgerufen werden, daß sowohl erhöhte Temperatur als auch lipophile Substanzen den physikalischen Status der Membran und darüber vermittelt die Aktivität der darin eingelagerten Atmungskettenenzyme ändern, was zur einer verstärkten Bildung des Superoxidanions und anschließend von  $H_2O_2$  und organischer Peroxide führen könnte. Tatsächlich verursachte in *Escherichia coli* (Benov und Fridovich, 1995) und *Saccharomyces cerevisiae* (Davidson et al., 1996) die Deletion der Gene für Superoxiddismutase bzw. Katalase und Superoxiddismutase eine größere Empfindlichkeit beider Organismen gegenüber Hitzeschock in Gegenwart von Sauerstoff. Die Gegenwart von Sauerstoff ist eine experimentelle Bedingung, die für die Mehrheit der in der Literatur beschriebenen Hitzeschockexperimente zutrifft, was in Zukunft eine intensivere Betrachtung dieses Zusammenhanges erfordert.

Die Beteiligung einer Alkylhydroperoxidreduktaseunterheit AhpC, die durch Mutation eine höhere Affinität zu hydrophoben Substraten erhalten hat, bei der Ausbildung der Lösungsmittelresistenz in *Escherichia coli* (Ferrante et al., 1995) unterstreicht noch einmal die Bedeutung von Proteinen der oxidativen Streßantwort für die Resistenz gegenüber Chemikalien.

#### 4.4 Der produktive Abbau als Vorwärtsstrategie für Wachstum und Vermehrung

##### 4.4.1 Der Nachweis von Enzymen des produktiven Abbaus von Chemikalien

Der Wechsel der Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* von Acetat zu Ethanol, Butanol oder Phenol führte zur Induktion vieler Proteine, von denen aber nur einige am Stoffwechsel direkt beteiligt sein können. Die Funktion anderer Proteine wäre zum Beispiel der Transport der Substanzen durch die Membran.

Bei zwei während des Wachstums auf Ethanol und Butanol stark induzierten Proteinen könnte es sich wegen ihrer ähnlichen Molekulargewichte im Vergleich zu Enzymen von *Escherichia coli* um die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase (Adh2) und die NAD-abhängige Aldehyddehydrogenase (DhaL) handeln. Das Vorhandensein einer durch Ethanol induzierbaren Alkoholdehydrogenase und ihre NAD-Abhängigkeit konnte bereits in verschiedenen Stämmen von *Acinetobacter calcoaceticus* (Beardmore-Gray und Anthony, 1983) gezeigt werden. Die vermutete Alkoholdehydrogenase ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht identisch mit den beiden bisher im selben Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V nachgewiesenen Alkoholdehydrogenasen. Eine von ihnen ist eine konstitutives Enzym, von dem die kleinste Untereinheit ein Molekulargewicht von 61 kDa hat (Tauchert et al., 1976). Die andere wird durch Wachstum auf n-Alkanen, aber keinesfalls durch Ethanol induziert (Tauchert et al., 1975). Obwohl sowohl eine Alkoholdehydrogenase als auch eine Aldehyddehydrogenase von *Acinetobacter sp.* HO1-N, die ebenfalls durch Ethanol induziert werden, in nativen Elektrophogrammen nachgewiesen wurden (Singer und Finnerty, 1985), existieren bisher keine Angaben zu den Molekulargewichten dieser Enzyme nach ihrer Trennung mit der SDS-Elektrophorese, die eine weitere Bestätigung der Vermutung ermöglichen würden.

Einem während des Wachstums auf Phenol stark induzierten Protein wurde im Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung die Funktion der Catechol-1,2-dioxygenase zugeordnet. Catechol ist das Produkt der initialen Oxidation von Phenol durch die Phenolhydroxylase. Die Catechol-1,2-dioxygenase katalysiert als Schlüsselenzym des ortho-Weges die Spaltung des aromatischen Rings. Wie aus dem Sequenzvergleich ersichtlich wird, ist die N-terminale Aminosäuresequenz von *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V der Sequenz des Stammes NCIB 8250 deutlich ähnlicher als der des Stammes ADP1.

##### 4.4.2 Die Induktion abbauender Proteine als Resistenzmechanismus

Wenn Bakterien in Gegenwart hoher Konzentrationen ihrer Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, kann es zur Substratüberschußhemmung kommen. Die Gegenwart der Wachstumssubstrate Ethanol, Butanol und Phenol führte in *Acinetobacter calcoaceticus* in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zur teilweisen oder vollständigen Hemmung des

Wachstums. Für Phenol kann vermutet werden, daß die Inhibierung des Wachstums durch die Hemmung der Phenoloxidation durch Phenol selbst verursacht wird, da die Phenoloxidation und das Wachstum auf Phenol gleich stark durch Phenol inhibiert werden. Diese Annahme wird auch noch dadurch bestätigt, daß die Hemmbarkeit der Veratmung anderer Substrate, zum Beispiel Acetat, durch Phenol deutlich geringer ist. Eine Möglichkeit zur Überwindung der limitierten Oxidationsleistung wäre die verstärkte Synthese der an der Oxidation beteiligten Enzyme. Während nach Wachstum auf hohen Mengen von Ethanol oder Butanol keine Induktion der Alkoholdehydrogenase und der Aldehyddehydrogenase beobachtet werden konnte, wurde die Catechol-1,2-dioxygenase durch das Wachstum auf hohen Mengen von Phenol induziert. Die erhöhte Induktion der Catechol-1,2-dioxygenase war erst zu dem Zeitpunkt nachweisbar, bei dem die Kultur sich, gemessen an der Wachstumsrate, an die hohen Phenolmengen adaptiert hatte. Die Kompensation der Hemmung eines an der Oxidation beteiligten Enzyms durch Erhöhung seiner Menge wurde bereits für die Catechol-2,3-dioxygenase von *Ralstonia eutropha* nach Wachstum auf inhibierenden Phenolmengen (Léonard und Lindley, 1999) beschrieben. Dieser Kompensationsmechanismus von *Acinetobacter calcoaceticus* sollte aber nicht überbewertet werden, da sich die Fähigkeit zur Oxidation von Phenol im Vergleich zu nicht adaptierten Zellen (24 h) nur um etwa 20 % erhöht hat.

#### **4.5 Entwicklung einer generellen Resistenz beim Eintritt in die Stationäre-Phase**

##### **4.5.1 Der Nachweis der Stationäre-Phase-Katalase**

*Acinetobacter calcoaceticus* besitzt wie viele andere Bakterien (Loewen und Switalla, 1987; Katsuwon und Anderson, 1989) neben der durch oxidativen Streß induzierbaren Katalase HPI noch eine weitere Katalase. Ihre Aktivität ist nach Kultivierung auf Phenol bei niedrigen Durchflußraten stark erhöht. Die Steigerung der Aktivität nach Kultivierung bei niedrigen Durchflußraten auch für das Wachstum auf Acetat zeigt, daß auch die Induktion anscheinend unabhängig von der eingesetzten Kohlenstoff- und Energiequelle ist. Die Gemeinsamkeit beider Experimente ist die Begrenzung der zur Verfügung stehenden Substratmenge bei der Kultivierung mit niedrigen Durchflußraten im Chemostat. Bei Batchkulturen von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* führt die Limitierung der Wachstumsgeschwindigkeit durch Begrenzung eines essentiellen Nährstoffes zur Ausprägung der Stationären-Phase-Antwort (Hengge-Aronis, 1996) bzw. der generellen Streßantwort (Hecker und Völker, 1998), zu der auch die Induktion einer Katalase gehört. Tatsächlich entspricht das Molekulargewicht der von der Wachstumsrate abhängigen Katalase von *Acinetobacter calcoaceticus* etwa dem errechneten Molekulargewicht der Stationäre-Phase-abhängigen Katalase HPII von *Escherichia coli*, die vom Gen KatE codiert wird. Da nur Ausschnitte der Proteilmuster von *Acinetobacter calcoaceticus* nach Kultivierungsbedingungen, die die Induktion HPII homologen Katalase hervorriefen, analysiert wurden, konnten keine weiteren Proteine, die in die Antwort auf den Eintritt in die stationäre Wachstumsphase von *Acinetobacter*

*calcoaceticus* involviert sind, nachgewiesen werden. Trotzdem kann vermutet werden, daß *Acinetobacter calcoaceticus* zusätzlich zur Synthese der Katalase HPII andere Proteine synthetisiert, die als Antwort auf die Limitierung des Wachstums zur Ausbildung einer unspezifischen Resistenz gegenüber verschiedenen Faktoren beitragen (Hengge-Aronis, 1996).

#### **4.5.2 Induktion der Stationären-Phase-Antwort als Resistenzmechanismus**

Die durch Verringerung der Wachstumsrate induzierte Katalase von *Acinetobacter calcoaceticus* eignet sich gut als Marker für die Induktion der stationären-Phase-Antwort in *Acinetobacter calcoaceticus*, da sie anhand ihrer Enzymaktivität und ihrer Menge in zweidimensionalen Proteinmustern gut quantifiziert werden konnte. Obwohl die Gegenwart von Chemikalien das Wachstum auf Acetat hemmte, blieb die Menge des Enzyms auf niedrigem Niveau konstant. Demgegenüber war sie nach Wachstum auf hohen Mengen von Butanol, die auch eine Verringerung der Wachstumsrate verursachten, im Niveau erhöht, was daraufhin deutet, daß in den Zellen trotz Substratüberschuß ein Zustand verursacht werden könnte, der der Stationären-Phase gleicht. Eine Ursache könnte die Hemmung von Enzymen sein, die das Substrat für die Zelle verfügbar machen. Das Phänomen der Induktion der Stationären-Phase-Antwort durch einen Überschuß des Substrates wurde erstmals bei *Pseudomonas putida* mt-2 während des Wachstums auf Toluol gezeigt (Vercellone-Smith und Herson, 1997). Obwohl das Wachstum von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Phenol im Nutristat in Analogie zu den Versuchen mit *Pseudomonas putida* mit Toluol als Substrat vorübergehend vollständig gehemmt wurde und die Wachstumsrate nach einer Adaptationsphase deutlich verringert war, konnte in keinem Zustand die Induktion der Stationären-Phase-Katalase nachgewiesen werden. Das Resultat, daß die Stationäre-Phase-Antwort unter diesen Bedingungen nicht induziert wurde, ist angesichts des Ergebnisses, daß hohe Konzentrationen von Phenol seine Oxidation durch die Zellen selbst hemmen, was eine Situation ähnlich einem Mangels an Kohlenstoff oder Energie verursachen könnte, unerwartet. Andererseits ist es aber auch möglich, daß die Neusynthese der Stationären-Phase-Katalase während des Phenolschocks bei *Acinetobacter calcoaceticus* zu gering war, so daß sie nicht über eine Zunahme des Anteils im Proteinmuster, sondern wie bei *Pseudomonas putida* nur anhand der direkten Messung der Neusynthese Proteinen durch Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin hätte erfaßt werden können.

#### **4.6 Das Vielfalt der Mechanismen von *Acinetobacter calcoaceticus* als Antwort auf die Einwirkung von Chemikalien**

In den vorangegangenen Abschnitten stand der Beitrag einzelner Mechanismen der Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf die Einwirkung von Chemikalien und ihr Beitrag zur Resistenz im Vordergrund. Die Analyse der Antworten zeigte, daß eine Substanz entsprechend ihrer chemischen und physikochemischen Eigenschaften sowie entsprechend den Kultivierungsbedingungen hauptsächlich die Induktion einer Gruppe von Proteinen

verursacht, die typisch für ihren Wirkmechanismus sind. Die Induktion anderer Proteine ist ein Zeichen dafür, daß neben dem bevorzugten Mechanismus als Antwort auf eine Substanz weitere Resistenzmechanismen involviert sein können. So sind die beiden aromatischen Verbindungen Phenol und Catechol Induktoren sowohl für die Antwort auf oxidativen Streß als auch auf Hitzeschock. Das Ausmaß der Induktion wird jedoch durch die jeweilige Lipophilizität und Reaktivität der Chemikalien bestimmt. Phenol induziert vermutlich wegen seiner Lipophilizität stärker die Hitzeschockantwort, während Catechol wegen seiner Reaktivität stärker die Antwort auf oxidativen Streß induziert. Die Induktion des Proteins AhpC nach nahezu allen Einwirkungen könnte aber auch darauf beruhen, daß einige Proteine wie das Protein AhpC von *Bacillus subtilis* (Bernhardt et al., 1997) gleichzeitig in eine spezifische und eine generelle Streßantwort involviert sind.

Die spezifisch oder gemeinsam durch Chemikalien induzierten Proteine, die zu keinen der vier erkannten Resistenzmechanismen zugeordnet werden konnten, weisen auf bisher noch nicht wahrgenommene Adaptationsmechanismen hin. Die Vergrößerung des Spektrums der Einwirkungen, insbesondere der Einsatz von Substanzen, deren Wirkmechanismen bekannt sind, die Quantifizierung der Schädigung zellulärer Prozesse wie Elektronentransportphosphorylierung, Synthese von Zellsubstanz oder Stofftransport und die Analyse der erzeugten Proteinmuster, auch in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit, sollte eine zunehmend differenziertere Gruppierung der induzierten Proteine ermöglichen. In einigen Fällen kann die Gruppierung von Proteinen entsprechend der zu ihrer Induktion führenden Bedingungen auch irreführend sein, wie am Beispiel der Hitzeschockantwort auch anhand der hier vorliegenden Ergebnisse deutlich wird. Die Bezeichnung hat wohl eher historische als funktionelle Gründe hat. In Analogie zum Kälteschock, wo zwischen Kälteschockproteinen und Kälteadaptationsproteinen unterschieden wird (Panoff et al., 1997), bietet sich auch bei der Antwort auf Chemikalien von *Acinetobacter calcoaceticus* die Differenzierung zwischen Xenobiotikaschockproteinen (Xsp; Proteine, die nur transient in der Schocksituation induziert werden) und Xenobiotikaadaptationsproteinen (Xap; Proteine, die nach dem Schock kontinuierlich auf erhöhten Niveau induziert werden) an. Entsprechend der Befunde der Kultivierung von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Phenol im Nutristat könnte das Hitzeschockprotein ClpB als ein Xsp und die Catechol-1,2-dioxygenase (CatA) als ein Xap bezeichnet werden. Weiterhin kann anhand des Vergleich der Proteinmustern auf die Existenz von speziellen Antworten auf höhere primäre Alkohole und auf monocyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in *Acinetobacter calcoaceticus* geschlossen werden. In diesem Zusammenhang ist die Beteiligung eines Multi-Drug-Transporters, der zum mar-Regulon gehört und auch Lösungsmittel transportieren kann, denkbar. Bei anderen Bakterien wurde bereits die Induktion von Antibiotikaresistenz vermittelnden Proteinen als Antwort auf Lösungsmittel gezeigt (Aleksun und Levy, 1997). Die starke Induktion von spezifischen Proteinen nach Einwirkung von Catechol ist ein Indiz für zusätzliche Antworten neben der Antwort auf oxidativen Streß, die durch seine erhöhte Reaktivität hervorgerufen werden.

Wahrscheinlich sind auch Proteine involviert, die zur SOS-Antwort oder der vom Transkriptionsfaktor SoxRS abhängigen Antwort auf oxidativen Streß gehören. Beispielhaft für viele andere Proteine, die als Antwort auf Chemikalien unterschiedlich stark induziert werden, soll das Protein I erwähnt werden, das wegen seiner Induktion durch Butanol, Hexanol, Catechol und Phenol als generelles Chemikalienstreßprotein bezeichnet werden kann.

Angesichts der hohen Zahl von gefundenen Proteinen nach Einwirkung von Chemikalien, deren Funktion nicht bekannt ist, stellt sich die Frage, ob die erhöhte Synthese von Proteinen mit einer Resistenzerhöhung gleichzusetzen ist (Hightower and Ryan, 1997). Um in der Bewertung der Antwort auf Chemikalienstreß das Niveau der Spekulationen zu verlassen, bleibt letztendlich die Ermittlung der Funktion der induzierten Proteine der einzige Weg, ihre Bedeutung bei der Antwort auf die Veränderung eines Umweltfaktors beurteilen zu können. Alternativ zur Ermittlung der Funktion der Proteine könnte aber auch mehr Information über Proteine in Proteinmustern mit Hilfe spezifischer Nachweise von kovalent gebundenen Cofaktoren wie Cytochromen (Francis und Becker, 1983) oder Proteinmodifizierungen wie zum Glykosilierungen (Bayer et al., 1987) oder Phosphorylierungen gewonnen werden. Die subzelluläre Fraktionierung ist eine Möglichkeit, die Lokalisation der Proteine in der Zelle zu ermitteln. Dabei begrenzt die geringe Löslichkeit sehr hydrophober Membranproteine in wässrigen Systemen momentan ihre Trennbarkeit in der zweidimensionalen Elektrophorese (Santoni et al., 1999).

#### **4.7 Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus* als Biomarker für Chemostreß**

Die Kenntnisse, die über die Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf den Einfluß von Chemikalien und anderer Umweltfaktoren gesammelt wurden, zeigen Lösungsansätze, wie die Stabilität der Organismen und die Geschwindigkeit des Abbaus von Xenobiotika durch *Acinetobacter calcoaceticus* oder auch andere Schadstoffabauer, zum Beispiel durch die Überexpression Resistenz vermittelnder Proteine, gesteigert werden könnte. Außerdem stellen die Kenntnisse eine Grundlage für die Beurteilung seiner Antwort auf andere Chemikalien oder Umweltbedingungen dar. In Abb. 65 werden noch einmal die wichtigsten durch Chemostreß induzierbaren Proteine entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einer Streßantwort farbig hervorgehoben dargestellt. Die Fähigkeit einer Substanz zur Induktion einer oder mehrerer identifizierter Streßantworten läßt Rückschlüsse über die Qualität und die Quantität ihrer Toxizität zu. Wie für die homologe Reihe primärer Alkohole gezeigt, ist bei anderen in ihrer Struktur ähnlichen Substanzen ebenfalls eine ähnliche Antwort zu erwarten. Die Induktion von Proteinen ist in Abhängigkeit der induzierten Proteine einerseits Marker für die aktive Auseinandersetzung mit der toxischen Substanz (katalytisch: Katalasen, CatA) und andererseits Marker für die passive Auseinandersetzung (stabilisierend: Chaperone) der Zelle mit den Schäden, die durch die Substanz hervorgerufen wurden. Die Entwicklung von Testsystemen für die Toxizität von Xenobiotika auf der Basis der Proteinsynthese bei

Mikroorganismen wurde bereits mehrfach vorgeschlagen (Ödberg-Ferragut et al. 1991, Blom et al., 1992, Uchiyama et al., 1999), aber wahrscheinlich wegen des hohen Aufwandes, besonders für die zweidimensionale Elektrophorese und die Auswertung der Daten, bisher kommerziell nicht umgesetzt.

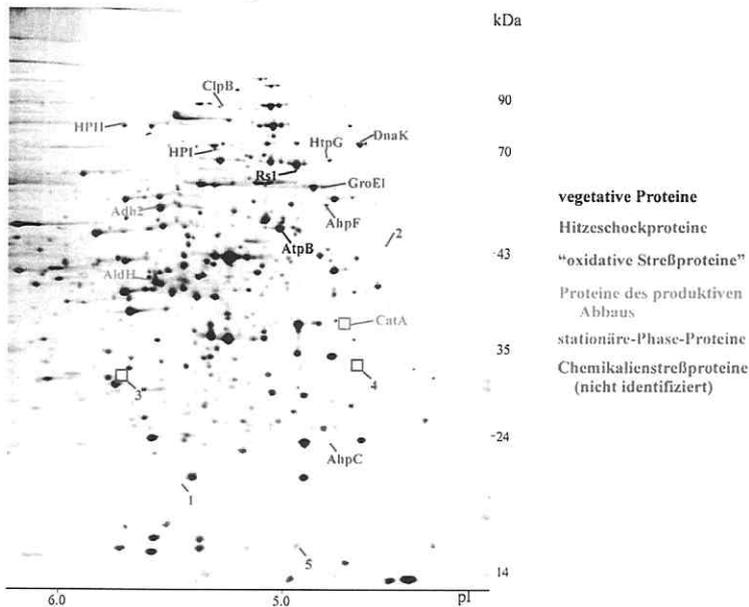


Abb. 65: Streßinduzierbare Proteine von *Acinetobacter calcoaceticus*

Um trotzdem die Regulation von Streßproteinen nach der Einwirkung von Chemikalien zu untersuchen, wurde deshalb die Transkription von durch Streß induzierbaren Gene direkt anhand der mRNA-Synthese oder indirekt mit Hilfe von Genfusionen von  $\sigma^{32}$  (Van Dyk et al., 1995) und oxyR (Belkin et al., 1996) abhängigen Promotoren mit den Genen von Markerenzymen gemessen. Da die Menge an mRNA (Anderson und Seilhamer, 1997) bzw. die Menge an synthetisierten Markerenzymen nicht immer mit der tatsächlichen Menge eines Streßproteins in einer Zelle korreliert, ist es erforderlich, die Menge des Proteins direkt zu bestimmen. Die immunologische Messung der Menge einzelner Proteine in Antwort auf Chemostreß bei Eukaryoten (Dunlap und Matsumura, 1997; Kammenga et al., 1998) ist eine Methode, die auch bei Mikroorganismen durchführbar ist. Erste Untersuchungen unter Nutzung der kommerziell verfügbaren Antikörper gegen GroEl und DnaK demonstrieren, daß die Entwicklung eines Testsystems auch bei einem schadstoffabbauenden Bakterium wie *Acinetobacter calcoaceticus* möglich ist. Die Empfindlichkeit konnte beispielhaft durch Ausnutzung des synergistischen Effektes von Ethanol auf die Induktion der Hitzeschockproteine durch Butanol gesteigert werden. Um das Spektrum der durch immunologische Methoden meßbaren Proteine über die Hitzeschockproteine GroEl und DnaK hinaus zu erweitern, wurde die Produktion von Antikörpern, gerichtet gegen die N-terminalen Proteinsequenzen der Proteine ClpB und AhpC, in Auftrag gegeben. Die beiden Proteine

wurden aus der großen Anzahl der nachgewiesenen Streßproteine ausgewählt, weil ihr niedriges Ausgangsniveau und die gemessenen hohen Verstärkungsfaktoren gute Voraussetzungen für eine hohe Sensitivität bei ihrer Nutzung als Biomarker sind. Der Nachweis eines Hitzeschockproteins wie ClpB und eines oxidativen Streßproteins wie AhpC sollte außerdem eine differenzierte Bewertung der Antwort ermöglichen. Leider zeigten nur die Antiseren, die gegen das N-terminale Peptid von AhpC gerichtet waren, eine Bindung, die spezifisch genug ist, um sie zum Aufbau des Tests zu nutzen. Die relative starke Bindung des Antikörpers unter Kontrollbedingungen in Dot-Blots oder in Westernblots von nach dem Molekulargewicht getrennten Proteinen, hervorgerufen durch eine Isoform des Enzyms, entsprach nicht den Erwartungen und ist gleichzeitig die Ursache für die geringe relative Erhöhung (etwa 2fach) nach starken oxidativen Streß mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da sich die Isoenzyme in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden, könnten die Antikörper aber durchaus zum Nachweis von Chemostreß durch Quantifizierung der einzelnen Isoformen nach einer isoelektrischen Fokussierung eingesetzt werden. Durch die Ausnutzung des synergistischer Effektes von Ethanol auf die Induktion der oxyR-abhängigen Streßantwort durch weitere Substanzen könnte wie in *Escherichia coli* (Belkin et al., 1996) eine Erhöhung der Sensitivität erreicht werden.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Antwort des schadstoffabbauenden Bakteriums *Acinetobacter calcoaceticus* auf die Gegenwart von Xenobiotika auf der Ebene der Proteinsynthese untersucht. Es sollten Mechanismen erkannt werden, die zur Resistenz gegenüber Xenobiotika beitragen. Dazu wurde der Einfluß von Modellsustanzen auf *Acinetobacter calcoaceticus* während des Wachstums auf dem Substrat Acetat ebenso untersucht wie Bedingungen, bei denen die Modellsustanzen gleichzeitig Wachstumssubstrat und in Abhängigkeit von ihren Konzentrationen auch toxische Substanzen waren.

Durch den Vergleich der Antworten auf die Einwirkung von Chemikalien mit den Antworten auf Bedingungen, die bei anderen Organismen zur Induktion bereits beschriebener Mechanismen der Antwort auf Streß führen, konnten die induzierten Proteine in folgende Gruppen geordnet werden:

- Die Einwirkung von Chemikalien auf *Acinetobacter calcoaceticus* verursachte die Induktion von Hitzeschockproteinen, unter ihnen die Hitzeschockproteine GroEl, DnaK, HtpG und ClpB. Die cytoplasmatische Membran wurde als Target des lipophilen Angriffes erkannt. Die Erhöhung ihrer Fluidität durch lipophile Substanzen oder durch Wärme könnte ein zusätzliches Signal für die Induktion von Hitzeschockproteinen neben der Akkumulation denaturierter Proteine sein. Die unterschiedliche Ausprägung der Hitzeschockantwort nach Einwirkung von Ethanol gegenüber der Einwirkung von Butanol oder Hexanol könnte auf eine unterschiedliche Einlagerung der Substanzen in der Membran hinweisen. Ausgehend von der Funktion der nachgewiesenen Hitzeschockproteine besteht ihr Beitrag zur Resistenz in der Renaturierung oder im proteolytischen Abbau geschädigter Proteine, die durch die Einwirkung von Chemikalien geschädigt wurden.
- Die Einwirkung von Chemikalien auf *Acinetobacter calcoaceticus* induzierte Proteine, die typischerweise durch oxidativen Streß induziert wurden. Unter ihnen sind die Katalase HPI und die Untereinheiten der Alkylhydroperoxidreductase AhpC und AhpF. Catechol verursachte im Gegensatz zu primären Alkoholen und Phenol, die die Antwort auf oxidativen Streß auf einem niedrigen Niveau induzierten, eine starke Antwort, was vermutlich durch seine höhere Reaktivität, der Fähigkeit zur Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen durch Redoxcycling, hervorgerufen wird. Die durch das ansteigende Niveau an reaktiven Sauerstoffverbindungen induzierten Proteine katalysieren unter anderem die Entgiftung dieser Verbindungen und tragen so zum Schutz der Zellbausteine wie Proteinen, Lipiden und DNA vor Oxidation bei.
- Während des Wachstums auf „Modellxenobiotika“ als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden Proteine induziert, die an der Oxidation dieser Substanzen beteiligt sind. Unter ihnen sind vermutlich die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase (Adh2), die NAD-

abhängige Aldehyddehydrogenase (DhaL) sowie die Catechol-1,2-dioxygenase (CatA). Der Anteil der Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase am Gesamtprotein blieb nach Kultivierung auf hohen Mengen der primären Alkohole unverändert. Die Erhöhung der Catechol-1,2-dioxygenase, eines Enzyms, das am Abbau von Phenol beteiligt ist, während der Kultivierung auf hohen Mengen von Phenol trägt wahrscheinlich zur Überwindung der Substratinhibierung bei.

- Die Einwirkung von Chemikalien auf *Acinetobacter calcoaceticus* führte abgesehen von einer Ausnahme nicht zur Induktion der Stationäre-Phase-Antwort, die anhand der Induktion der Stationären-Phase-abhängigen Katalase hätte verfolgt werden können. Dies deutet an, daß die Stationäre-Phase-Antwort, die nach Limitierung essentieller Nährstoffe bzw. der Wachstumsgeschwindigkeit zur Ausbildung einer generellen Resistenz führt, unter den untersuchten Bedingungen nicht oder nur unbedeutend zur Resistenz gegenüber Chemikalien beiträgt.
- Eine Vielzahl nicht näher charakterisierter Proteine als Antwort auf die Einwirkung von Chemikalien weist auf weitere Resistenzmechanismen hin. Hervorgehoben werden sollen an dieser Stelle drei Gruppen von Proteinen: generell nach Einwirkung von Chemikalien induzierte Proteine, nach Einwirkung der beiden längerkettigen Alkohole induzierte Proteine und nach Einwirkung der Aromaten Phenol und Catechol induzierte Proteine. Ihre Charakterisierung könnte zum tieferen Verständnis der Antwort von *Acinetobacter calcoaceticus* auf Chemikalien beitragen.

Die bei *Acinetobacter calcoaceticus* gewonnenen Erkenntnisse gewähren einen Einblick in die Mechanismen der Resistenz schadstoffabbauender Bakterien gegenüber Xenobiotika. Gleichzeitig bieten sie erste Lösungsansätze, wie die Stabilität der Organismen und damit auch die Geschwindigkeit der Entgiftung wie zum Beispiel durch gezielte Überexpression der entsprechenden Proteine erhöht werden kann.

Außerdem kann die Induktion von Proteinen als Antwort auf die Einwirkung von Chemikalien zur Beurteilung des physiologischen Zustandes von Bakterien nach Einwirkung von Chemikalien genutzt werden. Die von *Acinetobacter calcoaceticus* induzierten Proteine, die zu verschiedenen Mechanismen der Antwort gehören, können auch auf die Wirkmechanismen einer Substanz hinweisen. Die Nutzung immunologischer Methoden ermöglicht die Entwicklung von Testsystemen auf der Basis des Nachweises einzelner Streßproteine, bei denen der experimentelle Aufwand im Vergleich zur zweidimensionalen Elektrophorese reduziert werden kann. Die Reaktivität vieler Antikörper gegenüber den homologen Proteinen anderer Mikroorganismen ist eine gute Voraussetzung, um das Testsystem auch bei ihnen anzuwenden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alekshun, M. N., Levy, S. B.: Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997), 2067-2075.
- Anderson, L., Seilhamer, J.: A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18 (1997), 533-537.
- Asad, N. R., Asad, L. M. B. O., Silva, A. B., Felzenszwalb, I., Leitao, A. C.: Hydrogen peroxide induces protection against lethal effects of cumene hydroperoxide in *Escherichia coli* cells: an Ahp and OxyR independent system? *Mutat. Res.* 407 (1998), 253-259.
- Asperger, O., Kleber, H.-P.: Metabolism of alkanes by *Acinetobacter*. In: *The biology of Acinetobacter*. Towner, K. J., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C. A. (Hrsg). Plenum Press, New York (1991).
- Bayer, E. A., Ben-Hur, H., Wilchek, M.: Enzyme-based detection of glycoproteins on blot transfer using avidin-biotin technology. *Anal. Biochem.* 161(1987), 123-131.
- Beardmore-Gray, M., Anthony, C.: The absence of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983), 2979-2983.
- Belkin, S., Smulski, D. R., Vollmer, A. C., Van Dyk, T. K., LaRossa, R. A.: Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a katG::lux fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996), 2252-2256.
- Benndorf, D.: Proteinmuster zur Indikation des Resistenzverhaltens von Bakterien gegenüber Xenobiotika. Diplomarbeit: Universität Leipzig, Sektion Biowissenschaften (1996).
- Benndorf, D., Loffhagen, N., Babel, W.: Chemicals and heat generate different protein patterns in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Basic Microbiol.* 37 (1997), 167-174.
- Benndorf, D., Loffhagen, N., Babel, W.: Induction of heat shock proteins in response to primary alcohols in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Electrophoresis* 20 (1999), 781-789.
- Benov, L., Fridovich, I.: Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177 (1995), 3344-3346.
- Bernhardt, J., Völker, U., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M.: Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* – a two-dimensional electrophoresis study. *Microbiology* 143 (1997), 999-1017.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W.: Isoelectric focussing in immobilized pH gradients: principle methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6 (1982), 317-339.
- Blaszczak, A., Zylicz, M., Georgopoulos, C., Liberek, K.: Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^{32}$  factors assembled with RNA polymerase. *EMBO J.* 14 (1995), 5085-5093.

- Blom, A., Harder, W., Matin, A.: Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992), 331-334.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (1987), 93-99.
- Bochkareva, E. S., Solovieva, M., E., Girshovich, A. S.: targeting of GroEl to SecA on the cytoplasmatic membran of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 95 (1998), 478-483.
- Bogé, G., Roche, H.: Cytotoxicity of phenolic compounds on *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57 (1996), 171-178.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976), 248-254.
- Bryant, S. E., Schultz, T.W.: Toxicological assessment of biotransformation products of pentachlorophenol: *Tetrahymena* population growth impairment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26 (1994), 299-303.
- Bukau, B., Walker, G. C.: Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli* dnaK gene indicates roles for heat shock protein in normal metabolism. *J. Bacteriol.* 171 (1989), 2337-2346.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Vinella, D.: The stringent response. In: *Escherichia coli* und *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. et al. (Hrsg). ASM Press, Washington, D.C. (1996), 1458-1496.
- Cha, H. J., Srivastava, R., Vakharia, V. N., Rao, G., Bentley, W. E.: Green fluorescent protein as a noninvasive stressprobe in resting *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999), 409-414.
- Clare, D. A., Duong, M. N., Darr, D., Archibald, F., Fridovich, I.: Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* 140 (1984), 532-537.
- Cork, D. J., Krueger, J. P.: Microbial transformations of herbicides and pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* 36 (1991), 1-51.
- Crouy-Chanel, A., Kohiyama, M., Richarme, G.: A novel function of *Escherichia coli* chaperone DnaJ. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 22669-22672.
- Curran, B. P. G., Khalawan, S. A.: Alcohols lower the treshold temperature for the maximal activation of a heat shock expression vector in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 140 (1994), 2225-2228.
- Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P. H., Schiestl, R. H.: Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 5116-5121.
- De Smet, M. J., Kingma, J., Witholt, B.: The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 506 (1978), 64-80.

- Demple, B.: Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon – a review. *Gene* 179 (1996), 53-57.
- Ding, H., Hidalgo, E., Demple, B.: The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 33173-33175.
- Dukan, S., Turlin, E., Biville, F., Bolbach, G., Touati, D., Tabet, J. C., Blais, J. C.: Coupling 2D SDS-PAGE with CNBr cleavage and MALDI-TOFMS: a strategy applied to the identification of proteins induced by a hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*. *Anal. Chem.* 70 (1998), 4433-4440.
- Dunlap, D. Y., Matsumura, F.: Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37 (1997), 238-244.
- Eckerskorn, C., Jungblut, P., Mewes, W., Klose, J., Lottspeich, F.: Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. *Electrophoresis* 9 (1988), 830-838.
- Engelmann, S., Hecker, M.: Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* sigB mutants and the role of katA und katE. *FEMS Microbiol. Lett.* 145 (1996), 63-69.
- Eremeeva, M. E., Ching, W.-M., Wu, Y., Silverman, D. J., Dasch, G. A.: Western blotting analysis of heat shock proteins of *Rickettsiales* and other eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 167 (1998), 229-237.
- Ferrante, A. A., Augliera, J., Lewis, K., Klivanov, A. M.: Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: the unexpected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7617-7621.
- Fewson, C. A.: Metabolism of aromatic compounds by *Acinetobacter*. In: *The biology of Acinetobacter*. Towner, K. J., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C. A. (Hrsg). Plenum Press, New York (1991).
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.-C., Benachour, A., Boutibonnes, P., Auffray, Y.: Relationship between stress response towards bile salts acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138 (1996), 49-54.
- Francis, R. T., Becker, R. R.: Specific Indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double staining process. *Anal. Biochem.* 136 (1983), 509-514.
- Gage, D. J., Neidhardt, F.C.: Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4-dinitrophenol. *J. Bacteriol.* 175 (1993), 7105-7108.
- Gaudu, P., Moon, N., Weiss, B.: Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 5082-5086.
- Geißdörfer, W., Kok, R. G., Ratajczak, A., Hellingwerf, K. J., Hillen, W.: The genes rubA and rubB for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with estBm encoding an esterase, and oxyR. *J. Bacteriol.* 181 (1999), 4292-4298.

- Geißdörfer, W., Ratajczak, A., Hillen, W.: Nucleotide sequence of a putative periplasmic Mn superoxide dismutase from *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *Gene* 186 (1997), 305-308.
- Givskov, M., Eberl, L., Molin, S.: Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Two dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress-induced proteins. *J. Bacteriol.* 176 (1994), 4816-4824.
- Gonzalez-Flecha, B., Demple, B.: Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration of aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179 (1997), 382-388.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9 (1988), 531-546.
- Gottesmann, S., Wickner, S., Jubete, Y., Singh, S. K., Kessel, M., Maurizi, M.: Selective, energy-dependent proteolysis in *Escherichia coli*. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LX. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995), 533-548.
- Gruer, M. J., Guest, J. R.: Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* 140 (1994), 2531-2541.
- Hecker, M., Völker, U.: Non-specific general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the B regulon. *Mol. Microbiol.* 29 (1998), 1129-1136.
- Heipiper, H.-J., Diefenbach, R., Keweloh, H.: Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992), 1847-1852.
- Heitzer, A., Mason, C. A., Hamer, G.: Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 22 (1992): 153-169.
- Hengge-Aronis, R.: Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: *Escherichia coli* und *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. et al. (Hrsg). ASM Press, Washington, D.C. (1996), 1497-1512.
- Herendeen, S. L., VanBogelen, R. A., Neidhardt, F.C.: Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139 (1979), 185-194.
- Hermens, J., Busser, F., Leeuwangh, P., Musch, A.: Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum*: the microtox test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9 (1985), 17-25.
- Hightower, L. E., Ryan, J. A.: Are stress proteins part of cell's solution to toxicity or are they part of the problem. *Hepatology* 25 (1997), 1279-1281.
- Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Török, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovacs, E., Nádasi, L., Benkő, S., Joó, F., Vigh, L.: Membrane physical state controls signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803: Identification of hsp17 as a „fluidity gene“. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 3515-3518.

- Ingram, L. O.: Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* 125 (1976), 670-678.
- Ino, T., Nishimura, Y.: Taxonomic studies of *Acinetobacter* species based on outer membrane protein patterns. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35 (1989), 213-224.
- Jin, Y., Cerletti, N.: Western blotting of transforming growth factor  $\beta$ 2. Optimization of the electrophoretic transfer. *Appl. Theor. Electrophoresis* 3 (1992), 85-90.
- Jobin, M.-L., Delmas, F., Garmyn, D., Diviès, C., Guzzo, J.: Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997), 609-614.
- Kammenga, J. E., Arts, M. S. J., Oude-Breuil, W. J. M.: HSP60 as potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34 (1998), 253-258.
- Kappus, H., Sies, H.: Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 37 (1981), 1233-1358.
- Katsuwon, J., Anderson, A. J.: Response of plant-colonizing *Pseudomonads* to hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989), 2985-2989.
- Kleber, H.-P., Schöpp, W., Aurich, H.: Verwertung von n-Alkanen durch einen Stamm von *Acinetobacter calcoaceticus*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 13 (1973), 445-447.
- Klose, J.: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues – novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26 (1975), 231-243.
- Knackmus, H.-J.: Abbau von Natur- und Fremdstoffen. In: *Umweltbiotechnologie*. Ottow, J. C. G., Bindlingmaier, W (Hrsg.). G. Fischer Stuttgart Jena Lübeck Ulm (1997), 39-80.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), 680-685.
- Léonard, D., Lindley, N. D.: Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. *Enzyme Microb. Tech.* 25 (1999), 271-277.
- Liochev, S., Fridovich, I.: Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 5892-5896.
- Loewen, P.C., Switalla, J.: Multiple Catalases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169 (1987), 3601-3607.
- Loffhagen, N., Härtig, C., Babel, W.: Fatty acid pattern of *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V indicate sensitivity against xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 (1995), 526-531.
- Loffhagen, N., Härtig, C., Babel, W.: The toxicity of substituted phenolic compounds to a detoxifying and an acetic acid bacterium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36 (1997), 269-274.

- Loprasert, S., Atichartpongkum, S., Whangsuk, W., Mongkulsuk, S.: Isolation and analysis of the *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase gene and the peroxide sensor regulator genes *ahpC* and *ahpF-oxyR-orfX*. *J. Bacteriol.* 179 (1997), 3944-3949.
- Lupi, C. G., Colangelo, T., Mason, C. A.: Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2442 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995), 2863-2872.
- Mason, C. A., Dünner, J., Indra, P., Colangelo, T.: Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999), 3433-3440.
- McCarthy, D. L., Claude, A. A., Copley, S. D.: In vivo levels of chlorinated hydroquinones in a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997), 1883-1888.
- McCarty, J. S., Rüdiger, S., Schönfeld, H.-J., Schneider-Mergener, J., Nakahigashi, K., Yura, T., Bukau, B.: Regulatory region C of the *E. coli* heat shock transcription factor,  $\sigma^{32}$ , constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J. Mol. Biol.* 256 (1996), 829-837.
- Mejia, R., Gomez-Eichelmann, M. C., Fernandez, M. S.: Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (1995), 195-200.
- Müller, R. H., Babel, W.: Glucose as an energy donor in acetate growing *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Microbiol.* 144 (1986), 62-66.
- Müller, R. H., Babel, W.: Growth rate-dependent expression of phenol-assimilation pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 – the influence of formate as an auxiliary energy source on phenol conversion characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 (1996), 156-162.
- Müller, R. H., Simon, D., Große, H. J., Babel, W.: Substrate inhibition under stationary growth conditions – nutristat experiments with *Ralstonia eutropha* JMP134 during growth on phenol and 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997), 648-655.
- Nakahigashi, K., Kanemori, M., Morita, M., Yanagi, H., Yura, T.: Conserved function and regulation of  $\sigma^{32}$  homologues in gram-negative bacteria. *J. Biosci.* 23 (1998), 407-414.
- Nakahigashi, K., Yanagi, H., Yura, T.: Isolation and sequence analysis of *rpoH* genes encoding  $\sigma^{32}$  homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. *Nucleic Acids Res.* 23 (1995), 4383-4390.
- Neuhaus-Steinmetz, U., Xu, C., Fracella, F., Oberheitmann, B., Richter-Landsberg, C., Rensing, L.: Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: structure-activity relationship of different alcohols. *Mol. Pharmacol.* 45 (1993), 36-41.
- O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 (1975), 4007-4021.
- Ödberg-Ferragut, C., Espigares, M., Dive, D.: Stress protein synthesis, a potential toxicity marker in *Escherichia coli*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21 (1991), 275-282.

- Paek, K.-H., Walker, G. C.: danK null mutants are inviable at high temperature. *J. Bacteriol.* 169 (1987), 283-290.
- Paller, G., Hommel, R. K., Kleber, H.-P.: Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *J. Basic. Microbiol.* 35 (1995), 325-335.
- Panoff, J.-M., Corroler, D., Thammavongs, B., Boutibonnes, P.: Differentiation between cold shock and cold acclimatisation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *J. Bacteriol.* 179 (1997), 4451-4454.
- Phan-Thanh, L., Gormon, T.: Stress proteins in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis* 18 (1997), 1464-1471.
- Piper, P. W.: The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134 (1995), 121-127.
- Polissi, A., Goffin, L., Georgopoulos, C.: The *Escherichia coli* heat response and bacteriophage  $\lambda$  development. *FEMS Microbiol. Rev.* 17 (1995), 159-169.
- Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R. C., Wyckoff III, J. H.: Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions. *Infect. Immun.* 64 (1996), 5274-5283.
- Ritossa, F.: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18 (1962), 571-573.
- Rosner, J. L., Storz, G.: Regulation of bacterial responses to oxidative stress. *Curr. Top. Cell. Regul.* 35 (1997), 163-175.
- Sanchez, J.-C., Ravier, F., Pasquali, C., Frutiger, S., Paquet, N., Bjellqvist, B., Hochstrasser, D. F., Hughes, G. C.: Improving detection of proteins after transfer to polyvinylidene difluoride membranes. *Electrophoresis* 13 (1992), 715-717.
- Santoni, V., Rabilloud, T., Doumas, P., Rouquie, D., Mansion, M., Kieffer, S., Garin, J., Rossignol, M.: Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* 20 (705-711).
- Schumann, W.: Funktion und Regulation der Hitzeschock-Proteine bei Pro- und Eukaryoten. *Bioscope* 2 (1994), 20-24.
- Seeger, M., Osorio, G., Jerez, C. A.: Phosphorylation of GroEl, DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 138 (1996), 129-134.
- Selassie, C. D., DeSoyza, T. V., Rosario, M., Gao, H., Hansch, C.: Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process? *Chem.-Biol. Interact.* 113 (1998), 175-190.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., Poolman, B.: Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 8022-8088.
- Singer, M. E., Finnerty, W. R.: Alcohol dehydrogenases in *Acinetobacter* sp. strain HO1-N: role in hexadecane and hexadecanol metabolism. *J. Bacteriol.* 164 (1985), 1017-1024.

- Strotmann, U. J., Butz, B., Bias, W.-R.: The dehydrogenase assay with resazurin: practical performance as a monitoring system and pH-dependent toxicity of phenolic compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25 (1993), 79-89.
- Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J.: Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 3027-3032.
- Tauchert, H., Grunow, M., Harnisch, H., Aurich, H.: Reinigung und einige Eigenschaften der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Alkoholdehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Biol. Med. Ger.* 35 (1976), 1267-1272.
- Tauchert, H., Roy, M., Schöpp, W., Aurich, H.: Pyridine-nucleotidunabhängige Oxidation von längerkettigen aliphatischen Alkoholen durch ein Enzym aus *Acinetobacter calcoaceticus*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 15 (1975), 457-460.
- Thomas, J. G., Ayling, A., Baneyx, F.: Molecular chaperones, folding catalysts and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66 (1997), 197-237.
- Tissières, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. M.: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84 (1974), 389-398.
- Tokunaga, M., Matsuoka, K., Tokunaga, H.: Identification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequences of DnaK and GroEL Homologues in moderate eubacterial halophiles. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (1997), 1388-1390.
- Towner, K. J., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C. A.: *Acinetobacter*: portrait of a genus. In: The biology of *Acinetobacter*. Towner, K. J., Bergogne-Bérézin, E., Fewson, C. A. (Hrsg). Plenum Press, New York (1991).
- Uchiyama, H., Shinohara, Y., Tomioka, N., Kusakabe, I.: Induction and enhancement of stress proteins in a trichloroethylene-degrading methanotrophic bacterium, *Methylocystis* sp. M. *FEMS Microbiol. Lett.* 170 (1999), 125-130.
- Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S., La Rossa, R. A.: Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994), 1414-1420.
- Van Dyk, T. K., Reed, T. R., Vollmer, A. C., LaRossa, R. A.: Synergistic induction of the heat shock response in *Escherichia coli* by simultaneous treatment with chemical inducers. *J. Bacteriol.* 177 (1995), 6001-6004.
- VanBogelen, R. A., Kelley, P. M., Neidhardt, F.C.: Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169 (1987), 26-32.
- Vercellone-Smith, P., Herson, D. S.: Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the TOL plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997), 1925-1932.
- Vigh, L., Maresca, B., Harwood, J. L.: Does the membrane physical state control the expression of heat shock and other genes? *TIBS* 23 (1998) 369-374.

- Visick, J. E., Clarke, S.: Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* 16 (1995), 835-845.
- Walker, G. C.: The SOS response of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* und *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. et al. (Hrsg). ASM Press, Washington, D.C. (1996), 1400-1416.
- Weiss, B.: Regulation of endonuclease IV as part of an oxidative stress response in *Escherichia coli*. In: DNA damage and repair, Vol. 1: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes. Nickoloff, J. A., Hoekstra, M. F. (Hrsg). Humana press Inc., Totowa (1998), 85-96.
- White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B., Levy, S. B.: Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179 (1997), 6122-6126.
- Yura, T., Nakahigashi, K.: Regulation of the heat shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999), 153-158.
- Zheng, M., Aslund, F., Storz, G.: Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279 (1998), 1718-1721.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Dirk Benndorf  
Wohnort: Steinstr. 77, 04275 Leipzig  
Geburtsdatum, -ort: 14.03.1972, Leipzig  
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn  
Staatsangehörigkeit: BRD

## Schulbildung:

1978 - 1986 Polytechnische Oberschule  
1986 - 1990 Erweiterte Oberschule mit Abschluß des Abiturs  
1988 - 1989 Abitur in Biologie an der Volkshochschule

## Wehrersatzdienst:

1990-1991 Stationshelfer im St. Elisabeth-Krankenhaus, Leipzig

## Studium:

1991-1996 Studium der Fachrichtung Biochemie an der Universität Leipzig.  
1995-1996 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema „Proteinmuster zur Indikation des Resistenzverhaltens von Bakterien gegenüber Xenobiotika“ am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.  
1996 Abschluß als Diplom-Biochemiker

## Promotion

05/1996-12/1999 Doktorand in der Sektion Umweltmikrobiologie, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH. Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit zum Thema „Molekulare Mechanismen der Resistenz von Bakterien gegenüber Xenobiotika“ unter Anleitung von Prof. Dr. habil. W. Babel.

## Berufstätigkeit:

05/1996-12/1999 wissenschaftliche Hilfskraft in der Sektion Umweltmikrobiologie, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit „Molekulare Mechanismen der Resistenz von Bakterien gegenüber Xenobiotika“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus den Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Leipzig, den 17.12.1999

  
Dirk Benndorf

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. habil. W. Babel (UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie) danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Begleitung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. N. Loffhagen danke ich für die stets gewährte Unterstützung und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Besonders möchte ich Frau K. Lange und Frau C. Schumann für das gute Arbeitsklima in den Laboratorien und die praktischen Ratschläge bei der alltäglichen Arbeit im Labor danken.

Herrn Dr. C. Härtig und Frau A. Wichmann danke ich für die Hilfe bei der kontinuierlichen Kultivierung der Mikroorganismen im Fermenter. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Dr. R. H. Müller und Herrn H. J. Große für den Rat und die Unterstützung zur Vorbereitung des Nutistatexperimentes bedanken.

Herrn Dr. Bär (Institut für Biochemie, Universitätsklinikum, Universität Leipzig) bzw. Dr. A. Dubin und Dr. P. Mak (Biocentrum Krakow, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Polen) möchte ich ganz herzlich für die N-terminale Sequenzierung der Proteine danken.

Außerdem möchte ich auch Frau M. Dierenfeld (pepScan Immunoanalytik) für die Synthese der Peptide und die anschließende Immunisierung der Kaninchen danken.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern der Sektion Umweltmikrobiologie des Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
Sektion Umweltmikrobiologie  
Permoserstraße 15  
D-04318 Leipzig  
Telefon 0341/235-2225  
Telefax 0341/235-2247