

**Fettsäure-unabhängige Anpassung  
bakterieller Membranen  
an niedrige Temperaturen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Waldemar Seel**

aus

Duschanbe, Tadschikistan

Bonn 2019

---

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. André Lipski

2. Gutachter: Prof. Dr. Erwin Galinski

Tag der Promotion: 28.02.2020

Erscheinungsjahr: 2020

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Seel, W., Flegler, A., Zunabovic-Pichler, M., Lipski, A. (2018).** Increased isoprenoid quinone concentration modulates membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* at low growth temperatures. *Journal of bacteriology* 200:e00148-18.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Überblick der allgemeinen Kälteantwort in Bakterien.....	2
1.2 Kälteanpassung der bakteriellen Zellmembran .....	4
1.3 Weitere lipophile Modifikatoren der Zellmembraneigenschaften .....	10
1.3.1 Isoprenoide Chinone .....	11
1.3.2 Carotinoide .....	13
1.4 Methoden zur Quantifizierung der Kälteanpassung der Zellmembran .....	15
1.5 Überblick über die verwendeten Modellorganismen .....	18
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	21
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Mikrobiologische Methoden .....	22
2.1.1 Organismen, Medien und Kulturbedingungen.....	22
2.1.1.1 Verwendete Organismen .....	22
2.1.1.2 Medien und Anzuchtbedingungen .....	23
2.1.2 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern.....	26
2.1.3 Gefrier-Auftau-Stresstest .....	26
2.1.4 Stammlagerung.....	27
2.2 Biochemische Methoden .....	27
2.2.1 Fettsäureanalyse .....	27
2.2.2 Isoprenoid-Chinonanalyse.....	30
2.2.3 Carotinoidanalyse.....	31
2.3 Sonden-abhängige Fluoreszenzmessungen .....	37
2.3.1 Generalisierte Polarisation .....	39
2.3.2 Anisotropie .....	40
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	42
2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	42
2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
2.4.2.1 Multiplex-PCR zur Bestimmung von <i>L. monocytogenes</i> Serovargruppen ( DOUMITH <i>et al.</i> , 2004a) .....	43
2.4.3 Agarosegelelektrophorese .....	44
2.4.4 Differentielle Transkriptomanalyse.....	45
2.4.4.1 DNA- und RNA-Extraktion .....	45

2.4.4.2	Differentielle Genexpressionsanalyse .....	46
2.4.5	Average Nucleotide Identity (ANI) Analyse .....	48
2.5	Statistische Auswertung .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation in <i>Listeria monocytogenes</i> bei niedrigen Temperaturen .....	49
3.1.1	Wachstumsverlauf der 10 untersuchten <i>L. monocytogenes</i> Stämme .....	49
3.1.2	Bestimmung der <i>L. monocytogenes</i> Serovargruppen .....	52
3.1.3	Fettsäureanalyse und das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung in <i>L. monocytogenes</i> .....	55
3.1.4	Quantitative Bestimmung des isoprenoiden Chinongehaltes in <i>L. monocytogenes</i> .....	60
3.1.5	Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in <i>L. monocytogenes</i> .....	63
3.1.6	Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen .....	66
3.1.7	Differentielle Transkriptomanalyse der Kälteanpassung von <i>L. monocytogenes</i> FFH .....	67
3.1.8	Modifikation des Menachinongehaltes in den <i>L. monocytogenes</i> Stämmen DSM 20600 <sup>T</sup> und FFH .....	70
3.2	Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation in <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> bei niedrigen Temperaturen .....	73
3.2.1	Wachstumsverlauf der beiden untersuchten <i>P. glucanolyticus</i> Stämme .....	74
3.2.2	Fettsäureanalyse und das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung in <i>P. glucanolyticus</i> .....	75
3.2.3	Quantitative Bestimmung des isoprenoiden Chinongehaltes in <i>P. glucanolyticus</i> .....	78
3.2.4	Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in <i>P. glucanolyticus</i> .....	79
3.2.5	Differentielle Transkriptomanalyse der Kälteanpassung von <i>P. glucanolyticus</i> J12 .....	83
3.2.6	Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen von <i>P. glucanolyticus</i> .....	86
3.2.7	Supplementation von <i>P. glucanolyticus</i> mit Vitamin K <sub>1</sub> .....	87
3.3	Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation durch erhöhten Carotinoidgehalt in <i>Staphylococcus xylosus</i> bei niedrigen Temperaturen .....	88
3.3.1	Wachstumsverlauf der beiden untersuchten <i>S. xylosus</i> Stämme bei 30 °C und 10 °C .....	89
3.3.2	Fettsäureanalyse und das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation in <i>S. xylosus</i> .....	90
3.3.3	Analyse des isoprenoiden Chinongehaltes in <i>S. xylosus</i> .....	93
3.3.4	Carotinoidanalyse von <i>S. xylosus</i> zur Bestimmung des potentiellen Fettsäure-unabhängigen Kälteanpassungsmechanismus .....	94

3.3.5	Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in <i>S. xylosus</i> .....	97
3.3.6	Differentielle Transkriptomanalyse zur Kälteanpassung von <i>S. xylosus</i> J70... ..	99
3.3.7	Verifikation der Carotinoid-abhängigen Kälteadaptation der Zellmembran .	102
3.3.8	Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen als Maß der Kälteanpassung mittels eines Gefrier-Auftau-Stresstests .....	103
3.4	Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation durch erhöhten Carotinoidgehalt in <i>Micrococcus luteus</i> bei niedrigen Temperaturen .....	105
3.4.1	Wachstumsverlauf der beiden untersuchten <i>M. luteus</i> Stämme bei 30 °C und 10 °C .....	105
3.4.2	Fettsäureanalyse 30 °C und 10 °C als Maß zur Fettsäure-abhängigen Membrananpassung in den beiden <i>M. luteus</i> Stämmen.....	107
3.4.3	Analyse des isoprenoiden Chinongehaltes in <i>M. luteus</i> .....	109
3.4.4	Carotinoidanalyse von <i>M. luteus</i> zur Bestimmung des potentiellen Fettsäure-unabhängigen Kälteanpassungsmechanismus .....	112
3.4.5	Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in <i>M. luteus</i> .....	114
3.4.6	Differentielle Transkriptomanalyse zur Kälteanpassung von <i>M. luteus</i> J3... ..	117
3.4.7	Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen als Maß der Kälteanpassung mittels eines Gefrier-Auftau-Stresstests .....	120
3.5	ANI Analyse.....	121
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>123</b>
4.1	Auswirkung und Funktionsweise von isoprenoiden Chinonen als Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran.....	124
4.1.1	Wachstumsverhalten der untersuchten <i>L. monocytogenes</i> und <i>P. glucanolyticus</i> Stämme .....	125
4.1.2	Serovar-Bestimmung der <i>L. monocytogenes</i> Stämme.....	126
4.1.3	Stressresistenz gegenüber multiplen Gefrier-Auftau-Schritten.....	128
4.1.4	Unterschiede in der Anpassung der Fettsäureprofile an niedrige Temperaturen.....	130
4.1.5	Anpassung des Menachinongehaltes und der -zusammensetzung bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu mesophilen Bedingungen .....	134
4.1.6	Auswirkung der unterschiedlichen Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation auf die biophysikalischen Parameter der Zellmembran.....	138
4.1.7	Auswertung der differentiellen Transkriptomanalyse.....	142
4.1.8	Verifikation der Menachinon-induzierten Verbesserung der Membranfluidität mittels Supplementationstests.....	146
4.2	Auswirkung und Funktionsweise von Carotinoiden als Fettsäure- unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran .....	149
4.2.1	Wachstumsverhalten der untersuchten <i>S. xylosus</i> und <i>M. luteus</i> Stämme .....	150
4.2.2	Stressresistenz gegenüber multiplen Gefrier-Auftau-Schritten.....	151

---

4.2.3	Unterschiede in der Anpassung der Fettsäureprofile an niedrige Temperaturen .....	153
4.2.4	Anpassung des Menachinongehaltes und der -zusammensetzung bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu mesophilen Bedingungen .....	156
4.2.5	Anpassung des Carotinoidgehaltes und dessen Zusammensetzung bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu mesophilen Bedingungen .....	158
4.2.6	Auswirkung der unterschiedlichen Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation auf die bio-physikalischen Parameter der Zellmembran .....	161
4.2.7	Auswertung der differentiellen Transkriptomanalyse .....	165
4.2.8	Verifikation der Carotinoid-induzierten Verbesserung der Membranfluidität mittels Supplementationstests.....	169
4.3	Gegenüberstellung und Zusammenfassung der beiden untersuchten lipophilen Stoffgruppen als Fettsäure-unabhängige Modifikatoren der Zellmembran .....	170
4.3.1	Isoprenoide Chinone .....	171
4.3.2	Carotinoide .....	173
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>177</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>179</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>203</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>207</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>209</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APCI	Atmosphärische chemische Ionisation
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Csp	Kälteschockprotein (engl. <i>cold shock protein</i> )
DHNA	1,4-Dihydroxy-2-naphthoat
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESTD	externer Standard
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i> (und andere)
GP	Generalisierte Polarisierung
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTA	Hefeextrakt-supplementiertes TSA
HTB	Hefeextrakt-supplementiertes TSB
HSP	Hitzeschutzprotein (engl. <i>heat shock protein</i> )
ISTD	interner Standard
kb	Kilo-Basenpaare
KbE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilo-Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes



---

l	Liter
Mb	Mega-Basenpaare
MeOH	Methanol
min	Minute
MTBE	Methyl-tert-Butylether
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD <sub>625nm</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 625 nm
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch <i>phosphate-buffered saline</i> )
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Retentionszeit
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TMA-DPH	1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien p-Toluolsulfonat
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
U	Unit
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Zng	Zellnaßgewicht
Ztg	Zelltrockengewicht



## 1 Einleitung

Die meisten terrestrischen und aquatischen Habitats auf der Erde stellen einen Lebensraum dar, der periodisch oder permanent von niedrigen Temperaturen geprägt ist. Dabei gehen Schätzungen davon aus, dass ungefähr 80 % der Biosphäre eine Umgebungstemperatur von 5 °C und weniger aufweisen. Den größten Anteil machen hierbei Ozeane, Polarregionen und kontinentale Gebirgsregionen aus. Zu diesen natürlichen Habitats kommen in einem geringeren Ausmaß von Menschen geschaffene Lebensräume in gekühlten Räumen und Gerätschaften (Kühl- und Gefrierschränke) hinzu (RODRIGUES & TIEDJE, 2008; MARGESIN & MITEVA, 2011). Damit zählt die Kälteanpassung von Mikroorganismen zu den wichtigsten Adaptationsmechanismen an „extreme“ Umweltbedingungen und gewährleistet somit das Wachstum im Großteil der Habitats. Mikroorganismen die in kalten Umgebungen wachsen, werden weiterhin anhand dem Grad ihrer Kälteanpassung unterteilt. Psychrophile Organismen besitzen eine optimale Wachstumstemperatur von  $\leq 15$  °C und zeigen kein Wachstum über 20 °C, wohingegen psychrotolerante Mikroorganismen auch bei Temperaturen um 0 °C überleben können, aber ein Optimum zwischen 20 bis 25 °C besitzen (MORITA, 1975; HELMKE & WEYLAND, 2004). Es gibt zwar keine verbindliche untere Temperaturgrenze für Psychrophile, aber aktive Zellprozesse von Mikroorganismen wurde bereits für -18 °C demonstriert und es wird angenommen, dass die untere Grenze bei -20 °C erreicht sein könnte (MARGESIN & MITEVA, 2011; CLARKE *et al.*, 2013; MERINO *et al.*, 2019). Folglich dominieren psychrophile Organismen den Teil des marinen Ökosystems, der durchgehend von Umgebungstemperaturen von unter 5 °C gekennzeichnet ist. Psychrotrophe oder Kälte-tolerante Mesophile dominieren die terrestrischen Biosphären, die von einem stetigen Wandel der Umgebungstemperaturen geprägt sind (BÖLTER, 2004; HELMKE & WEYLAND, 2004).

Aufgrund der schwankenden Umgebungstemperaturen, denen Lebensmittel gewöhnlich ausgesetzt sind, handelt es sich bei den meisten Lebensmittel-relevanten Mikroorganismen, die in der Regel auch bei 30 °C und höher wachsen können, in der Tat um Kälte-resistente Mesophile (JAY *et al.*, 2005). Dieser Begriff prägt in dieser Arbeit Organismen, die ihrer optimalen Wachstumstemperatur nach als Mesophile eingeordnet werden. Deren Stoffwechsel aber eine gewisse Resistenz gegenüber kalten Temperaturen aufweist, sodass Wachstum bei Temperaturen zwischen 4 °C und 10 °C innerhalb einer Woche sichtbar ist.

Neben der Ökologie sind Kälte-angepasste Mikroorganismen auch von großer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie und der damit einhergehenden Lebensmittelsicherheit. Grundsätzlich sind Lebensmittel aufgrund ihres hohen Nährstoff- und Wassergehalts ein ideales Nährmedium für die verschiedensten Mikroorganismen. Durch die wachsende industrialisierte Produktion von Lebensmitteln, speziell der Zunahme an gekühlten und gefrorenen Lebensmitteln, rücken Kälte-tolerante Bakterien verstärkt in den Fokus der Öffentlichkeit (SCANNEL, 2005). Im Lebensmittelbereich stellen Kälte-tolerante mesophile Bakterien Risiken in Form von Pathogenen, Verderbniserregern oder Toxinbildnern dar. Beispielhaft zu nennen, wären *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp. und *Micrococcus* spp. (RUSSELL, 2002; SCHERER & NEUHAUS, 2006; LAKSANALASMAI *et al.*, 2011). Diese Spezies sind nicht in der Lage bei Temperaturen unter 0 °C zu wachsen und unterscheiden sich hiermit von psychrophilen Mikroorganismen, für die der Lebensmittelverderb bereits bei einer Lagerung von -8 °C bis sogar -18 °C festgestellt werden konnte (COLLINS & BUICK, 1989; GEIGES, 1996). Aber sie zeichnen sich durch ihren besonders breiten Temperaturwachstumsbereich aus, der häufig eine Spanne von 40 °C oder 50 °C umfassen kann. Im Vergleich dazu besitzen psychrophile Spezies einen deutlich schmaleren Bereich (GOUNOT & RUSSEL, 1999). Die größte Relevanz für Lebensmittel besteht demnach bei 4 bis 6 °C (Kühlschränke) und 10 bis 12 °C (offene Kühlvitrienen). In diesem Temperaturfenster von 4 bis 12 °C sind die Psychrotoleranten und Kälte-toleranten Mesophile in der Lage sich bei ausreichend großen Wachstumsraten zu vermehren. Wird dabei die Kühlkette unterbrochen, steigen Wachstumsraten und das Risikopotential exponentiell an. Das Vorhandensein der genannten Spezies in Lebensmitteln ist eine häufige Ursache für Verderb und Lebensmittelvergiftung (HÉBRAUD & POTIER, 1999). Diese werden in regelmäßigen Abständen in ausgelieferten Lebensmitteln vorgefunden (SCHARFF, 2012).

### 1.1 Überblick der allgemeinen Kälteantwort in Bakterien

Die Temperatur stellt einen Umweltfaktor dar, der sich auf die meisten Zellbestandteile und physiochemischen Zellprozesse auswirkt (FARRELL & ROSE, 1967; SUUTARI & LAAKSO, 1994; BEALES, 2004). Somit ist das Wachstum bei niedrigen Temperaturen eine Herausforderung die auf vielen Ebenen gemeistert werden muss (SCHERER & NEUHAUS, 2006). Eine Reduktion der Temperatur wirkt sich negativ auf die Enzymkinetiken, Nährstoffaufnahme über die Membran,

Makromolekülsynthese und -interaktion, sowie die Membranfluidität und -ordnung aus. Verschiedene Faktoren können zur Eiskristallbildung führen und somit irreversible Zellschäden verursachen. (RATKOWSKY *et al.*, 1982; NEDWELL, 1999, FELLER & GERDAY, 2003; BEALES, 2004; JAY *et al.*, 2005; SCHERER & NEUHAUS, 2006). Für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen haben Mikroorganismen entsprechende Anpassungsmechanismen entwickelt, um Zellfunktionen und die Interaktion der Makromoleküle sowie die Kompensation von damit verbundenen Stressfaktoren sicherzustellen (HÉBRAUD & POTIER, 1999; SAUNDERS *et al.*, 2003; SCHERER & NEUHAUS, 2006; DE MAAYER *et al.*, 2014). In ihrer Gesamtheit stellt die Kälteanpassung ein äußerst komplexes System dar, wobei einzelne Anpassungsmechanismen auch separat betrachtet werden können.

Die Kälteanpassung beginnt mit der Kälte-Detektion und Signalweiterleitung. Die Detektion kann dabei anhand verschiedener Zellbestandteile erfolgen. In der Literatur beschrieben sind zum Beispiel die Detektion über die Membran, wobei die Fluidität von der Zelle als Messgröße verwendet wird (AGUILAR *et al.*, 2001; LINDSTRÖM *et al.*, 2012; MASCHER *et al.*, 2014). Oder die Wahrnehmung der Temperaturänderung anhand der Konformationsänderung (Supercoiling) der DNA, womit die Expression spezifischer Gene gesteuert wird (HURME & RHEN, 1998; ERIKSSON *et al.*, 2002; GIANGROSSI *et al.*, 2002; PRAKASH *et al.*, 2009). Ebenfalls durch Kälte-induzierte Konformationsänderung werden Proteine, Ribosomen und die mRNA als Sensoren gebraucht (BRANDI *et al.*, 1999; YAMANAKA & INOUE, 2001; ERIKSSON *et al.*, 2002). So wird zum Beispiel die Halbwertszeit von Kälteschock-Proteinen kodierender mRNA durch die Konformationsänderung verlängert und gleichzeitig die Translation von nicht Kälte relevanter Proteine inhibiert (MORITA *et al.*, 1999; CHOWDHURY, 2003). Eine direkte Detektion der Kälte erfolgt zum Beispiel in *E. coli* anhand eines Transmembran-Chemorezeptors, dessen Histidin-Kinase-Aktivität von einem temperaturabhängigen Methylierungs-Equilibrium gesteuert wird (NARA *et al.*, 1996; NISHIYAMA *et al.*, 1999).

Nach der Detektion erfolgt eine Kälteschockantwort der Zelle die durch sogenannte „cold induced proteins“ (CIPs) streng reguliert wird. Dabei werden CIPs anhand des Zeitpunktes und der Expressionsstärke nach Eintritt der Temperaturabsenkung unterteilt. Zuerst erfolgt eine starke aber vorübergehende Expressionssteigerung von „cold shock proteins“ (CSPs). Diese circa 7 kDa großen Proteine dienen der initialen Kälteanpassung (WOUTERS *et al.*, 2000). Sie modifizieren eine Vielzahl an Zellfunktionen hinsichtlich ihrer Kältekompatibilität und helfen mit Kälte-bedingten Stressfaktoren. Dazu gehören Anpassungen des Metabolismus, Transkription, Translation, Membranmodifikation und der Proteinfaltung (SUUTARI & LAAKSO, 1994; GRAUMANN *et al.*, 1996; GRAUMANN *et al.*, 1997; BRANDI *et al.*, 1999). Nach der initialen

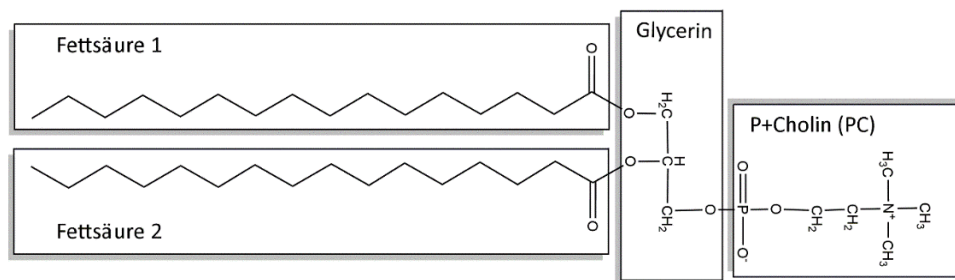
CSP-abhängigen Kälteadaptation erfolgt eine leichte aber durchgehende Expressionssteigerung der „cold acclimation proteins“ (CAPs), die das fortlaufende Wachstum gewährleisten (LIU *et al.*, 2002; SCHERER & NEUHAUS, 2006; TREVORS *et al.*, 2012). Dadurch erfolgt auch eine Anpassung des Proteinsyntheseapparates (JIANG *et al.*, 1997; DALLUGE *et al.*, 1997; PRÜB, 1999) und des Proteinexpressionsmusters. Neben Proteinen helfen auch kompatible Solute wie etwa Betain, Trehalose, Ectoin oder Carnitin mit der Kälte-Akklimation während des Wachstums (KANDROR *et al.*, 2002; Özcan *et al.*, 2007). Ihre vermutete Funktion besteht darin, als chemische Chaperone die Denaturierung und Aggregation von Proteinen zu verhindern. Weiterhin sollen sie oxidativen Stress reduzieren und als Frostschutzmittel die Bildung von Eiskristallen unterdrücken (KANDROR *et al.*, 2002; CLELAND *et al.*, 2004). Kompatible Solute werden entweder mit Hilfe von spezifischen Transportern aus dem Medium aufgenommen oder neu synthetisiert (BRIGULLA *et al.*, 2003). Sie sind im Cytoplasma lokalisiert und werden nicht in die Zellmembran eingelagert, sodass ein direkter Einfluss auf die Membranfluidität unwahrscheinlich ist (CLELAND *et al.*, 2004).

Viele Teilaspekte der Kälteadaptation konnten in den letzten Jahrzehnten entschlüsselt und teilweise miteinander verknüpft werden. Die Kälteanpassung als Ganzes ist aber nicht komplett verstanden und somit Gegenstand der gegenwärtigen Forschung. Angemerkt wird dabei, dass die meisten Daten von einzelnen individuellen Proteinen und Genen innerhalb eines Stammes untersucht worden sind. Infolgedessen zeigen sich die Defizite des derzeitigen Wissenstandes in der globalen zellulären Reaktion an niedrige Temperaturen (DE MAAYER *et al.*, 2014). Im Fokus dieser Arbeit steht die Ausweitung unseres Verständnisses über die etablierte Kälteanpassung der Zellmembran. Dieser Mechanismus der Zellmembranadaptation an niedrige Temperaturen wird gesondert im nächsten Absatz erläutert.

### **1.2 Kälteanpassung der bakteriellen Zellmembran**

Die Zellmembran ist essentiell für die strukturelle Integrität der Zelle und grenzt somit das Zellinnere von dem umgebenden Milieu ab, und bildet eine Diffusionsbarriere. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die verschiedene Proteine eingelagert sind (GORTER *et al.*, 1925, DANIELLI *et al.*, 1935). Diese können auf einer Lipidschichthälfte aufliegen (peripher) oder die komplette Lipiddoppelschicht (integral oder transmembranal) durchspannen (SINGER & NICHOLSON, 1972). Durch die assoziierten Proteine erweitert sich das Funktionsspektrum der

Zellmembran um weitere wichtige Funktionen wie chemotrophe Energiegewinnung, Ort der Photosynthese, Zellatmung, Stofftransport, Signalübermittlung und viele mehr. Dabei liegt in der Zellmembran ein Gewichtsverhältnis der Lipide zu Proteinen von ungefähr 1:1 vor (COOPER, 2000). Die Membranfluidität stellt die zu erhaltende Stellgröße dar, um die Membranfunktionen und assoziierten biologischen Prozesse zu gewährleisten (BERG *et al.*, 2003, ZHANG & ROCK, 2008). Folglich gehört die Membranmodifikation zu den wichtigsten Adaptationen für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen (CHINTALAPATI *et al.*, 2004).



**Abbildung 1: Chemische Struktur eines Glycerophospholipids.** Gehört zu den häufigsten Membranbildenden Lipiden. Bestehend aus einer polaren Kopfgruppe und einem apolaren Schwanz. Hier gezeigt ist ein Phosphatidylcholin (PC), verestert mit zwei gradkettigen 16:0 Fettsäuren. Hierdurch ergibt sich der amphiphile Charakter.

Das aktuell verwendete Membranmodell, das den Aufbau der Biomembran beschreibt, basiert noch immer auf dem Flüssigmosaik-Modell von SINGER & NICHOLSON (1972). Nach diesem Modell besteht die Membran aus einer zweilagigen Lipidschicht, die Proteine beinhaltet und sich in einem flüssig-kristallinen Zustand befindet. Seitdem wurden weitere Entdeckungen und Optimierungen hinzugefügt, die insbesondere die Zusammensetzung und Organisation betreffen. Unter anderem wurde gezeigt, dass die Membran keine homogene Phase bildet. Es können Mikrodomänen vorliegen, die sich in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften von den umliegenden Lipiden unterscheiden (JACOBSON *et al.*, 1995; SIMONS & IKONEN, 1997; BROWN & LONDON, 1997). Das Grundgerüst der komplexen Membranstruktur bilden die amphiphilen (Phospho-)Lipide, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Bereich bestehen (Abb. 1). Aufgrund ihrer Amphipatie und Geometrie lagern sich Membranlipide in wässriger Umgebung spontan zu einer Lipiddoppelschicht zusammen. Biologische Membranen sind keine starren Gebilde, sondern weisen dynamische Strukturen auf. Dabei kann sowohl die laterale Position als auch die Orientierung (Rotation) eines Lipids innerhalb der Membran ständig variieren. Die laterale Diffusion ist ein vergleichsweise schneller Prozess und bildet das Maß der Membranfluidität. Der Transfer eines Lipids von einer Membranschicht zur anderen wird transversale Diffusion oder Flip-Flop genannt und stellt

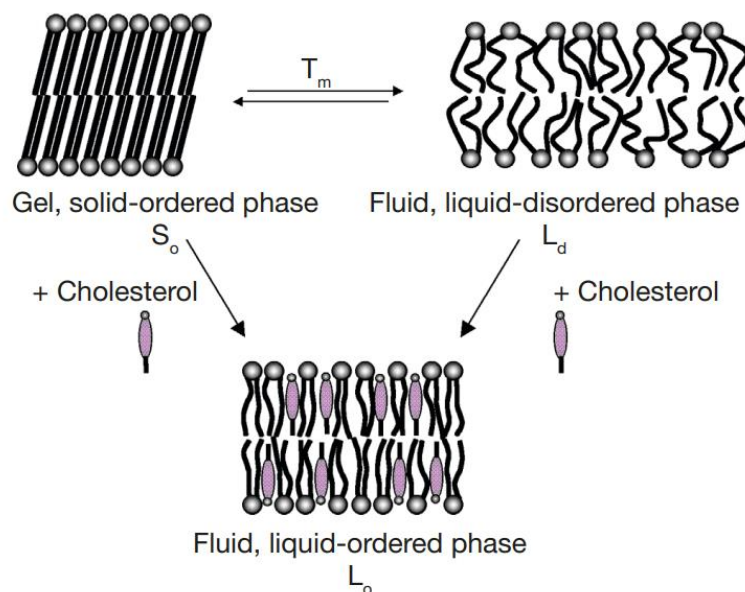
einen sehr langsamen Prozess dar. Die laterale Diffusion von Proteinen ist auch möglich, geschieht aber in der Regel 100-fach langsamer im Vergleich zu den Lipiden (EEMAN & DELEU, 2010).

Die häufigsten Vertreter der Phospholipide bilden die Glycerophospholipide, deren Aufbau stellvertretend hier beschrieben wird (Abb. 1). Das Grundgerüst bildet das Glycerin, an dem eine polare Kopfgruppe wie beispielsweise Cholin, Ethanolamin oder Serin über eine negative Phosphatgruppe am dritten C-Atom (sn-3) verknüpft ist. An den Positionen sn-1 und sn-2 sind zwei Fettsäuren verestert. Bakterien können ihre Lipidfluidität und hiermit die gesamte Membranfluidität durch die Modifikation ihrer Fettsäurezusammensetzung modulieren. Dadurch bleibt der physiologisch optimale, flüssige (flüssig-kristalline) Membranzustand als Reaktion auf wechselnde äußere Bedingungen erhalten (SUUTARI & LAAKSO, 1994; GOUNOT & RUSSELL, 1999). Die Fluidität der Biomembranen wird hauptsächlich durch die Acylketten der Lipide bestimmt (RUSSELL, 1984). Eine Abnahme der Membranfluidität, und der damit verbundene Phasenübergang in einen festen, gelartigen Zustand, führt zu einer Beeinträchtigung der Wachstumsleistung (ANNOUS *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 2002; CHIHIB *et al.*, 2003) durch Störung membranassoziierter Prozesse, wie zum Beispiel Elektronentransport in der Atmungskette, Membranpermeabilität und Substrattransport (ZHANG & ROCK, 2008). Um den Übergang von Flüssig- zur Gelphase bei niedrigen Temperaturen zu verhindern, werden Lipide mit niedrigeren Schmelztemperaturen in die Membran inkorporiert.

Lipide können eine Vielzahl verschiedener Zustände annehmen (LUZZATI & TARDIEU, 1974). Die beiden extremen Phasenzustände die in biologischen Membranen auftreten, sind die sogenannte Gel- und Fluidphase (Abb. 2). Die lamellare Gelphase ( $L_{\beta}$ ) wird auch solidegeordnete Phase ( $S_o$ ) genannt. Dabei sind die Lipide planar in einem flächigen dreieckigen Gitternetz angeordnet (JANIAK *et al.*, 1979). Alle Acylketten befinden sich aufgrund der Kompaktheit in einer *trans*-all-Konfiguration. Die Länge der Lipide ist maximal, was eine stark geordnete, kompakte und dicke Membranstruktur zur Folge hat. Das geht einher mit einer starken Reduktion der lateralen Diffusion. Die fluide-Phase ( $L_{\alpha}$ ) wird auch die flüssigeungeordnete Phase ( $L_d$ ) genannt. Die Acylketten breiten sich aus, sodass der Grad der Unordnung zunimmt, die Abstände zwischen den benachbarten Kopfgruppen sich vergrößern, die Dicke der Membran abnimmt und die planare Gitterstruktur sich auflöst. In dieser Phase wird sowohl die laterale Diffusion als auch die Rotation begünstigt und stellt somit die physiologisch aktive Form dar (SINGER & NICHOLSON, 1972; WINTER *et al.*, 2011). Ein weiterer



dritter Zustand entsteht bei der Einlagerung von nicht-membranbildenden Lipiden wie es zum Beispiel von der Cholesterol-Inkorporation in eukaryotischen Zellmembranen bekannt ist. Dabei bildet sich die flüssig-geordnete Phase ( $L_o$ ) aus. Diese Phase zeichnet sich durch die Kombination der positiven Eigenschaften von Gel- und Fluidphase aus (IPSEN *et al.*, 1987). Die Membran ist stärker kondensiert und geordnet und führt allgemein zu einer solideren Struktur (GALLY *et al.*, 1976) wobei gleichzeitig die laterale Diffusion und die Rotation ähnlich der flüssig-ungeordneten Phase aufrechterhalten wird (ALMEIDA *et al.*, 1993; FILIPPOV *et al.*, 2003). Der Übergang zwischen der Gel- und der Fluidphase erfolgt bei dem sogenannten thermotropen Phasenübergang ( $T_m$ ) und wird im Rahmen der Arbeit auch synonym mit dem Begriff der Schmelztemperatur verwendet. Dies beschreibt die Temperatur, die benötigt wird um das Schmelzen der Membranlipide zu ermöglichen und damit den Übergang des Membranzustandes von  $S_o$  ( $L_\beta$ ) nach  $L_d$  ( $L_\alpha$ ). Dieser Vorgang ist abhängig von dem hydrophoben Schwanz der Phospholipide.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen physikalischen Zustände der biologischen Membran: solide-geordnet ( $S_o$ ) und flüssig-ungeordnet ( $L_d$ ), modifiziert nach EEMAN & DELEU (2010).** In eukaryotischen Zellen ist eine dritte „Sonderform“ bekannt, bei der durch Einlagerung von lipophilen Verbindungen, wie für Cholesterol gezeigt, die flüssig-geordnete Phase ( $L_o$ ) induziert wird. Diese Membranphase bildet positive Eigenschaften der beiden zuvor genannten Membranzustände ab.

Für beide Temperaturextrema gilt, dass die Mikroorganismen einen spezifischen Mechanismus entwickelt haben, um die Veränderung der Membranfluidität durch die Umgebungstemperatur zu kompensieren. Diese Anpassung wurde als die homeoviskose Adaptation im Jahr 1974 von SINENSKY (1974) geschaffen und wird im Rahmen dieser Arbeit auch als Fettsäure-abhängige

## 1 Einleitung

---

Membrananpassung geführt. Dabei handelt es sich um einen bekannten, gut dokumentierten und etablierten Mechanismus in Bakterien (RUSSELL, 1984, ZHANG & ROCK, 2008). Die Synthese und Einlagerung von Fettsäuren mit niedrigen Schmelztemperaturen ermöglichen eine ausreichende Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen (SUUTARI & LAAKSO, 1994; GOUNOT & RUSSEL, 1999). Dadurch wird verhindert, dass der Phasenzustand von einem flüssig-ungeordneten Zustand in einen soliden-geordneten Gel-Zustand wechselt und dadurch die biologischen Funktionen beeinträchtigt werden, was gleichzeitig zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führt (RUSSELL, 1984; JONES *et al.*, 2002). Die Fluidität der Cytoplasmamembran wird dabei hauptsächlich durch die veresterten Fettsäuren der Lipide bestimmt. Dabei gibt die Schmelztemperatur der Lipide an, ob sich die Membran bei einer spezifischen Temperatur im ungeordneten flüssigen Zustand ( $T > T_m$ ) oder im geordneten festen Zustand ( $T < T_m$ ) befindet.

**Tabelle 1: Einfluss der Fettsäureeigenschaften auf die Membranfluidität in Bakterien (GOUNOT & RUSSEL, 1999).**

Erhöhung der Fluidität		Verringerung der Fluidität
Ungesättigtheit	↔	Sättigung
<i>Cis</i> -Ungesättigtheit	↔	Gradkettige Fettsäure
<i>Cis</i> -Doppelbindung	↔	<i>Trans</i> -Doppelbindung
Methylverzweigung	↔	Gradkettige Fettsäuren
Verkürzung der Fettsäuren	↔	Verlängerung der Fettsäuren

Die Interaktion der Acylketten wird von den Van-der-Waals-Kräften zwischen den Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen bedingt (FREEDMAN, 1981; HAZEL & WILLIAMS, 1990). Längere und gradkettige Acylketten bilden mehr Verbindungen aus, sodass mehr Energie (Temperatur) benötigt wird um diese Verbindung zu trennen. Der Einbau von Fettsäuren mit geringeren Schmelztemperaturen erlaubt den Zellen die Membran in der flüssig-kristallinen Phase zu halten, womit die laterale Diffusion innerhalb der Zellmembran und die assoziierten Proteinfunktionen erhalten bleiben (CHATTOPADHYAY, 2006). Längere, gesättigte, *trans*-Doppelbindungen und gradkettige Fettsäuren verringern die Fluidität. Im Gegensatz dazu erhöhen kurze, ungesättigte, *cis*-Doppelbindungen und Methyl-verzweigte Fettsäuren die Fluidität (Tab. 1; GOUNOT & RUSSEL, 1999; CHINTALAPATI *et al.*, 2004; Poger *et al.*, 2014). Zusätzlich zu der Fettsäureanpassung wurden untergeordnete, weniger effektive, Modifikationen der Membranfluidität beschrieben. Dazu gehören die Änderung der polaren

Kopfgruppe der Lipide und die Änderung der Konzentration von integralen Membranproteinen (RUSSELL, 1998; CHINTALAPATI *et al.*, 2004).

**Tabelle 2: Auswahl von für diese Arbeit relevanten Fettsäuren mit den entsprechenden Schmelztemperaturen.** Schmelztemperaturen wurden aus der Veröffentlichung von KNOTHE & DUNN (2009) entnommen.

Gesättigte Fettsäuren	(°C)	Verzweigte Fettsäuren	(°C)	Ungesättigte Fettsäuren	(°C)
12:0	43,3	12:0 iso	40,3	16:1 <i>cis</i> 9	1,2
13:0	41,4	13:0 iso	40,6	16:1 <i>trans</i> 9	32,2
14:0	53,5	14:0 iso	53,1		
15:0	52,2	15:0 iso	51,4		
16:0	62,2	15:0 anteiso	24,1		
17:0	60,9	16:0 iso	61,9		
18:0	69,3	17:0 iso	59,8		
19:0	67,8	17:0 anteiso	37,1		
20:0	74,8	18:0 iso	69,2		
21:0	73,7	19:0 iso	66,3		
22:0	79,6	20:0 iso	74,7		

Eine Auswahl an einigen, für diese Arbeit relevanten Fettsäuren und den entsprechenden Schmelztemperaturen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Trotz der allgemein anerkannten dominierenden Fettsäure-getriebenen Kälteanpassung der homeoviskosen Adaptation in Bakterien gibt es einige Berichte, bei denen mikrobielle Gemeinschaften keine ausreichende Änderung der Fettsäurezusammensetzung aufzeigten und somit teilweise nicht mit diesem Konzept konform waren. So wurden Phospholipid-Fettsäuren aus antarktischen Böden extrahiert und identifiziert. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der erwarteten Fettsäuren mit niedrigen Schmelztemperaturen (ungesättigte und anteiso-verzweigte Fettsäuren) nicht dominant war und in einigen Proben sogar nur lange gradkettige Fettsäuren vorgefunden wurden (MARGESIN *et al.*, 2007; GANZERT *et al.*, 2011). Weitere abweichende Fettsäureanpassungen wurden für verschiedene Stämme innerhalb der Spezies *Listeria monocytogenes* gezeigt. Diese zeigten eine deutlich schwächere Verschiebung hin zu anteiso verzweigten Fettsäuren nach einer Inkubation bei 4 °C (MASTRONICOLIS *et al.*, 1998; NICHOLS *et al.*, 2002; NEUNLIST *et al.*, 2005). Die Daten aus verschiedenen Berichten legen demnach

nahe, dass andere zusätzliche Anpassungsmechanismen an niedrige Temperaturen vorhanden sein müssen (BHAKOO & HERBERT, 1980; KÖNNEKE & WIDDEL, 2003). Eine vielversprechende alternative Stoffgruppe stellen hydrophobe, membranlösliche Verbindungen dar. Von eukaryotischen Zellen ist es bekannt, dass die Hauptregulation der Membranfluidität durch die Einlagerung von Cholesterol erfolgt und nicht durch die Änderung der Fettsäuren, wie es für Prokaryoten beschrieben ist. Die Steroidmoleküle lagern sich dabei parallel zu den membranbildenden Lipiden ein und induzieren den zuvor beschriebenen flüssig-geordneten ( $L_o$ ) Phasenzustand (OHVO-REKILA *et al.*, 2002; Abb. 2).

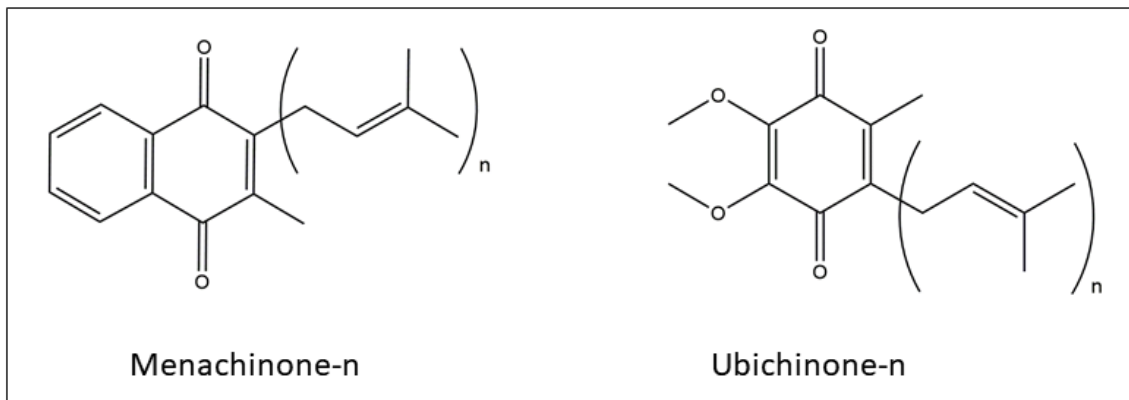
### 1.3 Weitere lipophile Modifikatoren der Zellmembraneigenschaften

Neben membranbildenden Lipiden (Phospho- und Sphingolipide) und Proteinen sind in prokaryotischen sowie eukaryotischen Zellmembranen insbesondere lipophile Isopren-basierte Verbindungen vorzufinden. Hierzu gehören die Steroide, Chinone und Carotinoide. Als bekanntestes Beispiel sind Cholesterol und Ergosterol (Steroide) in eukaryotischen Zellmembranen zu nennen. Das starre Grundgerüst der Sterole lagert sich zwischen den Lipiden ein und unterbricht ihre direkte Interaktion, sodass die Phasenübergangstemperatur von der  $S_o$ - zur  $L_d$ -Phase verändert wird und sich der Temperaturbereich der Phasenumwandlung verbreitert (MELCHIOR & STEIM, 1976; DUFOURC, 2008). Dadurch ermöglichen beide Sterole die Aufrechterhaltung der lateralen Lipidmobilität bei niedrigen Temperaturen, wobei gleichzeitig die Membranordnung erhöht wird (VAN MEER *et al.*, 2008; BERG *et al.*, 2003; CROCKETT, 1998). Dass eine generelle analoge Anpassung in Bakterien erfolgen könnte, lässt sich anhand der Bakteriengruppe der Mykoplasmen verdeutlichen. Diese obligaten Zellparasiten sind nicht in der Lage eine Temperaturreduktion durch den Einbau von ungesättigten Fettsäuren zu kompensieren. Sondern sind auf die Aufnahme von exogenem, Wirts-eigenem Cholesterol angewiesen, wodurch die Kristallisation der Membran bei niedrigen Temperaturen verhindert wird. Dabei wird ein analoger Mechanismus zu eukaryotischen Zellen vermutet (ROTTEM *et al.*, 1973; Razin *et al.*, 1980; ROTTEM, 1981). Neben der Aufnahme von Cholesterol durch bestimmte Vertreter der Mollicutes und die Synthese von Sterolen durch wenige Myxobakterien (Bode *et al.*, 2003), stellen Hopanoide einen dem Cholesterol strukturell ähnlichen Stoff dar, der auch von einigen Bakterien gebildet werden kann (KANNENBERG & PORALLA, 1999). Dass Hopanoide eine Cholesterol-ähnliche Funktion in bakteriellen Membranen besitzen, zeigten bereits mehrere Studien (PORALLA *et al.*, 1980; PORALLA &

KANNENBERG, 1987; DUFOURC, 2008;). Auch spezifische Verbreiterung des Phasenüberganges konnte von SÁENZ *et al.* (2012) gezeigt werden. Aber viele Bakterientaxa produzieren keine Hopanoide und es konnte bis heute kein Zusammenhang zwischen Hopanoiden und der Kälte-induzierten Membranadaptation gezeigt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten lipophilen Stoffgruppen werden in den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 eingeführt.

### 1.3.1 Isoprenoide Chinone

Bei isoprenoiden Chinonen handelt es sich um lipophile Substanzen, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Der Aufbau erfolgt aus dem Chinongrundgerüst und einer isoprenoiden Seitenkette (Abb. 3). Die Synthese des Chinongrundgerüsts leitet sich von den entsprechenden aromatischen Vorstufen ab und erfolgt im Rahmen des Shikimatweges, welcher ebenfalls für die Synthese von aromatischen Aminosäuren verantwortlich ist (BENTLEY & HASLAM, 1990). Daraus ergeben sich aus den Aromaten Benzol, Naphtalin und Anthracen die entsprechenden Chinone Benzochinon, Naphtochinon und Anthrachinon durch Oxidation. Bakterielle isoprenoide Chinone basieren auf zwei verschiedenen Grundgerüsten. Zum einen die Gruppe der Benzochinone – besser bekannt als Ubichinon oder Coenzym Q – und zum anderen die Naphtochinone. Die Letzteren werden dann nochmals unterteilt in Phyllochinone (Vitamin K<sub>1</sub>) und Menachinone (Vitamin K<sub>2</sub>). Phyllochinone werden in Pflanzen gebildet und besitzen am dritten C-Atom des Naphtochinonrings eine Phytylgruppe. Menachinone werden von Bakterien synthetisiert und unterscheiden sich durch die ungesättigte Polyprenylgruppe am dritten C-Atom (SØBALLE & POOLE 1999). Die beiden Chinon-Grundgerüste können dann zusätzlich anhand der Länge und/oder dem Hydrierungsgrad der Isoprenseitenkette variiert werden. Dadurch ergeben sich die etablierten Kurzschreibweisen Q-8 für Ubichinone, wobei die Zahl die Länge der Isopreneinheiten beschreibt, und MK-8 für Menachinone (Nič *et al.* 2009). Der Hydrierungsgrad wird durch ein eingeklammertes Wasserstoff-Zeichen gekennzeichnet: zum Beispiel MK-8 (H<sub>2</sub>) (COLLINS & JONES, 1981). Innerhalb der Mikroorganismen sind Menachinone allgemein mit Bakterien und Archaea assoziiert. Ubichinone können alleine oder in Kombination mit Menachinonen innerhalb der Klasse der Gram-negativen Alpha-, Beta- und Gamma-Proteobacteria vorkommen (DEGLI ESPOSTI, 2017). Dadurch und anhand der verschiedenen Längen sowie Sättigungsgrade eignen sich isoprenoide Chinone auch als Marker für die chemotaxonomische Einordnung von Mikroorganismen (JEFFRIES *et al.*, 1967; COLLINS *et al.*, 1979; COLLINS & JONES, 1981).



**Abbildung 3: Chemische Struktur von Menachinon (links) und Ubichinon (rechts).**

In der Literatur wird isoprenoiden Chinonen die Hauptfunktion des Elektronentransportes innerhalb der Atmungskette zugesprochen (NOWICKA & KRUK, 2010). Dazu zählen Ubichinone, Menachinone und Dimethylmenachinone. Es werden nacheinander bis zu zwei Elektronen auf das Chinon übertragen, womit auch gleichzeitig zwei Protonen von der Membrannenseite gebunden werden, was letztendlich in der Reduktion zu einem Hydrochinon resultiert. Bei der Übertragung auf den weiteren Elektronenakzeptor innerhalb der Atmungskette wird das Hydrochinon wieder reduziert und die überschüssigen Protonen auf der Membranaußenseite abgegeben. Weitere Funktionen im Rahmen der Genregulation und dem Management von oxidativem Stress wurden von SØBALLE & POOLE (1999) genannt.

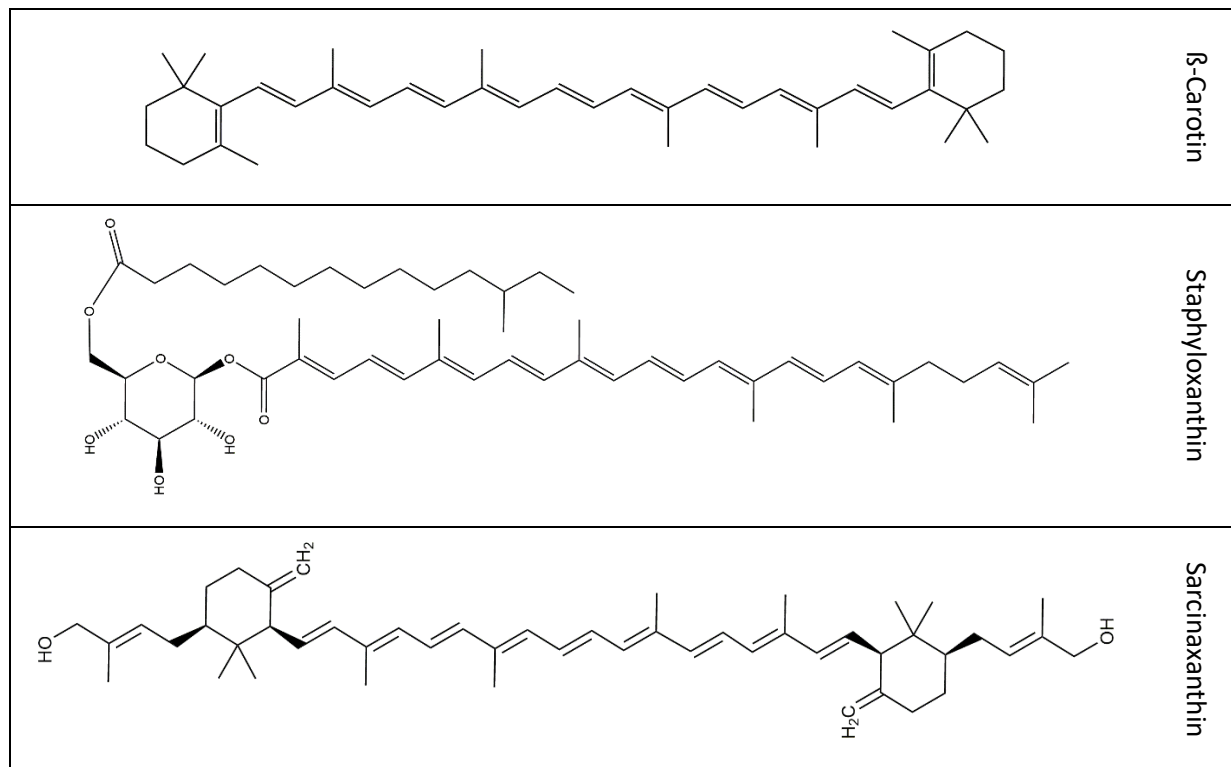
Bereits im Jahr 1970 kamen HAMMOND & WHITE zu der Schlussfolgerung, dass isoprenoide Chinone nicht nur auf ihre Funktion des Elektronentransportes und Umgang mit oxidativem Stress beschränkt sein könnten, sondern weitere unbekannte Funktionen vorliegen müssten. Weiterhin verstärkt sich der Verdacht einer Beteiligung an der Kälteanpassung durch verschiedene Bakterientaxa deren Chinongehalt bei 10 °C im Vergleich zu 30 °C deutlich erhöht war (DERICHS, 2015). Ein weiterer Indikator für eine zusätzliche Funktion neben der Elektronenübertragung kann innerhalb der Eukaryoten ausgemacht werden. Dort wurden isoprenoide Chinone nicht nur in der mitochondrialen Plasmamembran vorgefunden, sondern ebenfalls im endoplasmatischem Reticulum und dem Golgi-Apparat (SØBALLE & POOLE, 1999). Obwohl es keine Informationen über den Einfluss von Menachinonen auf die Phasenübergangstemperatur in Bakterienmembranen gibt, wurden einige Hinweise für einen fluidisierenden Effekt von Vitamin K<sub>1</sub> in künstlichen Vesikeln gefunden (ORTIZ *et al.*, 1986; ORTIZ & ARANDA, 1999). Hierfür mussten aber große Konzentrationen von 10 bis 20 mol% an

Phyllochinon verwendet werden, um eine geringe Auswirkung anhand der Fluoreszenzmessung zu zeigen (ASAI, 2000).

### 1.3.2 Carotinoide

Carotinoide stellen eine große umfangreiche Stoffgruppe mit mindestens 800 beschriebenen Verbindungen dar (BRITTON, 1995; JACKSON *et al.*, 2008). Die Synthese erfolgt aus Isopreneinheiten durch phototrophe und chemoorganotrophe Prokaryoten, Pflanzen, Pilze und Algen (SINGH & CAMA, 1975). Die meisten Carotinoide (> 95 %) bestehen aus acht Isopreneinheiten, woraus ein C40-Grundgerüst assembliert wird, das in der Regel eine  $\beta$ -Zyklisierung aufweist. (BRITTON, 1995; NETZER *et al.*, 2010). Das konjugierte Doppelbindungssystem der Polyenkette ist verantwortlich für die charakteristische gelbe bis rote Pigmentierung bedingt durch die Lichtabsorption im Wellenlängenbereich von 400-500 nm (BRITTON, 1995). Weitere Modifikationen sind die Hydrierung der Doppelbindungen oder die Addition von polaren sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen. Daraus ergibt sich die Unterteilung der Carotinoide in apolare Carotine, bestehend nur aus einer Polyen-Kohlenwasserstoffkette. Xanthophylle hingegen besitzen mindestens eine Sauerstoff-haltige Gruppe (Zum Beispiel Hydroxylgruppe) und weisen somit eine größere Polarität auf (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; BELITZ *et al.*, 2008; Abb. 4).

Nur ein paar wenige chemoorganotrophe Bakterien sind in der Lage C30, C45 oder C50 Carotinoide zu produzieren (NETZER *et al.*, 2010; ALBERMANN & BEUTTLER, 2016). Derartige Carotinoide sind zum Beispiel das von Staphylokokken produzierte C30-Carotinoid (GINZABURO *et al.*, 1967; MARSHALL & WILMOTH, 1981). Das Hauptpigment  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl 1-O-(4,4'-Diaponeurosporen-3-*oat*)-6-O-(12-Methyltetra-decanoat) wird als Staphyloxanthin bezeichnet, wobei ein Glucose-Rest mit dem Carotinoid und einer C15-Fettsäure verestert ist. Die Synthese und Struktur von Staphyloxanthin wurde von PELZ *et al.* (2005) in *S. aureus* beschrieben.



**Abbildung 4: Chemische Strukturformel eines Carotins (β-Carotin) und für diese Arbeit relevante Xanthophylle (Staphyloxanthin und Sarcinaxanthin).** Carotine bestehen nur aus einer Kohlenwasserstoffkette und haben einen apolaren Charakter. Xanthophylle stellen polare Carotinoide dar. Die Polarität wird durch diverse Sauerstoff-haltige Reste, wie zum Beispiel Hydroxyl-Gruppen, erhöht.

Als lipophile Verbindungen sind Carotinoide in der Zellmembran lokalisiert, wobei ihre Orientierung innerhalb der Membran je nach ihrer chemischen Struktur und der Dicke der Membran variieren kann (MILON *et al.*, 1986, GRUSZECKI, 2004; Gruszecki & Strzałka, 2005). Sie erfüllen wichtige biologische Funktionen wie die Lichternte als Antennenpigmente im Photosystem (SIEFERMANN-HARMS, 1985; CROCE & VAN AMERONGEN, 2014), den Schutz vor oxidativem Stress (ALBERMANN & BEUTTLER, 2016; DAHL *et al.*, 1989), den Schutz vor ultravioletter Strahlung (ANWAR *et al.*, 1977; MOHANA *et al.*, 2013) und die Stabilisierung von Pigmentproteinen (MOSKALENKO & KARAPETYAN, 1996). Zusätzlich zu den oben genannten Funktionen wurde die Beteiligung von Carotinoiden an der Kälteanpassung vermutet (NES, 1974; ROHMER *et al.*, 1978; STRAND *et al.*, 1997). Die aufgestellte Hypothese ging davon aus, dass Carotinoide eine ähnliche Funktion bei der Regulierung der Membranfluidität haben könnten wie Sterole (Cholesterol oder Ergosterol) in eukaryotischen Zellen. Sie erhöhen die Membranordnung bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der lateralen Lipidmotilität, was zu einem flüssig-geordneten Membranzustand (VAN MEER *et al.*, 2008) führt. Ähnliche Mechanismen wurden zuvor für die bakteriellen Sterol-ähnlichen Hopanoide gezeigt (SÁENZ *et*



*al.*, 2012, 2015). *In vitro*-Studien mit künstlichen Membranvesikeln zeigten bereits regulatorische Effekte auf die Membranfluidität verursacht durch Carotinoide (SUBCZYNSKI *et al.*, 1992; GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996). Veröffentlichte Daten deuten darauf hin, dass der Einfluss auf die Membraneigenschaften von den polaren Xanthophyllen größer ausfällt als von den apolaren Carotinen (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996). Ein weiteres Indiz, das den Verdacht auf Carotinoide als Teil der Kälteanpassung lenkt, ist die Vielzahl an antarktischen Gram-positiven Bakterien, die häufig eine Pigmentierung aufweisen. So zeigten CHATTOPADHYAY *et al.* (1997) eine Kälte-abhängige Carotinoidsynthese im psychrotoleranten Bakterium *Micrococcus roseus*. Bei einer Wachstumstemperatur von 5 °C wurde ein Anstieg des Gesamtcarotinoidgehaltes sowie dem Anteil an den polareren mono- und di-glycosylierten Carotinoiden festgestellt.

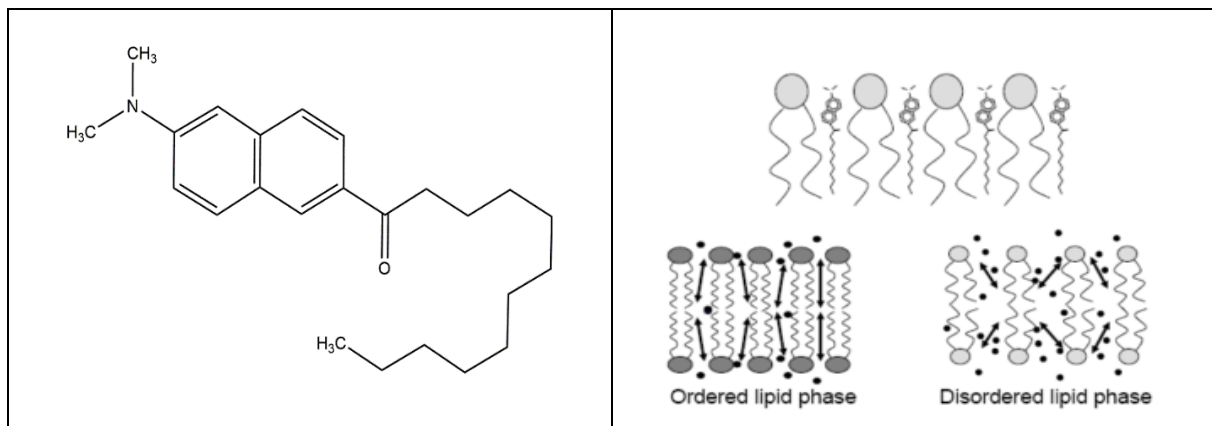
#### 1.4 Methoden zur Quantifizierung der Kälteanpassung der Zellmembran

Wie im vorherigen Abschnitt 1.2 beschrieben, stellt die entscheidende Kenngröße für die Anpassung der Zellmembran ihre Fluidität dar. Die optimale Funktionalität der Membran ist dabei in dem flüssig-ungeordneten Phasenzustand gegeben. Zu hohe Fluiditäten können sich wiederum, durch die Reduktion der Membranintegrität, ebenfalls negativ auswirken (KONINGS *et al.*, 2002; SOHLENKAMP & GEIGER, 2016).

Um den direkten Einfluss der verschiedenen Adaptationsmechanismen auf die Membran messen zu können, sollte mit einer angemessenen Methode die Membranfluidität bestimmt werden. In der Literatur sind hierfür bereits mehrere Methoden genannt. Darunter fallen die dynamische Differenzkalorimetrie, Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie, Kernspin- oder Elektronenspinresonanz, die generalisierte Polarisierung sowie der Fluoreszenzanisotropie (DENICH *et al.*, 2003). Wichtigstes Auswahlkriterium für diese Arbeit war eine Methode zur Messung an ganzen Zellen um eine möglichst direkte Aussage über die Membranfluidität treffen zu können, die der realen Membran entspricht. Hierdurch fiel die Auswahl auf die Fluoreszenzanisotropie und die generalisierte Polarisierung, denn die anderen Methoden ermöglichen entweder keine Messung an ganzen lebenden Zellen oder die Fluidität wird indirekt nur als Folge eines distinkten Phasenübergangs bestimmt. Bei beiden Methoden handelt es sich um eine Sonden-abhängige Fluoreszenzmessung. Diese wird vor der Messung in die Membran eingelagert und erlaubt dadurch die Messung an der intakten Zelle samt Zellmembran.

## 1 Einleitung

Die Fluoreszenz beschreibt einen physikalischen Prozess, bei dem ein Fluorophor Photonen einer Lichtquelle absorbiert und somit ein Elektron aus dem höchsten Molekülorbital in ein energiereicheres Orbital angehoben wird. Dabei spricht man von einem angeregten Zustand des Elektrons ( $S_0 \rightarrow S_1$ ). Anschließend fällt das Elektron wieder in eine energetisch günstigere Orbitalschale, die freigewordene Energie wird als Photon abgegeben und kann als Fluoreszenz detektiert werden. Dabei gilt, dass das emittierte Licht langwelliger (energieärmer) ist als das Licht der Anregungsquelle (ATKINS *et al.*, 2010).

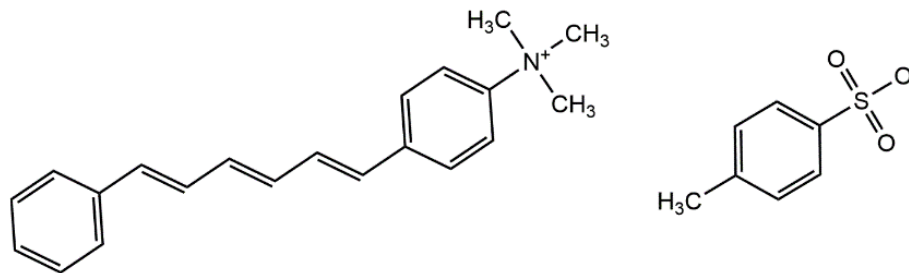


**Abbildung 5: Links, Struktur von Laurdan bestehend aus einem fluoreszenzgebenden Naphthalin-Derivat (Amin) und einem Laurinsäure-Rest.** Die Orientierung der Sonde innerhalb der Zellmembran nach der Inkorporation ist auf der rechten Seite dargestellt (SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Dabei befindet sich der Naphthalin-Rest aufgrund seiner Polarität in der Nähe der polaren Kopfgruppen der Phospholipide. Je nach Ordnungsgrad befinden sich unterschiedliche Mengen an H<sub>2</sub>O-Molekülen in der Umgebung, die durch die dipolare Relaxation die Rotverschiebung des emittierten Lichtes induzieren.

Laurdan (1-(6-(Dimethylamino)-2-naphthalyl)-1-dodecanon) wurde von WEBER & FARRIS (1979) entwickelt und synthetisiert um das Phänomen der dipolaren Relaxation zu untersuchen. Laurdan setzt sich aus einem fluoreszenzgebenden Naphthalin-Derivat und einem Laurinsäure-Rest, der die Einlagerung in die Membran ermöglicht, zusammen (PARASASSI *et al.*, 1998). Durch eine partielle Ladungstrennung zwischen dem 2-Dimethylamino- und dem 6-Carbonyl-Rest besitzt Laurdan ein Dipolmoment. Dieses Dipolmoment wird bei Anregung verstärkt und kann zu einer Reorientierung der umliegenden Lösemittel-Dipole, zum Beispiel Wasser, führen (Abb. 5). Die dafür benötigte Energie verringert das Energieniveau des angeregten Zustands ( $S_1$ ) und resultiert in einer Rotverschiebung des emittierten Spektrums. Diese elektrische Polarisation, ausgehend von der Dipol-Relaxation, ist abhängig von der Polarität des vorliegenden Lösungsmittels. Aufgrund des solvatochromatischen Effektes führen apolare Lösungsmittel zu einem blauen (kürzere, energiereichere Wellenlänge) Emissionsmaximum wohingegen polare Lösungsmittel zu einem roten (längere, energieärmere Wellenlänge)

Emissionsmaximum führen. Die Rotverschiebung ist dabei unabhängig von der Polarität und Ladung der Lipid-Kopfgruppe. Es konnte gezeigt werden, dass die Emissionsänderung nur vom Phasenzustand der Doppelschicht abhängt (PARASASSI *et al.*, 1991).

Bei einer Inkorporation der Sonde in die Zellmembran ergibt sich folgender Zusammenhang: Befindet sich die Membran in einer geordneten Phase (Gelphase,  $< T_m$ ), dringen aufgrund der dichten Packweise der Lipide deutlich weniger Wassermoleküle in die obere Schicht der Lipidhälfte ein. Diese apolare Umgebung resultiert in einem blauen energiereichen Emissionsmaximum bei circa 440 nm (PARASASSI *et al.*, 1991). Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide führen zu einer ungeordneten Membranphase (flüssig-ungeordnete Phase) wobei Wassermoleküle tiefer in die Membranhälfte eindringen und somit eine polare Lösemittelumgebung entsteht. Dieser solvatochromatische Effekt resultiert in einer kontinuierlichen Rotverschiebung bis das Limit bei einem grünen Emissionsmaximum bei ungefähr 490-500 nm erreicht ist.



**Abbildung 6: Chemische Strukturformel von TMA-DPH.** Fluoreszenz-Sonde zur Messung der Anisotropie als ein Maß der Membranfluidität. Durch die Verankerung mit Hilfe des Toluensulfonats wird die Sonde parallel zu den Lipiden ausgerichtet.

Die Anisotropiemessungen wurden mit der Sonde TMA-DPH (1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien *p*-Toluenesulfonat, Abb. 6) durchgeführt (CUNDALL *et al.*, 1979). TMA-DPH lagert sich spontan in die Zellmembran von lebenden Zellen ein und zeigt dort eine starke Fluoreszenz, wohingegen keine Fluoreszenz im wässrigen Milieu zu verzeichnen ist (ILLINGER *et al.*, 1995). Dadurch eignet sich diese Sonde besonders zur Messung der Membranfluidität anhand der Fluoreszenzanisotropie. In diesem Fall wird die direkte Beweglichkeit der Sonde und der umgebenden Lipide gemessen (HARRIS *et al.*, 2002; WINTER *et al.*, 2011). Das Prinzip der Fluoreszenz-Anisotropiemessung beruht auf der photoselektiven Absorption des Fluorophors von polarisiertem Licht. Das Ausmaß der Absorption ist dabei abhängig von dem Winkel des Übergangsdipolmoments  $\vec{\mu}_A$  der einzelnen

Sonde zum elektrischen Feldvektor  $\vec{E}$  ausgehend von der Strahlenquelle. Die stärkste Absorption und folglich auch Emission tritt auf, wenn beide Vektoren parallel zueinander ausgerichtet sind. Der Austrittsvektor der emittierten Photonen  $\vec{\mu}_A$  ist dabei nicht kongruent zum Eintrittsvektor, aber erfolgt ebenfalls polarisiert. Die stärkste Fluoreszenz kann demnach bei ruhenden Sonden, bei denen sich der Winkel zwischen  $\vec{\mu}_A$  und  $\vec{E}$  aufgrund der mangelnden Rotation am geringsten ändert, gemessen werden. Falls die Sonde sich in Rotation befindet und in einem bestimmten Verhältnis zur Fluoreszenzlebenszeit steht, wird das emittierte Licht zufällig in ihrer Ausrichtung verändert. In der Gesamtheit ist die Emission nun weniger stark polarisiert. Das Ausmaß der Entpolarisierung kann berechnet werden, indem vertikal polarisiertes Licht zur Anregung verwendet wird und die Emissionsintensität vertikal (vertikale Polarisation,  $I_{VV}$ ) und horizontal (horizontale Polarisation,  $I_{VH}$ ) separat detektiert wird (Formel 8). Die Rotationsrate der verwendeten Sonde verhält sich in der Zellmembran so, dass mit Zunahme der Fluidität das Licht kontinuierlich depolarisiert wird und somit die Anisotropie abnimmt (Lakowicz, 2006).

### 1.5 Überblick über die verwendeten Modellorganismen

Die aufgestellte Hypothese dieser Arbeit wurde anhand vier verschiedener Modellorganismen *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Staphylococcus xylosus* und *Micrococcus luteus* überprüft. Für jede Spezies wurde mindestens ein Lebensmittelisolat ausgewählt und um den entsprechenden nächstverwandten Typstamm als Referenz erweitert. Alle Stämme zeigten nach den vorläufigen Daten erste Hinweise einer Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation und wurden nach diesem Kriterium ausgewählt.

Aufgrund des nicht einheitlichen Verhaltens der *L. monocytogenes* Isolate, wurde die Anzahl der zu untersuchenden Stämme, die aus einem gekühlten Lebensmittel isoliert worden sind, auf acht erhöht. Zusätzlich wurden zwei weitere Stämme DSM 20600<sup>T</sup> und ATCC 19115 aus Kultursammlungen ausgewählt. Vorläufige Untersuchungen zeigten, dass die Fettsäureanpassung innerhalb der Stämme unterschiedlich stark ausgeprägt war. So zeigte der Stamm FFH, ähnlich zum beschriebenen Stamm ATCC 19115, eine geringere Fettsäureadaptation an niedrige Temperaturen (NEUNLIST *et al.*, 2005). Aufgrund der außergewöhnlichen Psychrotoleranz in Kombination mit der Pathogenität ist die Kälteadaptation der Art *L. monocytogenes* von großem Interesse. *L. monocytogenes* ist ein

Gram-positiver, fakultativer intrazellulärer Lebensmittelpathogen, der in der Umwelt ubiquitär vorkommt und die menschliche Listeriose verursacht (FARBER & PETERKIN, 1991). Die Schwere der Erkrankung ist durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet, die zwischen 14 bis 30 % (HERNANDEZ-MILIAN & PAYERAS-CIFRE, 2014) liegen kann. *L. monocytogenes* zeichnet sich durch seine hohe Anpassungsfähigkeit an verschiedene Umgebungsfaktoren wie Temperatur und osmotischen Stress aus (ANGELIDIS *et al.*, 2002). Das Wachstum von *L. monocytogenes* kann in einem bemerkenswert breiten Temperaturbereich von -2 bis 50 °C (FARBER & PETERKIN, 1991; KO *et al.*, 1994) erfolgen. Dies ermöglicht die Persistenz des Bakteriums in Lebensmittelverarbeitungsanlagen, was zu einer nachfolgenden Sekundärkontamination von gekühlten Lebensmitteln führt, die den Hauptübertragungsweg der menschlichen Listeriose darstellt.

Die Fettsäureprofilmodifikation von *Listeria* im Rahmen der Anpassung an niedrige Temperaturen wurde bereits ausführlich beschrieben (ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998, 2006; TATITURI *et al.*, 2015). Die Zytoplasmamembran von *Listeria monocytogenes* ist durch einen hohen Anteil (> 85 %) der verzweigten Fettsäuren 15:0 anteiso und 17:0 anteiso gekennzeichnet, deren jeweilige Anteile je nach Temperatur variieren (ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998). Die zuvor genannten verschiedenen Ausprägungen der Fettsäureadaptation deuten auf das Vorhandensein anderer Anpassungsmechanismen, neben der Substitution der Fettsäure 17:0 anteiso durch 15:0 anteiso, hin. MASTRONICOLIS *et al.* (2006) haben für einen *L. monocytogenes* Stamm einen 30-%-igen (w/w) Anstieg der neutralen Lipide nach dem Wachstum bei niedriger Temperatur nachgewiesen und den Einfluss dieser Lipide auf die Phasenübergangstemperatur der gesamten Lipidfraktion gezeigt. Die Verbindungen der neutralen Lipidfraktion wurden in dieser Studie jedoch nicht im Detail identifiziert. Eines der neutralen Lipide von *L. monocytogenes* stellt das Hauptmenachinon MK-7 dar (COLLINS *et al.*, 1979).

Die zweite Spezies, die mit dem Schwerpunkt der isoprenoiden Chinone untersucht wurde, war *Paenibacillus glucanolyticus*. Diese Art wurde als *Bacillus glucanolyticus* beschrieben und von ALEXANDER & PRIEST (1989) aus Erde isoliert. Dabei handelt es sich um ein Gram-positives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, das eine charakteristische terminale Sporenbildung aufweist. Basierend auf der 16S rRNA wurde diese Spezies in *P. glucanolyticus* umbenannt (SHIDA *et al.*, 1997). Als Auswahlkriterium für den Stamm J12 diente die von DERICHS (2015) gezeigte deutliche Zunahme der Menachinonkonzentration bei 10 °C im Vergleich zu 30 °C und eine moderat ausgeprägte Fettsäuremodifikation. Vertreter der Gattung *Paenibacillus*

wurden zum einen in arktischen Böden gefunden (MONTES *et al.*, 2004; NELSON *et al.*, 2009) und zum anderen sind sie als Lebensmittel-Verderber und potentielle Toxinbildner bekannt (RASIMUS *et al.*, 2012).

Die Stämme *Staphylococcus xylosus* J70 und *Micrococcus luteus* J3 wurden aufgrund des Vorhandenseins von Carotinoiden ausgewählt, dessen Konzentration sich mit der Temperaturabsenkung erhöhte. Somit zeigten sie eine Grundvoraussetzung einer Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation. Insbesondere *S. xylosus* Stamm J70 zeichnete sich durch eine fehlende Pigmentierung bei 30 °C aus. *S. xylosus* gehört zu der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken innerhalb der Firmicutes. Diese sind unbewegliche, Gram-positive, fakultative anaerobe, unbewegliche Kokken. Es handelt sich dabei um eine ubiquitär vorkommende Spezies die zuerst von der menschlichen Haut isoliert wurde (SCHLEIFER & KLOOS, 1975). Es wird häufig in natürlich fermentierten Produkten und in der Lebensmittelverarbeitung isoliert (IRLINGER *et al.*, 1997; ROSSI *et al.*, 2001; MARTÍN *et al.*, 2006). Bei *M. luteus* handelt es sich ebenfalls um Gram-positive, unbewegliche Kokken. Im Gegensatz zu den Staphylokokken ist *M. luteus* strikt aerob und gehört dem Phylum der Actinobacteria an. Bei beiden Spezies handelt es sich bei den Hauptfettsäuren um die verzweigten Fettsäuren 15:0 anteiso und 15:0 iso (SCHLEIFER & KLOOS, 1975; WIESER *et al.*, 2002).

## 1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der derzeitige Forschungsstand geht von einer primären Fettsäure-abhängigen Anpassung der Membran an niedrige Temperaturen aus. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Hypothese der Membran-Kälteadaptation bedingt durch die Einlagerung von lipophilen Molekülen in die Zellmembran untersucht werden. Hierfür sollen im ersten Schritt mit Hilfe von verschiedenen Lipidanalysen die Fettsäuren, isoprenoiden Chinone und Carotinoide qualitativ sowie quantitativ bei verschiedenen Temperaturen bestimmt werden. Eine generelle Bewertung der Anpassung soll durch die Bestimmung der Wachstumsraten und einem Kältestresstest erfolgen. Aufgrund der komplexen Kälteadaptation der Bakterien, bei der viele Zellbestandteile und Funktionen involviert sind, soll eine direkte Auswirkung der verschiedenen Anpassungsmechanismen auf die Membraneigenschaften bestimmt werden. Hierfür werden Sonden-abhängige Fluoreszenzmessungen durchgeführt, um eine Aussage über die Auswirkung auf die Membranordnung sowie Membranfluidität *in vivo* treffen zu können. Hieraus könnten auch direkte Vorteile der Membrananpassung festgestellt werden, auch wenn die globale Anpassung (Wachstumsrate) durch andere limitierende Faktoren keinen Unterschied indizieren würde. Weiterhin soll die temperaturabhängige Regulation der lipophilen Verbindungen mit Hilfe einer Transkriptomanalyse untersucht werden. Zusätzlich sollen nächstverwandte Typstämme als Referenzstämme verwendet werden, um eine mögliche differente Ausprägung der Kälteadaptation zwischen Isolaten und Stämmen aus Kultursammlungen aufzuzeigen.

Mit Hilfe der genannten Punkte soll schlussendlich ein übergelagertes Verständnis der Kälteanpassung von Bakterien erlangt werden, die das Leben in der größten Biosphäre ermöglicht. Außerdem wird durch den globalen Ansatz eine umfassende Erfassung der potentiellen Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation für Bakterien allgemein ermöglicht.

## 2 Material und Methoden

Sofern nicht näher spezifiziert, wurden alle verwendeten Chemikalien, organische Lösungsmittel und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA und der jetzigen Tochtergesellschaft Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland). Alle Restriktionsenzyme, alkalische Phosphatase, T4-Polymerase sowie die Q5-Polymerase wurden von der Firma New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Für die Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Programme verwendet: das Zitierprogramm Citavi 6 (Swiss Academic Software); die Erstellung von Text, Tabellen und Bildern erfolgte mit dem Microsoft Office 2016 Paket (Microsoft); die graphische Auswertung der Ergebnisse wurde mit OriginPro 8G (OriginLab) durchgeführt.

### 2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.1.1 Organismen, Medien und Kulturbedingungen

##### 2.1.1.1 Verwendete Organismen

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Spezies untersucht, die jeweils einem Schwerpunkt dieser Arbeit zugeordnet sind. *Listeria monocytogenes* und *Paenibacillus glucanolyticus* sollten im Hinblick auf eine potentielle Membranmodifikation bei niedrigen Temperaturen bedingt durch isoprenoide Chinone untersucht werden. Bei *Staphylococcus xylosus* und *Micrococcus luteus* standen Carotinoide unter dem Verdacht eine Fettsäure-unabhängige Kälteanpassung zu ermöglichen. Pro Spezies wurde mindestens ein Lebensmittel-assoziiertes Isolat, isoliert aus einem kalten Habitat, untersucht. Die Isolation der Bakterien erfolgte im Rahmen der Arbeitsgruppen-eigenen Lebensmittelanalysen der letzten Jahre. Die Identifikation beruhte auf der Analyse der Fettsäureprofile sowie der 16S rRNA-Gensequenzierung.

Es wurden insgesamt 10 verschiedene *Listeria monocytogenes* Stämme untersucht. Acht Stämme: FFL 1, FFL 11, 1B, 3B, Iso 11/13, FFH, FF 127 und FF 141 wurden in den letzten Jahren aus verschiedenen gekühlten Lebensmitteln isoliert. Dabei wurden alle Stämme über einen Zeitraum von acht Jahren aus verschiedenen Lebensmittelproben isoliert und, wenn nicht anders angegeben, in Deutschland gefunden. Der Stamm FF 127 wurde unmittelbar nach der



Produktion in Österreich im Jahr 2006 aus zugeschnittenem Räucherlachs in einer Vakuumverpackung isoliert. Der Stamm FF 141 wurde 2007 in vakuumverpacktem Räucherlachs gefunden, der in Polen produziert und anschließend gefroren nach Österreich transportiert wurde. Im Jahr 2011 wurde der Stamm FFH bei einer Analyse von Hackfleisch isoliert. Die Stämme FFL 1 und FFL 11 wurden 2012 aus irischem Bio-Räucherlachs beziehungsweise schottischem Räucherlachs, bezogen aus dem Lebensmitteleinzelhandel, isoliert. Die Stämme Iso 11/13, 1B und 3B wurden 2013 und 2014 aus Hackfleisch isoliert. Als Referenzstämmen wurden der Typstamm *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> und der Stamm ATCC 19115 in diese Arbeit aufgenommen. Die Stämme FF 127, FF 141 und ATCC 19115 wurden freundlicherweise von Frau Marija Zunabovic-Pichler von der Universität für Bodenkultur in Wien zur Verfügung gestellt. Bei *P. glucanolyticus* wurden zwei Stämme untersucht. Der Stamm J12 wurde von der Innenwand eines Kühlschranks isoliert. Als Referenzstamm diente der Typstamm DSM 5162<sup>T</sup>.

Im Rahmen der potenziellen Kälteanpassung mittels Carotinoiden wurden jeweils zwei Stämme pro Spezies analysiert. *S. xylosum* Stamm J70 wurde aus der Rohmilch eines Milchsammeltanks (Forschungsgut Frankenforst der Universität Bonn) isoliert. Als Referenzorganismus wurde der Typstamm DSM 20266<sup>T</sup> verwendet. *M. luteus* J3 wurde ebenfalls von der Innenseite eines Kühlschranks isoliert und zusammen mit dem Typstamm DSM 20030<sup>T</sup> als Referenz untersucht.

### 2.1.1.2 Medien und Anzuchtbedingungen

Falls nicht näher spezifiziert, wurden alle genannten Spezies aerob auf Agar-Platten und im Schüttelkolben angezogen. Als Basis-Flüssigmedium wurde das Komplexmedium CASO-Bouillon (Tryptic soy broth; TSB; Merck 105459), bestehend aus Pepton aus Casein (17,0 g/l), Pepton aus Sojamehl (3,0 g/l), D(+)Glucose (2,5 g/l), Natriumchlorid (5,0 g/l) und Di-Kaliumhydrogenphosphat (2,5 g/l) verwendet. Als Basis-Festmedium wurde CASO-Agar (Tryptic soy agar; TSA, Merck 105458), bestehend aus Pepton aus Casein (15,0 g/l), Pepton aus Sojamehl (5,0 g/l), Natriumchlorid (5,0 g/l) und Agar-Agar (15,0 g/l) verwendet. Für die Anzucht der Listerien wurden TSA sowie TSB mit Hefeextrakt (6,0 g/l) supplementiert (→ HTA, HTB).

Die Auswirkung der isoprenoiden Chinone auf die biophysikalischen Parameter der Zellmembranen sollte mit Hilfe von Supplementationsversuchen verifiziert werden. Hierfür sollte zu Beginn der Arbeit die Konzentration der isoprenoiden Chinone in den Zellen erhöht werden um eine potentielle Verbesserung der Kälteanpassung zu detektieren. Dies geschah durch die Zugabe von Phyllochinon (Vitamin K<sub>1</sub>) zu ausgewählten *P. glucanolyticus* und *L. monocytogenes* Stämmen. In diesem Zusammenhang wurde TSB mit einer Vitamin K<sub>1</sub> Konzentration von 100 nmol/ml ( $\cong$  4,5 mg pro 100 ml) supplementiert, wobei verschiedene Ansätze mit und ohne Emulgator gewählt wurden. Als Emulgatoren wurden zwei organische Lösungsmittel verwendet, Ethanol sowie Dimethylsulfoxid (DSMO). In diesem Fall wurde eine 100-fach konzentrierte Stammlösung (4,5 mg/ml) verwendet. Aufgrund der bekannten Auswirkung von Ethanol und DSMO auf Zellmembranen wurden Emulgations-Versuche auch mit Agar-Agar unternommen. TSB wurde mit 0,125 % Agar-Agar autoklaviert und im Anschluss unter Rühren mit 100 nmol/ml Vitamin K<sub>1</sub> versehen. Weitere Emulgator-freie Vorgehensweisen bestanden darin Vitamin K<sub>1</sub> direkt in das sterile Medium beizugeben und unter starkem Schütteln (250 rpm) zu inkubieren, Vitamin K<sub>1</sub> mit dem Medium zu autoklavieren sowie einer Homogenisation von Vitamin K<sub>1</sub> durch eine steril-filtrierte Zugabe (Spritzenvorsatzfilter VWR, Porengröße 0,2  $\mu$ m, Darmstadt, Deutschland).

Eine weitere Möglichkeit zur Modifikation des isoprenoiden Chinongehaltes bestand darin, den entsprechenden Syntheseweg durch die Zugabe von aromatischen Aminosäuren zu inhibieren. Diese Methode wurde von TSUKAMOTO *et al.* (2001) übernommen und bei den *L. monocytogenes* Stämmen DSM 20600<sup>T</sup> und FFH angewandt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Zugabe von aromatischen Aminosäure zu einer Produkt Feedback-Inhibition des Chinon-Grundgerüsts kam, da die beiden Vorläufermoleküle der aromatischen Aminosäuren und des Menachinons über den Shikimat-Weg synthetisiert werden. Für die Menachinon-Inhibitionstests in *L. monocytogenes* wurde die HTB-Bouillon mit den drei aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan (je 180 mg/l) supplementiert (TSUKAMOTO *et al.*, 2001). Als Kontrolle wurde HTB mit nicht aromatischen Aminosäuren L-Alanin, L-Cystein und L-Serin supplementiert (je 180 mg/l). Der pH-Wert der Aminosäuren-supplementierten Anzuchtmedien wurde durch diese Zugabe nicht beeinflusst.

In *S. xylosus* und *M. luteus* wurden zwei verschiedene Supplementationsversuche etabliert. Der erste Ansatz bestand darin die Carotinoidsynthese durch die Zugabe von Diphenylamin (DPA) zu blockieren. HAMMOND & WHITE (1970) stellten fest, dass es in *S. aureus* durch die Zugabe

von DPA zu einer Reduktion der Carotinoidsynthese um 60 bis 90 % kam. Hierfür wurde *S. xylosus* Stamm J70 in TSB mit verschiedenen DPA-Konzentrationen (2  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 37  $\mu\text{M}$ , 74  $\mu\text{M}$ ) supplementiert und angezogen. Die DPA-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM wurde in DMSO gelöst. Eine weitere Methode zur Reduktion des Carotinoidgehaltes wurde der Publikation von FONG *et al.* (2001) entnommen. In dieser Arbeit wurde die Carotinoid-Akkumulation in *Arthrobacter agilis* MB813 als Reaktion auf thermischen- sowie Salzstress untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass es bereits ab einer NaCl-Konzentration von 2 % (w/v) zu einer Reduktion der Carotinoidkonzentration kam. Bei einer Konzentration von 10 % NaCl konnten keine Carotinoide mehr detektiert werden. Folglich wurde im Rahmen der Arbeit die Auswirkung einer 5-%-igen sowie 10-%-igen NaCl-Zugabe zum TSB (Endgehalt entspricht 5,5 % beziehungsweise 10,5 % NaCl) auf beide *S. xylosus* und *M. luteus* Stämme untersucht.

Für die aerobe Anzucht aller Spezies wurden 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml des entsprechenden Flüssigmediums versehen. Die Kulturen wurden in Triplikaten hergestellt, mit 1 % (v/v) einer Übernachtskultur beimpft und agitiert (150 rpm) bei 30 °C und 10 °C bis zur späten exponentiellen Phase ( $\text{OD}_{625\text{nm}} \sim 1$ ) inkubiert. Vorkulturen wurden stets bei 30 °C und 150 rpm geschüttelt angezogen. Aufgrund der großen Temperaturspanne (-2 °C bis 50 °C) bei der *L. monocytogenes* wachsen kann (FARBER & PETERKIN, 1991; KO *et al.*, 1994), wurden die beiden Wachstumstemperaturen auf 37 °C und 6 °C ausgedehnt. Hierdurch sollte die potentielle Fettsäure-unabhängige Anpassung eine stärkere Ausprägung aufweisen. Die Zelldichten wurden bei 625 nm mit einem UV-Vis-Spektrophotometer gemessen (Genesys 10uv Scanning; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Kulturen wurden durch Zentrifugation bei den entsprechenden Wachstumstemperaturen bei Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase (entspricht  $\text{OD}_{625\text{nm}} \sim 1$ ) mit  $12860 \times g$  für 10 min (Eppendorf Tischkühlzentrifuge 5810R, Hamburg, Deutschland) geerntet, und falls nicht anders genannt, zweimal mit vortemperierter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS: 137 mM NaCl, 12 mM  $\text{H}_2\text{HPO}_4^-$ , 2,7 mM KCl, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden Zellen für die nachfolgenden Analysen eingesetzt, unter anderem Fettsäure-, Menachinon- und Carotinoidanalyse sowie für die Membran-Fluiditätsmessung. Zellkolonien wurden auf TSA/HTA-Platten bei 30 °C inkubiert. Die Sterilisation aller aufgeführten Medien erfolgte durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C. Die verschiedenen Supplemente wurden nach dem Autoklaviervorgang, zu bereits abgekühltem Medium sterilfiltriert hinzugegeben.

### 2.1.2 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern

Der Wachstumsverlauf der Flüssigkulturen wurde photometrisch (Genesys 10uv Scanning; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 625 nm gemessen. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Zellfitness beziehungsweise des Anpassungsgrades an niedrige Temperaturen stellt die Wachstumsrate  $\mu$  und die damit verbundene Verdopplungszeit  $t_d$  dar. Hierfür wurde die optische Dichte der Zellsuspensionen über den gesamten Verlauf aufgezeichnet. Über die halb-logarithmische Auftragung der  $OD_{625nm}$  gegen die Zeit ließen sich die einzelnen Wachstumsphasen definieren. Die Wachstumsrate konnte anschließend in der exponentiellen Wachstumsphase anhand der Steigung, die in dieser Auftragung linear verläuft (Formel 1), berechnet werden. Wie in Formel 2 gezeigt, konnte hiermit auch die Verdopplungszeit berechnet werden.

#### Formel 1: Berechnung der Wachstumsrate $\mu$

$$\text{Wachstumsrate } (\mu) = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{(t - t_0)}$$

$N_t$ : Zelldichte ( $OD_{625nm}$ ) zum Zeitpunkt  $t$

$N_0$ : Zelldichte ( $OD_{625nm}$ ) zum Zeitpunkt  $t_0$

$t$ : Zeitpunkt zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase

$t_0$ : Zeitpunkt zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase

#### Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit $t_d$

$$\text{Verdopplungszeit } (t_d) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$\mu$ : Wachstumsrate

### 2.1.3 Gefrier-Auftau-Stresstest

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Kälteanpassung stellt der Gefrier-Auftau-Stresstest dar. Hiermit sollte der Einfluss der vermehrten Einlagerung der untersuchten lipophilen Verbindungen auf die Kälteresistenz der einzelnen Bakterienspezies untersucht werden. Zur Durchführung wurden die Zellkulturen in der späten exponentiellen

Wachstumsphase ( $OD_{625nm} \sim 1$ ) durch Zentrifugation (Abschnitt 2.1.1.2) geerntet, mit steriler Ringer-Lösung (Merck 115525, Darmstadt, Deutschland) zweimal gewaschen und im selben Volumen wieder resuspendiert. Waschschrte sollten die Entfernung potentieller Medieninhaltsstoffe gewährleisten, die einen positiven Einfluss auf die Kälteresistenz haben könnten. Zentrifuge und Ringer-Lösung wurden vor der Anwendung auf die entsprechenden Wachstumstemperaturen vortemperiert. Jeder Stamm wurde drei Gefrier-Auftau-Zyklen (à 24 h) unterzogen. Hierfür wurden für jeden Ansatz Aliquote von  $3 \times 2$  ml der gewaschenen Zellsuspensionen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut und die Lebendzellzahl bestimmt. Die verbleibenden Proben wurden für nachfolgende Gefrier-Auftau-Zyklen wieder eingefroren. Für die Lebendzellzahlbestimmung wurde eine dezimale Verdünnungsreihe (1 ml in 9 ml) mit steriler Ringerlösung bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-8}$  hergestellt. Im Oberflächenverfahren wurden 100  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnungsstufe auf den entsprechenden Nähragar-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 24 h beziehungsweise 48 h für die beiden *P. glucanolyticus* Stämme.

### 2.1.4 Stammlagerung

Eine kurzfristige Lagerung (1 bis 2 Wochen) der verwendeten Stämme erfolgte auf den entsprechenden Agar-Platten bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die langfristige Lagerung erfolgte in Kryomaströhrchen der Firma Mast Group Ltd. (Bootle, Großbritannien), welche bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

## 2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.1 Fettsäureanalyse

Die Bestimmung des Fettsäureprofils erfolgte anhand der sauren Methanolyse von MILLER (1982) und SASSER (1990). Bei dieser Methode werden die Zellen mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln, Säure und hoher Temperatur aufgeschlossen und somit die Lipide zugänglich gemacht. Die Fettsäuren (FS) werden durch Hydrolyse von dem Glycerinrückgrat der (Phospho-)Lipiden getrennt und liegen daraufhin als freie Fettsäureanionen vor. Diese werden wiederum mit Methanol verestert, sodass die gewonnenen Fettsäuremethylester (FAME)

anschließend in der Massenspektrometer-gekoppelten Gaschromatographie analysiert werden können.

Für die FAME-Derivatisierung wurden 50 bis 60 ml der Zellsuspensionen bei  $12860 \times g$  für 10 min bei der entsprechenden Wachstumstemperatur pelletiert und einmal mit vortemperierter Ringerlösung (Merck 115525, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden 50 bis 100 mg Zellpellet in vorgespülte (Hexan/MTBE-Gemisch) Hydrolyseröhrchen überführt. Im ersten Schritt wurde Verseifungsreagenz (15 % NaOH in MeOH/rH<sub>2</sub>O-Gemisch [1:1 v/v]) hinzugegeben und bei 100 °C aufgekocht. Hierdurch wurden die Zellen lysiert und die Fettsäuren abgespalten. Im zweiten Schritt erfolgte die Methylierung bei 80 °C durch Zugabe der Methylierungsreagenz (6,0 N HCl/MeOH-Gemisch [13:11 v/v]). Die Extraktion der gebildeten FAMEs erfolgte durch den Einsatz der apolaren Extraktionsreagenz (Hexan/MTBE-Gemisch [1:1 v/v]). Darauffolgend wurde die wässrige Phase verworfen und das Extrakt mit einer 1,2-%-igen NaOH-Lösung (in rH<sub>2</sub>O) gewaschen. Die aufgereinigten FAMEs wurden in GC-Vials überführt und mit einem Gaschromatographen (Modell 7890A; Agilent Technologies Germany GmbH, Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit einer 5-%-igen Phenylmethylsilikon-Kapillarsäule und einem Massenspektrometer (Modell 5975C; Agilent Technologies Germany GmbH), nach LIPSKI & ALTENDORF (1997) bestimmt. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,2 ml/min verwendet. Fettsäuren wurden mit der ChemStation-Software (Agilent Technologies Germany GmbH) analysiert und anhand ihrer Retentionszeit und ihres Massenspektrums identifiziert. Retentionszeiten wurden anhand eines externen FAME-Standards (MIDI System Calibration Standard Part No. 19298-60500; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) in *equivalent-chain-length* (ECL) Werte konvertiert und mit der internen Datenbank abgeglichen.

Die quantitative FAME-Messung wurde mit Hilfe eines internen Methylnonadecanoat-Standards bewerkstelligt. Da die bestimmte Stoffmenge auf das Zellnaßgewicht bezogen wurde, musste das gewaschene Pellet zuerst von überschüssigem Wasser befreit werden. Hierfür wurden die Pellets auf Filterpapier (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland) überführt, bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet und anschließend mit einer Analysewaage (Sartorius BP 221 S, Göttingen, Deutschland) gewogen. Als interner Standard (ISTD) wurde Methylnonadecanoat von der Firma Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der Standard wurde mit einer Konzentration von  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  in dem Extraktionsreagenz gelöst. Da jeder Probe 1,25 ml Extraktionsreagenz zugegeben wurde,

enthielt jeder Ansatz 625 nmol Methylnonadecanoat. Der Fettsäuregehalt wurde anhand der Formel 3 berechnet.

**Formel 3: Berechnung des Fettsäuregehalts pro g Zellnaßgewicht**

$$\frac{FS(\mu\text{mol})}{Zng(g)} = \frac{625 \text{ nmol} * \sum_{Peaks}}{\text{Fläche}_{ISTD} * Zng(g) * 1000}$$

$\sum_{Peaks}$ : Summe der Peakflächen

$\text{Fläche}_{ISTD}$ : Fläche des verwendeten internen Standards

$Zng(g)$ : Zellnaßgewicht in g

$FS(\mu\text{mol})$ : Stoffmenge der detektierten Fettsäuren in  $\mu\text{mol}$

Sofern es möglich war, wurde die adaptive Reaktion der Fettsäurezusammensetzung auf niedrige Temperaturen als gewichtete mittlere Schmelztemperatur (*weighted average melting temperature*, WAMT; Formel 4) der nachgewiesenen Fettsäuren angegeben. Hierfür wurden Schmelztemperaturen von freien Fettsäuren verwendet, da diese den entsprechenden Lipiden ähnlicher sind als zum Beispiel ihre methylierten Derivate. (KNOTHE & DUNN, 2009; SOHLENKAMP & GEIGER, 2016). Dieser Parameter integriert quantitative Veränderungen aller detektierten Membranfettsäuren und berücksichtigt die individuellen Schmelztemperaturen jeder einzelnen Fettsäure. Die WAMT-Werte sind nicht identisch mit der tatsächlichen Schmelztemperatur der Zytoplasmamembran, die auch von der gesamten polaren Lipidstruktur abhängig ist. Hiermit sollte die Kälteanpassung mittels Fettsäureverschiebung objektiv quantifiziert werden und eine bessere Beurteilung der potentiellen Fettsäure-unabhängigen Adaptation, bedingt durch die untersuchten lipophilen Verbindungen, ermöglicht werden. Die Schmelztemperaturen für alle Fettsäuren werden aus der Publikation von KNOTHE & DUNN (2009) entnommen.

**Formel 4: Berechnung der *weighted average melting temperature* - WAMT**

$$\text{WAMT} = \text{Prozentsatz}(FS_1) * T_m(FS_1) + \text{Prozentsatz}(FS_2) * T_m(FS_2) + \dots + \text{Prozentsatz}(FA_n) * T_m(FA_n)$$

$FS_1$  bis  $FS_n$ : Alle detektierten Fettsäuren eines Fettsäureprofils

$\text{Prozentsatz}(FA_n)$ : Prozentsatz der einzelnen Fettsäuren

$T_m(FS_n)$ : die Schmelztemperatur der entsprechenden Fettsäure

### 2.2.2 Isoprenoid-Chinonanalyse

Chinonanalen wurden qualitativ sowie quantitativ für alle untersuchten Stämme durchgeführt. Die Extraktion und Aufreinigung der Chinone erfolgte nach den modifizierten Methoden von HIRASHI *et al.* (1996) und HU *et al.* (1999). Diese Methoden basieren auf einer Methanol-Chloroform-Extraktion der lipophilen Membranbestandteile. Das Extrakt wird anschließend über *solid phase extraction*-Säulchen (SPE-Säulchen) aufgereinigt. Die Trennung erfolgt anhand der Polarität der Moleküle. Alle verwendeten organischen Lösungsmittel besaßen einen HPLC-Reinheitsgrad. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der zu untersuchenden Chinone wurden die Probengefäße abgedeckt und die Arbeit unter starker Lichteinstrahlung minimiert.

Bei Erreichen der Ziel-OD wurden die Zellkulturen durch Zentrifugation ( $12860 \times g$  für 10 min) geerntet und zweimal mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen. Zur Minimierung der Varianz bei der Gehaltsbestimmung wurden die Zellpellets auf Filterpapier (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland) transferiert und für 10 min getrocknet. Um eine vollständige Chinonextraktion zu gewährleisten wurden  $20 \text{ mg}_{\text{Zellnaßgewicht}}$  bis maximal  $100 \text{ mg}_{\text{Zellnaßgewicht}}$  der Zellen in 50 ml Hydrolyseröhrchen überführt. Die Massebestimmung erfolgte mit Hilfe einer Analysewaage (Sartorius BP 221 S, Göttingen, Deutschland). Höhere Biomassen hatten eine stark verringerte Wiederfindungsrate und erhöhte Varianzen zur Folge. Die überführten Zellpellets wurden im nächsten Schritt in 3 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (48 mM, pH 7,4) vollständig resuspendiert. Anschließend wurden 9 ml Methanol und 5 ml Chloroform mit  $6,55 \text{ nmol}$  Vitamin  $\text{K}_1$  (Sigma-Aldrich 95271, Darmstadt, Deutschland) als interner Standard hinzugegeben und für 30 min im Überkopf-Mischer geschüttelt. Danach wurden 5 ml Reinstwasser ( $\text{rH}_2\text{O}$ ) und 5 ml Chloroform zugegeben und bei  $1160 \times g$  für 5 min bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Chloroform-Extraktion wurde zweimal mit je 10 ml wiederholt. Die organischen Phasen wurden zusammengeführt und mit einem Rotationsvakuumverdampfer (CVC 3000 vakuubrand, IKA RV 10 digital, IKA HB 10 digital; IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) bei 200 mbar und  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Trockene eingengt.

Die Rückstände wurden in 5 ml Hexan gelöst, auf 1 ml Probenvolumen aufkonzentriert und mittels Festphasenextraktion aufgereinigt (Biotage 1 g 6 ml; Uppsala, Schweden). Die Elution der Chinone erfolgte mit 20 ml eines Hexan-Diethylether-Gemisches. Dabei wird ein Hexan-



Diethylether-Verhältnis von 98:2 (v/v) für Menachinone und ein Verhältnis von 90:10 (v/v) für Ubichinone verwendet. Die gesammelten Eluate wurden vollständig eingedampft und in 1 ml Methanol unter mehrmaligem schwenken aufgenommen. Die Chinonextrakte wurden auf einer Agilent 1260 HPLC-Serie mit Quat Pump, Autosampler, Diodenarray-Detektor und einem thermostatisierten Säulenfach analysiert. Die HPLC-Durchflussrate betrug 1 ml/min. Als mobile Phase wurde ein isokratisches Methanol-Isopropylether-Gemisch (9:2 v/v) verwendet. Die Verbindungen wurden auf einer Umkehrphasen-Säule (ODS Hypersile RP18, Thermo Fisher, USA) isotherm bei 30 °C getrennt und die Absorption bei 270 nm und 275 nm detektiert. Die HPLC-Daten wurden mit der ChemStation-Software (HP, Böblingen, Deutschland) ausgewertet. Die Chinone wurden anhand ihres Absorptionsspektrums und ihrer Retentionszeit identifiziert. Hierfür wurden Referenzchinone aus verschiedenen Typstämmen mit bekannten Chinonmustern verwendet. Die Chinon-Konzentration wurde mit dem internen Vitamin K<sub>1</sub>-Standard berechnet (Formel 5). Die Probenlagerung erfolgte im Dunkeln bei -20 °C.

#### Formel 5: Berechnung der Menachinonkonzentration

$$\text{Chinongehalt} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{g}_{\text{ZNG}}} \right) = \frac{\text{Fläche}_{\text{Probe}} * \text{ISTD} * IV_{\text{ISTD}}}{\text{Fläche}_{\text{ISTD}} * \text{ZNG} * IV_{\text{Probe}}}$$

*Fläche<sub>Probe</sub>*: Summe der integrierten Probenfläche

*Fläche<sub>ISTD</sub>*: Fläche des internen Standards

*ISTD*: Stoffmenge des internen Standards (nmol)

*IV*: Injektionsvolumen (ml)

*ZNG*: Zellnaßgewicht (g)

### 2.2.3 Carotinoidanalyse

Carotinoide bildeten die zweite Stoffgruppe, die im Rahmen dieser Arbeit als potentielle Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation untersucht wurde. Dabei handelt es sich ebenfalls um lipophile Moleküle, die aus Isopren-Einheiten aufgebaut sind, aber in einer hohen Variation an verschiedenen Modifikationen vorkommen (Abschnitt 1.3.2). Aufgrund der starken Wechselwirkung der eingelagerten Carotinoide und der Zellmembran stellte sich die vollständige Extraktion als fordernd dar. Das zeigt sich auch in der Literatur, in der häufig

mehrere Zellaufschlussmethoden und Extraktionsmethoden kombiniert werden, um eine vollständige Carotinoideextraktion gewährleisten zu können (KAISER *et al.*, 2007; REZWAN *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit beschriebene Methode basiert auf den Publikationen von KAISER *et al.* (2007) und REZWAN *et al.* (2007) und wurden im Rahmen eines Laborblocks und einer Abschlussarbeit (BAUST, 2017) modifiziert und weiterentwickelt. Dabei wurde das Ziel der vollständigen Carotinoideextraktion für die verwendeten Bakterienspezies erreicht.

Die Carotinoideanalyse wurde bei den pigmentierten Stämmen *S. xylosus* DSM 20266<sup>T</sup> und J70 sowie den Stämmen *M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup> und J3 durchgeführt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie bereits unter Abschnitt 2.1.1.2 beschrieben. Abweichend dazu wurden die Zentrifugationsschritte bei 4 °C durchgeführt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Licht- sowie Temperatur-empfindlichen Carotinoide während der weiteren Extraktionsschritte ausreichend gekühlt sind und somit Abbau- und *cis*-Isomerisierungsprozesse der extrahierten Carotinoide möglichst minimiert werden. Es wurden 100 ml Zellsuspension in zwei Schritten in sterilen 50 ml Zentrifugenbechern geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -80 °C für mindestens 15 Minuten eingefroren. Bei diesem Schritt konnten die Zellen bei -80 °C auch zwischengelagert werden. Nach vollständiger Gefrierung der Zellpellets wurden die Proben für die Lyophilisation vorbereitet. Der Gefriertrocknungsprozess wurde über Nacht für mindestens 16 h in einer Christ Alpha 1-2 LD Gefriertrocknungsanlage durchgeführt (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Deutschland). Hierfür wurde ein Vakuum von 0,53 mbar mit Hilfe einer Vakuumpumpe eingestellt (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland).

Die gefriergetrockneten Zellen stellten das Ausgangsmaterial für die Carotinoideextraktion dar. Um diese vollständig zu extrahieren, wurden mehrere enzymatische sowie mechanische Zellaufschlussmethoden kombiniert. Aus diesem Grund wurden maximal 35 mg der lyophilisierten Zellen verwendet, um eine vollständige Extraktion aus der gewonnenen Zelltrockenmasse zu erreichen. Diese wurden mit Hilfe einer Analysenwaage (Sartorius BP 221 S, Göttingen, Deutschland) abgewogen und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Für den enzymatischen Zellaufschluss wurden die Zellen vollständig in 1,2 ml eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 12 mM H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 2,7 mM KCl, pH 7,4) resuspendiert und nach der Zugabe von 200 µl Lipaselösung und 200 µl Lysozymlösung für 10 s gevortext. Aufgrund der Lysozymresistenz von Staphylokokken wurde bei der Extraktion von *S. xylosus* statt Lysozym Lysostaphin verwendet. Alle Enzymlösungen wurden frisch am Tag der Verwendung hergestellt in den

Konzentrationen von 400 kU/200  $\mu$ l Lysozym, 2,7 kU/200  $\mu$ l Lysostaphin und 2 U/200  $\mu$ l Lipase. Der enzymatische Zellaufschluss erfolgte im Dunkeln in einem Schüttelinkubator bei 37 °C, 250 rpm für 2 h. Abweichend zu der Methode von KAISER *et al.* (2007) wurde die Inkubationszeit mit 2 h deutlich geringer gewählt. Vorläufige Tests mit längeren Inkubationszeiten von 10 h und mehr führten zu einem deutlichen Anstieg an *cis*-Isomeren. Nachfolgend wurde ein kombinierter mechanischer Zellaufschluss, bestehend aus Gefrier-Auftau-Zyklen und einer Ultraschallbadbehandlung, durchgeführt. Im Einzelnen wurden die Proben jeweils dreimal bei -80 °C (5 bis 10 min) eingefroren, dann im Wasserbad (Julabo MP-BRÜ/PU, Seelbach, Deutschland) bei 30 °C aufgetaut und anschließend für 3 min im Ultraschallbad (Sonorex, BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland) behandelt. Um eine weitere Erwärmung der Zellen aufgrund der auftretenden Prozess-Wärmeentwicklung während des Ultraschallbades zu verhindern, wurden die Ultraschallbehandlungen in Eiswasser durchgeführt.

Nach dem Zellaufschluss wurden die polaren Carotinoide durch die Zugabe von 400  $\mu$ l eiskalter, gesättigter Zinkacetatlösung komplexiert und gefällt. Diese Xanthophylle, insbesondere Xanthophyllproteine und -glycoside, verbleiben ansonsten in der wässrigen Phase und sind ohne diesen Zwischenschritt nicht verlustfrei zu extrahieren (KORONELLI *et al.*, 1987; DEMBITSKY, 2005). Zelltrümmer sowie gefällte Xanthophylle wurden nachfolgend bei 4 °C und 18500  $\times$  g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig und vollständig entfernt. Die Pellets wurden in 1,6 ml Methanol/0,05%-Butylhydroxytoluol (BHT)-stabilisiertem-Chloroform (7:3 v/v) resuspendiert und gevortext. Wurde hierdurch keine vollständige Suspension der Pellets erreicht, so wurde mit Hilfe eines Metallspachtels die Resuspension mechanisch unterstützt. Nach der Zentrifugation bei 18500  $\times$  g für 3 min bei 4 °C wurde die obere Phase in 50 ml Hydrolyseröhrchen überführt und gesammelt. Dieser Schritt wurde wiederholt bis die Pellets und die Überstände nicht mehr gefärbt waren. Ab diesem Punkt, bei dem die rohen Carotinoide extrahiert vorlagen, war strikter Lichtschutz der Proben geboten und gegeben. Mit der Zugabe von 8 ml eiskalter 10%-iger NaCl-Lösung wurden die Rohextrakte gewaschen. Hierzu wurden die Proben gevortext und für eine vollständige Phasentrennung zentrifugiert (3200  $\times$  g, 4 °C, 10 min). Die untere organische Phase wurde mit Glaspipetten solange abgenommen und in Spitzkolben (Braunglas) gesammelt, bis diese klar und ungefärbt war. Hierfür wurden die Probenreste wieder mit 2 ml BHT-stabilisiertem-Chloroform (0,05 %) gemischt und erneut zentrifugiert. Die gesammelten Carotinoide extrakte wurden unter einem Stickstoffstrom zur vollständigen Trockene eingengt. Dies stellte sich als die schonendere

## 2 Material und Methoden

---

Alternative zum Rotationsverdampfer dar, bei dem die Wärme des Wasserbades sich negativ auf die Carotinoidhaltbarkeit auswirkte. Die Rückstände wurden in 1 ml Methanol/Chloroform-Gemisch (1/1 v/v) gelöst und durch einen PTFE-Spritzenaufsatzfilter mit 13 mm Durchmesser und einer Porengröße von 0,2 µm (VWR international, Darmstadt, Deutschland) in Glas-Vials filtriert. Die Proben wurden in der Regel sofort im Anschluss in der HPLC gemessen. Bei einer zwischenzeitlichen Lagerung wurden die Proben bei -20 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Analyse der aufgereinigten Carotinoidproben erfolgte intern an der Arbeitsgruppen-eigenen HPLC mit einer RP-18-Säule. In Kooperation mit dem Institut für Lebensmitteltechnologie in Bonn konnten weitere (U)HPLCs, ausgestattet mit einer Carotinoid-spezifischen C30-Säule, genutzt werden.

Arbeitsgruppen intern erfolgte die Analyse mit dem Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-System Infinity 1260 von Agilent Technologies (Ratingen, Deutschland). Bei der verwendeten Software handelte es sich um die Agilent Technologies eigenen OpenLab CDS ChemStation-Edition Software (Rev. C01.07). Die chromatographische Auftrennung erfolgte in Kombination aus einer Hypersile ODS C18-Vorsäule (4,0 x 250 mm, 5,0 µm; Thermo Fisher Scientific; Wesel, Deutschland) und einer Poroshell 120 EC C18-Säule (4,6 x 50 mm, 2,7 µm; Agilent Technologies). Die Säulen wurden während der Analyse auf 10 °C gekühlt. Die Proben wurden lichtgeschützt im Autosampler aufbewahrt und auf 4 °C temperiert. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten, der der Tabelle 3 entnommen werden kann. Als Flussmittel wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch (98:2 v/v), versehen mit 50 mM Ammoniumacetat, und Methyl-tert-Butylether (MTBE) verwendet. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min.

**Tabelle 3: Gradient für die Carotinoidauftrennung an einer C18-RP-Säule.** Eluent A = Methanol/Wasser-Gemisch versehen mit 50 mM Ammoniumacetat. Eluent B = MTBE. Flussrate = 0,8 ml/min.

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	0
13	43	57
15	90	10
18	90	10
23	100	0
25	0	100
32	System auf Stand-by	

Proben sowie der externe Standard wurden mit einem Injektionsvolumen 50 µl in das System eingebracht. Als externer Standard wurde β-Carotin, Reinheitsgrad > 95 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA,) mit einer Konzentration von 67 µM (± 36 µg/ml) verwendet. Die Absorption der zu messenden Carotinoide wurde mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestimmt. Das UV/Vis-Spektrum wurde von 200 nm bis 700 nm (2,0 nm Schritte) aufgezeichnet. Die Integration der Peaks erfolgte anhand der Absorption bei 450 nm (bandwidth = 4 nm). Aufgrund der begrenzten Auftrennungsleistung der C18-Säule wurden bei manchen Proben die Peaks manuell integriert. In der Regel wurde die automatische Integration der Software verwendet. Der Carotinoidgehalt wurde auf das zuvor gemessene Zellrockengewicht bezogen und anhand der Formel 6 berechnet.

**Formel 6: Berechnung der Carotinoid-Konzentration:**

$$\text{Carotinodgehalt} = \frac{\text{Fläche}_{\text{Probe}} * \text{ESTD} * \text{IV}_{\text{ESTD}}}{\text{Fläche}_{\text{ESTD}} * \text{ZTG} * \text{IV}_{\text{Probe}}}$$

*Fläche<sub>Probe</sub>*: Summe der integrierten Probenflächen

*Fläche<sub>ESTD</sub>*: Fläche des externen Standards

*ESTD*: Masse des externen Standards (µg)

*IV*: Injektionsvolumen (ml)

*ZTG*: Zellrockengewicht (g)

Die Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmitteltechnologie in Bonn bot weiterhin die Möglichkeit die Carotinoidproben mit einem Ultra-HPLC-System samt Carotinoid-spezifischer C30-Säule analysieren zu können. Jedoch waren die verwendeten Säulen, bedingt durch eine zu große Porengröße der Säulen, nicht für den Ultra-HPLC Bereich spezifiziert, sodass es sich technisch um eine normale HPLC-Messung handelte. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass neben dem einzelnen Diodenarray-Detektor ein Massenspektrometer als Detektor verwendet werden konnte. Bei diesem LC-MS-System ließen sich anhand der Massen die untersuchten Carotinoide identifizieren. Das Prominence UHPLC-System stammt von der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) und setzte sich aus einer Nexera X2 LC-30AD High-Pressure Gradientenpumpe samt DGU-20A5R Degasser, einem Nexera SIL-30AC Autosampler, einem CTO-20AC Säulenofen und einem SPD-M20A Diodenarray-Detektor zusammen. Für die Massenspektrometrie wurde das Acquity UHPLC-System von der Firma Waters GmbH

## 2 Material und Methoden

(Eschborn, Deutschland) verwendet. Die einzelnen Komponenten waren eine Binäre-Lösungsmittelpumpe, ein Samplemanager, ein Säulenofen und ein Diodenarray-Detektor sowie der LTQ XL *linear ion trap* Massenspektrometer.

Für den Transport wurden die Proben unter einem Stickstoffstrom bis zur vollständigen Trockene eingengt und bei -80 °C gelagert. Für die Analysen wurden die Proben kurzfristig in 1 ml Methanol/MTBE-Gemisch (1:1 v/v) mit 0,1 % BHT stabilisiert, gelöst. Der Autosampler wurde auf 15 °C und der Säulenofen auf 25 °C temperiert. In den beiden formalen UHPLC-Systemen wurde eine Kombination aus einer Vorsäule Accucore™ C30 (10 x 2,1 mm, 2,6 µm; Thermo Fisher Scientific) und der Accucore™ C30 Säule (150 x 2,1 mm, 2,6 µm; Thermo Fisher Scientific) installiert. Als externer Standard wurde ebenfalls β-Carotin (Extrasynthese, Lyon, Frankreich), mit einem Reinheitsgrad > 99 %, für die quantitative sowie qualitative Analyse verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten aus Methanol, Wasser und MTBE und einer Flussrate von 0,4 ml/min (Tab. 4).

**Tabelle 4: Gradientenverlauf der C30-HPLC-Systeme.** Eluent A = 85:5:10 Methanol-Wasser-MTBE-Gemisch (v/v/v). Eluent B = 11:85:4 Methanol-Wasser-MTBE-Gemisch (v/v/v). Die Flussrate betrug 0,4 ml/min.

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	80	20
1	65	35
3	65	35
7,5	57	43
12	52,7	47,3
13	0	100
15	0	100
16	80	20
18	System auf Stand-by	

Die Identifikation der Carotinoide erfolgte anhand ihrer Retentionszeiten, ihrem Absorptionsspektrum und den detektierten Massezahlen der Massenspektroskopie. Aufgrund der großen Variabilität von Carotinoiden war die Massenspektroskopie (MS) die einzige sichere Methode zur korrekten Identifikation der Verbindungen. Allein anhand der Retentionszeiten und der Absorptionsspektren konnte nur eine putative, vorläufige und grobe Einteilung der detektierten Carotinoide vorgenommen werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von

Carotinoiden, wurde mit der atmosphärischen chemischen Ionisation (APCI) eine schonende Ionisierungsmethode verwendet, bei der eine geringe thermische Spaltung des Analyten auftritt. Die massenspektrometrische Bestimmung erfolgt anhand der spezifischen Ladungs-Masse-Verhältnisse ( $m/z$ ). Die Messung wurde in diesem Fall in einem Bereich von  $m/z$  100 bis 1200 durchgeführt. Die hierfür verwendete Software war Xcalibur 2.2 SP1.48 von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland). Die eingestellten Parameter des Massenspektrometers sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

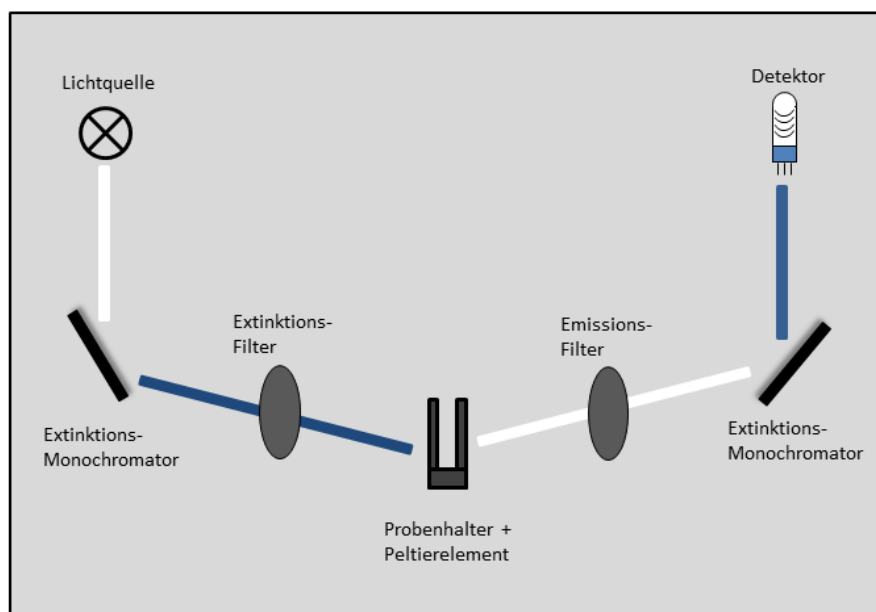
**Tabelle 5: Einstellungen des HPLC-Massenspektrometers.**

Parameter	Soll-Wert
Ionisationsquelle	APCI
Kollisionsgas	Helium
Kapillartemperatur	275 °C
APCI-Verneblertemperatur	400 °C
Mantelgas Flussrate	30
Aux-Gas Flussrate	5
Sweep-Gas Flussrate	5
Polarität	Positiv
Quellenspannung	6 kV
Quellenstromfluss	5 $\mu$ A
Kapillarspannung	15 V
Röhrenlinse	65 V

### 2.3 Sonden-abhängige Fluoreszenzmessungen

Mit Hilfe von Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen wurden die Membranparameter, Membranordnung sowie Membranfluidität gemessen. Somit konnte eine Beurteilung der Kälteadaptation mittels Fettsäure-unabhängiger lipophiler Moleküle auf Membranebene vorgenommen werden. Bei der Fluoreszenzmessung handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren, das zum Beispiel einen höheren Informationsgehalt bietet als DSC-Messungen. Einen weiteren Vorteil bilden die einfache Handhabung, im Vergleich zu NMR und ESR-Messungen, sowie die Stabilität der Sonden und ihre geringe Umweltgefährdung (BORENSTAIN & BARENHOLZ, 1993). Allerdings ist der größte Nutzen, dass bei dieser Methode ganze lebende Zellen bei verschiedenen Bedingungen gemessen werden können (DENICH, 2003). Durch die

Verwendung von zwei verschiedenen Sonden und Messverfahren konnten zwei unterschiedliche biophysikalische Parameter der Zellmembran bestimmt werden. Wie HARRIS *et al.* (2002) gezeigt haben, stellt die Generalisierte Polarisation (GP) eine Methode dar, bei der primär die Membranordnung detektiert wird. Je nach Zusammensetzung der Membran zeigt sich keine direkte Korrelation von Membranordnung und Membranfluidität, sodass trotz einer hohen Membranordnung eine hohe Fluidität vorliegen kann (Abschnitt 1.2). Deshalb wurde eine weitere Fluoreszenzmessung angewandt. Die Anisotropiemessung erlaubt eine direkte Messung der Beweglichkeit der umliegenden Lipide, die wiederum direkt mit der lateralen Diffusionsrate der angrenzenden Lipide und somit mit der Membranfluidität korreliert. Eine Grundvoraussetzung für diese Sonden-abhängigen Membranmessungen stellt ein ausreichend sensitives Fluoreszenzspektrometer dar. In dieser Arbeit wurde das Fluoreszenzspektrometer LS-55B der Firma PerkinElmer LAS GmbH (Rodgau, Deutschland) verwendet. Der schematische Aufbau der Fluoreszenzmessung ist in der Abbildung 7 dargestellt. Bis zur Messung wurden die Proben bei der entsprechenden Wachstumstemperatur in mobilen Temperierboxen Waeco TropiCool TC-14FL-AC (Emsdetten, Deutschland) aufbewahrt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Fluoreszenzphotometers und des Lichtweges.** Lichtquelle stellt eine Xenon-Bogen-Lampe dar. Die beiden Extinktions- und Emissionsfilterräder in denen unter anderem vertikale und horizontale Polarisationsfilter enthalten sind. Der Detektor besteht aus Photomultiplikatorröhren. Die Monochromatoren lassen dabei nur einen eingestellten Wellenlängenbereich durch. Verdeutlicht durch die verschieden farbigen Strahlengänge.



Die Anregung der Sonde erfolgt über eine hoch energiereiche UV-Strahlung, die von einer Xenon-Bogen-Lampe erzeugt wird. Der Extinktions-Monochromator filtert die ungewünschten Wellenlängen heraus, sodass die Probe nur mit der eingestellten Wellenlänge angeregt wird. Zwischen Extinktions-Monochromator und der Probe befindet sich das Extinktions-Filterrad. Dieses enthält einen Polarisationsfilter, der das anregende Licht polarisiert und anschließend das Licht entweder vertikal oder horizontal zur Probe durchlässt. Von hier aus trifft das Licht auf den Peltier-temperierten Probenhalter. Die Probe befindet sich in einer UV durchlässigen Quatzküvette (101-10-40, Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland) mit einer Kantenlänge von 1 cm. Das Probenvolumen betrug 2 ml. Nach der Anregung wird das emittierte Licht im 90° Winkel durch den Emissionsfilter, bei dem ebenfalls vertikale und horizontale Polarisationsfilter vorhanden sind, zum Emissions-Monochromator gebündelt. An diesem wird potenzielles Streulicht gefiltert, bevor das emittierte Licht auf den Detektor trifft. Bei dem Detektor handelt es sich um einen Photomultiplikator.

Zwei verschiedene Sonden wurden verwendet, um die unterschiedlichen bio-physikalischen Eigenschaften von Biomembranen zu messen. Laurdans (1-(6-(Dimethylamino)-2-naphthalyl)-1-dodecanon) generalisierte Polarisation (GP) wurde zur Bestimmung der Membranordnung verwendet. TMA-DPH (1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien p-Toluolsulfonat) Anisotropie zur Messung der Motilität der Lipidmoleküle (HARRIS *et al.*, 2002). Für jede Spezies und Sonde wurden Kalibrierkurven mit verschiedenen Konzentrationen im Vorfeld erstellt, um Artefaktbildung, wie zum Beispiel Sonden-Sonden-Interaktionen zu vermeiden.

### 2.3.1 Generalisierte Polarisation

Die generalisierte Polarisation wurde mit der Fluoreszenzsonde Laurdan gemessen. Diese Sonde detektiert Änderungen der Membranphase aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber polaren Verbindungen wie etwa H<sub>2</sub>O in ihrer Umgebung (Abschnitt 1.4). Die Änderung im Emissionsspektrum wird anhand der generalisierten Polarisation berechnet. Mit dieser Methode wird primär der Ordnungsgrad der Membranlipide gemessen.

Messungen zur generalisierten Polarisation wurden mit gepulster Xenonlampe, Anregungs- und Emissionsmonochromatoren durchgeführt. Die Proben temperatur wurde mit einem

Peltierelement PTP-1 (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland) geregelt. Für Laurdan-Messungen wurden gewaschene Zellen in 48 mM  $K_2HPO_4$  (pH 7,4) Puffer suspendiert und auf eine  $OD_{625\text{ nm}} 0,2$  verdünnt. Wie bei MOLINA-HÖPPNER *et al.* (2004) beschrieben, wurde eine Laurdan-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mM in Ethanol hergestellt und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Die Färbung der Zellen erfolgte bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  für 30 min bei 30 °C im Dunkeln. Die markierten Zellen wurden zweimal mit partikelfreiem und der Wachstumstemperatur entsprechend vortemperiertem  $K_2HPO_4$ -Puffer, durch Zentrifugation bei  $2060 \times g$  und der entsprechenden Temperatur für 10 min, gewaschen. Zur Bestimmung der Blindwerte wurden nicht gefärbte Zellen verwendet. 2 ml Zellsuspension wurden in eine 3500  $\mu\text{l}$  Quarzküvette (101-10-40, Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland) überführt. Für die Laurdanmessung wurden Emissionsspektren von 380 nm bis 600 nm (Spaltbreite des Emissionsmonochromators = 3,0 nm) bei den gegebenen Temperaturen aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 360 nm (Spaltbreite des Extinktionsmonochromators = 10,0 nm). Die GP-Werte wurden mit den Emissionswerten bei 435 nm und 500 nm, bei denen die Blindwerte der nicht markierten Zellen subtrahiert worden sind, berechnet (HARRIS *et al.*, 2002; Formel 7).

### Formel 7: Berechnung der Generalisierten Polarisation:

$$GP = \frac{I_{435} - I_{500}}{I_{435} + I_{500}}$$

$I_{435}$ : Emissionsintensität bei der Wellenlänge von 435 nm

$I_{500}$ : Emissionsintensität bei der Wellenlänge von 500 nm

### 2.3.2 Anisotropie

Die Anisotropie wurde mit der Sonde TMA-DPH (1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien p-Toluolsulfonat) gemessen. Mit dieser Sonde konnte ein weiterer physikalischer Membranparameter, die Motilität der Lipidmoleküle, gemessen werden (HARRIS *et al.*, 2002). Die grundlegende Messmechanik besteht darin, dass frei bewegliche Fluorophore in der Lage sind polarisiertes Licht durch ihren eigenen Drehimpuls zu beeinflussen (Abschnitt 1.4). Zur normierten Berechnung dieser Polarisationsänderung wird die Anisotropie verwendet

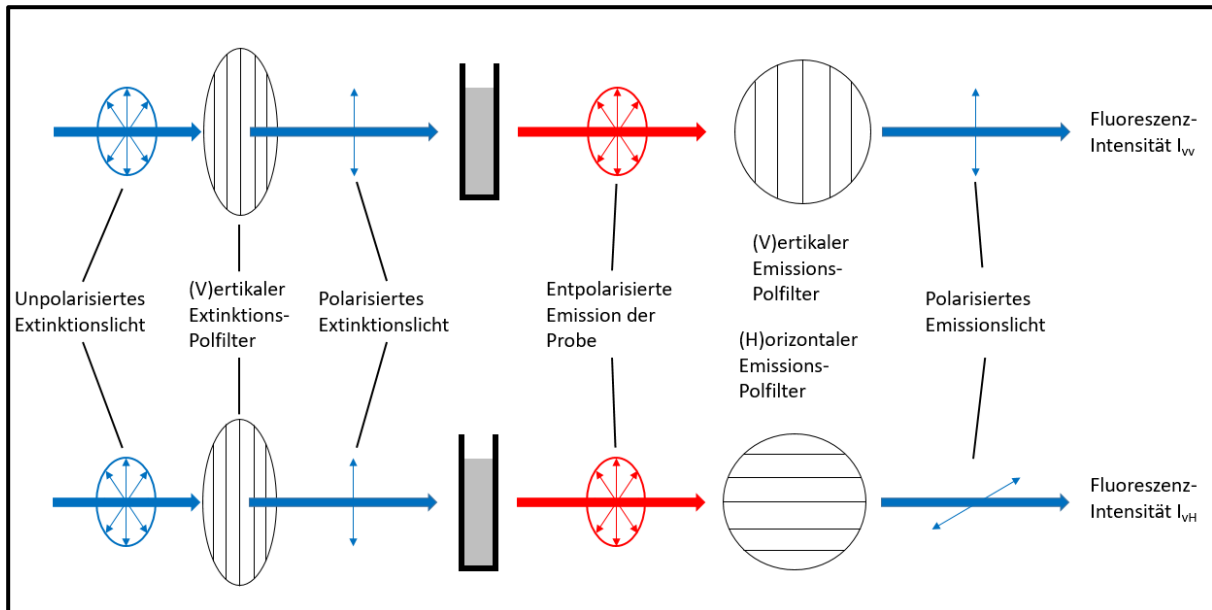
(Abb. 8). Aufgrund der Diskriminierung des Detektors zwischen vertikal und horizontal polarisiertem Licht wird ein Gewichtungsfaktor, der Geräte- oder kurz G-Faktor, bestimmt.

Die TMA-DPH Inkorporation erfolgte analog zur Laurdan-Färbung. Dabei wurden modifizierte Ansätze, wie bereits von USUI *et al.* (2012) und ABE & HIRAKI (2009) beschrieben, angewandt. Die Anisotropiemessungen bei den Aminosäuren-supplementierten *Listeria*-Stämmen wurden in KCl-Lösung (pH 7,0) anstelle von Phosphatpuffer durchgeführt. Hierdurch kam es zu einer Verschiebung der gemessenen Anisotropie-Werte an der y-Achse. Folglich unterschieden sich zwar die absoluten Zahlenwerte zwischen den beiden verwendeten Puffern, jedoch war der Kurvenverlauf, also die Änderung der Membranfluidität über die gemessene Temperaturspanne, gleich. Die TMA-DPH-Stammlösung wurde in DMSO mit einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  hergestellt. Die Zellen wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$  TMA-DPH für 10 min bei 30 °C im Dunkeln gefärbt und zweimal gewaschen. Bei Carotinoid-haltigen Zellen verschlechterte sich mit diesem Protokoll die Emissionsintensität der Sonde. Folglich kam es aufgrund der niedrigen Intensitäten zu einer schlechten Signal-to-Noise Ratio und stark variierenden Messwerten. In diesem Fall erfolgte die Inkorporation bei 30 °C im Dunkeln für mindestens 30 min. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge betrug 355 nm beziehungsweise 425 nm. Die Anisotropiewerte wurden aus den polarisierten Intensitäten mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet (Formel 8),

**Formel 8: Berechnung der Anisotropie:**

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

wobei I die Fluoreszenzintensität darstellt, von der die Blindwerte der nicht markierten Zellen subtrahiert worden sind. G steht für den G-Faktor, berechnet aus dem Verhältnis von  $I_{HV}/I_{HH}$ . Die Indices H (horizontal) und V (vertikal) zeigen die Polarisatorpositionen für das angeregte und das emittierte Licht an. Jeder Datenpunkt wurde aus 10 bis 20 Einzelmessungen berechnet. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichungen von den unabhängigen biologischen Triplikaten dargestellt.



**Abbildung 8: Schema der Fluoreszenz-Anisotropie Messung.** Die Probe wird im  $45^\circ$  Winkel mit vertikal polarisiertem Licht angeregt. Die Emission erfolgt ebenfalls im  $45^\circ$  Winkel wobei abwechselnd die Intensität, durch Änderung des Emissionsfilterrades, entweder vertikal oder horizontal gemessen wird. Aufgrund der Diskriminierung des horizontal polarisiertem Licht durch den Detektor, erfolgt eine Bestimmung des Geräte-Faktors. Hierbei wird anstatt vertikal polarisiertem Lichts horizontal polarisiertes Licht mit Hilfe des Extinktionsfilterrades auf die Probe gelenkt.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren, DNA sowie RNA, wurde photometrisch mit dem Plattenlesegerät Epoch der Firma BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland) und dem entsprechenden Mikro-Volumen-Einsatz Take3 (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Für die Messung wurden die Spots des Take3-Einsatzes mit  $2 \mu\text{l}$  der Probelösungen versehen. Die Proben wurden im Doppeltansatz gemessen. Als Leerwert wurde  $\text{rH}_2\text{O}$  oder der entsprechende Elutionspuffer verwendet. Der Leerwert wurde im Vierfachansatz aufgetragen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die zugehörige Software Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland). Hierbei konnten auch die zu messenden Nukleinsäuren eingestellt werden. Es wurden die Absorptionen bei  $260 \text{ nm}$  (für Nukleinsäuren) und  $280 \text{ nm}$  (für aromatische Aminosäuren) von der Software gemessen. Hierdurch konnte nicht nur die Konzentration der Nukleinsäuren, sondern auch ihr Reinheitsgrad bestimmt werden.

### 2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Nachweise und eine *L. monocytogenes* Serovarbestimmung verwendet. Bei dieser molekularbiologischen Methode zur *in vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente, handelt es sich um eine grundlegende Methode, die die verschiedensten Arbeiten mit Nukleinsäuren ermöglicht (MULLIS *et al.*, 1986).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Polymerasen für die Amplifikation verwendet. Die routinemäßige Amplifikation erfolgte mit der VWR® *Taq* DNA-Polymerase. Hierbei sollte die Anlagerungstemperatur 3-5 °C unterhalb der Schmelztemperatur liegen. Die optimale Aktivität der *Taq*-Polymerase ist bei 72 °C gegeben, wobei eine Geschwindigkeit von 1000 bp min<sup>-1</sup> erreicht wird. Für möglichst fehlerfreie Amplifikationen wurde eine Polymerase mit 3'-5'-*proof reading*-Exonukleaseaktivität verwendet. Diese Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEW ENGLAND BioLabs (NEB) GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) zeichnet sich durch eine stark verringerte Fehleranfälligkeit aus, die ungefähr 280-mal geringer ist als bei der *Taq*-Polymerase. Die Annealingtemperatur sollte in der Regel 1 °C höher als die niedrigste Primer-Schmelztemperatur gewählt werden. Die optimale Aktivität liegt ebenfalls bei 72 °C, wobei eine Geschwindigkeit von 3000 bp min<sup>-1</sup> erreicht wird. Für die Amplifikation wurde der Mastercycler epgradient der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet.

#### 2.4.2.1 Multiplex-PCR zur Bestimmung von *L. monocytogenes* Serovargruppen (DOUMITH *et al.*, 2004a)

Die Differenzierung der *L. monocytogenes* Stämme anhand ihrer Serovare erfolgte mit Hilfe einer veröffentlichten Multiplex-PCR Methode von DOUMITH *et al.* (2004a). Im Fall der hier verwendeten *L. monocytogenes* Serovarbestimmung werden fünf verschiedene Gene amplifiziert. Hierbei werden nicht die einzelnen Serovare bestimmt. Je nach Kombination der amplifizierten Gene werden die *L. monocytogenes* Stämme fünf verschiedenen Serovargruppen zugeordnet: I.1 (1/2a-3a), I.2 (1/2c-3c), II.1 (4b-4d-4e), II.2 (1/2b-3b-7), III (4a-4c). Diese korrelieren mit den fünf phylogenetischen Gruppen (DOUMITH *et al.*, 2004b), die weiterhin aus den drei *L. monocytogenes* Linien, basierend auf variablen Genomabschnitten, unterteilt wurden. Die Primersequenzen und Konzentrationen für die Amplifikation der fünf Gene

wurden der Publikation von DOUMITH *et al.* (2004a) entnommen. Die Synthese der Primer erfolgte bei der Firma VBC-Biotech (Wien, Österreich). Dieser Publikation wurden auch die Produktgrößen sowie die Serovarspezifität der entsprechenden Genkombinationen entnommen.

Zur Extraktion der Template-DNA wurden bis zu fünf Kolonien in 100 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei 95 °C für 20 min inkubiert. Nach der thermischen Lyse wurden die Zelltrümmer bei 20820 × g bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden 2 µl des Überstandes für die PCR als DNA-Template verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit einer *Taq* DNA-Polymerase von VWR (Darmstadt, Deutschland) mit dem zugehörigen 10x Key Buffer. Der PCR-Zyklus nach DOUMITH *et al.* (2004a) wurde mit verschiedenen Anlagerungstemperaturen modifiziert. Nach der Amplifikation wurden 10 µl des Reaktionsgemischs auf einem 2-%-igen Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.4.3). Für die Visualisierung wurden die Gele 15 bis 20 min lang mit Gel Red gefärbt.

### 2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der nachzuweisenden Nukleotid-Fragmente wurden 1-%-ige oder 2-%-ige-Agarosegele verwendet. Hierfür wurde Agarose in dem entsprechenden Volumen 1-fach-TAE-Puffer aufgeköcht. Für die Herstellung des 50-fach TAE-Pufferstocks wurden 242 g Tris, 100 ml EDTA (0,05 M) und 57,4 ml Essigsäure (1 M) für ein Endvolumen von 1000 ml verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in der Kammer Horizon 58 von Analytik Jena (Jena, Deutschland). Es wurden pro Gel 25 ml Agarose verwendet. Das Gel wurde mit 1-fach TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6-fach Ladepuffer (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) vermischt und in die entsprechenden Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 85 bis 95 V. Für die Geldokumentation wurde das Agarosegel für 15 bis 20 min in 3-fach GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, USA) geschwenkt. Dabei werden die DNA-Fragmente komplexiert und eine Anregung im UV-Bereich ermöglicht. Die Emissionsintensität ist dabei proportional zur DNA-Menge. Als Marker wurden HyperLadder<sup>TM</sup> 1kb (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) und Ready Ladder<sup>TM</sup> 50 bp (VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

#### 2.4.4 Differentielle Transkriptomanalyse

Mit Hilfe der differentiellen Transkriptomanalyse sollte das Genexpressionsverhalten zwischen der mesophilen und niedrigen Wachstumstemperatur der betrachteten Modellorganismen untersucht werden. Hierbei konnte festgestellt werden, ob eine kontrollierte Regulation der verdächtigen lipophilen Verbindungen, im Rahmen der vermuteten Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation, auf genomischer Ebene erfolgt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit dem Max Planck Genome Centre (MPGC) in Köln. Für die Sequenzierung wurde eine Illumina basierte *Next Generation Sequencing* (NGS) Methode verwendet. Es wurden je Modellorganismus ein entsprechendes Lebensmittel-assoziiertes Isolat (*L. monocytogenes* FFH, *P. glucanolyticus* J12, *S. xylosus* J70, *M. luteus* J3) ausgewählt. Hierfür wurden die Genome der genannten Stämme sequenziert und als Kartierungsgrundlage für das Transkriptom verwendet.

##### 2.4.4.1 DNA- und RNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden die entsprechenden Stämme im Einfachansatz bei 30 °C bis zu einer  $OD_{625nm} \sim 1$  inkubiert. Die gesamte DNA wurde mit Hilfe des Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert und ein RNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde nach der enzymatischen Zellyse 20 µl RNase A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 25 µl Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 200 µl Puffer AL zugegeben und entsprechend der weiteren Protokollschritte verfahren. Die genomische DNA wurde auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Hierdurch konnte die Reinheit der DNA überprüft werden. Anschließend erfolgte eine DNA Quantifizierung mittels Plattenlesegeräts (Abschnitt 2.4.1).

Die RNA-Extraktion für die anschließende Transkriptomanalyse wurde in einem biologischen Dreifachansatz bei mesophilen sowie kalten Temperaturbedingungen durchgeführt. Die Zellanzucht hierfür erfolgte entsprechend Abschnitt 2.1.1.2. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation von 10 ml Zellsuspension in 30 ml Zentrifugenbecher bei der entsprechenden Wachstumstemperatur, nachdem die spät-exponentielle Wachstumsphase erreicht worden ist. Das Zellpellet wurde in 500 µl steriler Ringerlösung resuspendiert und mit 1 ml RNProtect-

Bacteria Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur mRNA Stabilisation versehen. Hierfür wurde die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder pelletiert (Zentrifugation bei  $5000 \times g$  für 10 min) und konnte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (bis zu zwei Wochen) und  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (bis zu vier Wochen) gelagert werden. In dieser Arbeit wurden die Zellpellets für die RNA-Extraktion maximal über Nacht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im nächsten Schritt erfolgte die Resuspension der Zellpellets in  $20\text{ }\mu\text{l}$  Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland) und  $200\text{ }\mu\text{l}$  TE-Puffer (pH 8,0, autoklaviert; VWR, Darmstadt, Deutschland) versehen mit Lysozym (400 kU) beziehungsweise Lysostaphin (2,7 kU). Für die eigentliche Extraktion wurde das RNeasy Protect Bacteria Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach den Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit jeweils  $30\text{ }\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser (Sigma-Aldrich W4502; Darmstadt, Deutschland). Hierdurch wurde, auf Kosten der RNA-Konzentration, eine größere RNA-Ausbeute ermöglicht. Der vollständige DNase-Verdau wurde mit Hilfe eines Agarosegels (Abschnitt 2.4.3) durch den Einsatz von  $2\text{ }\mu\text{l}$  des Eluats kontrolliert. Die RNA-Qualität wurde dabei anhand folgender Parameter beurteilt: keine genomische DNA im Eluat, einem Intensitätsverhältnis der 23S/16S-Fragmente von  $\sim 2$  und keiner starken Schlierenbildung unterhalb der 16S Bande. Die RNA-Konzentration wurde analog zur DNA mit Hilfe des Plattenlesegerätes bestimmt (Abschnitt 2.4.1). Die Qualitätsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte mit Hilfe eines Agarosegels. Für die Auftrennung wurde circa  $100\text{ ng}$  RNA eingesetzt und das Probenvolumen entsprechend gewählt.

### 2.4.4.2 Differentielle Genexpressionsanalyse

Für die Kartierung der transkribierten Gene wurde eine Genomsequenz für die Stämme *L. monocytogenes* FFH, *P. glucanolyticus* J12, *S. xylosus* J70 und *M. luteus* J3 erstellt. Die gesamte DNA wurde wie unter Abschnitt 2.4.4.1 beschrieben, isoliert. Die Genomsequenzierung wurde mit einem Illumina HiSeq3000-Plattform Sequenzierer (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Bibliothek wurde NEB Next Ultra II DNA Library Kit for Illumina (New England Biolabs) verwendet. Fragmente mit einer Leselänge von  $150\text{ bp}$  wurden von beiden Enden her (*paired end*) sequenziert, was zu einem Minimum von  $3,3 \cdot 10^9$  Reads führte (entspricht  $1,00$  Gigabasen). Die Messwerte wurden auf ausreichende Qualität überprüft und die Adapter mit FLEXBAR (DODT *et al.*, 2012) getrimmt. Die Assemblierung der Genome wurde mit SPAdes-3.6.2 (BANKEVICH *et al.*, 2012)



durchgeführt und mit Quast (GUREVICH *et al.*, 2013) bewertet. Die Coverage der assemblierten Contigs wurde mit der Software bbmap als Teil der BBTools Suite (BBMap - Bushnell B. - sourceforge.net/projects/ bbmap/) berechnet. Überlappungen und Ähnlichkeiten der Contigs mit einer Größe > 500 bp wurden mit Gepard (KRUMSIEK *et al.*, 2007) überprüft. Für die Genvorhersage und -annotation wurde der RAST-Server (Rapid Annotation using subsequent technology; AZIZ *et al.*, 2008) oder GO-Server (GeneOntology; ASHBURNER *et al.*, 2000; GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2018) verwendet.

Für Genexpressionsanalysen wurden Zellen bei 6 oder 10 °C und 30 oder 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden im späten exponentiellen Stadium gewonnen und mit RNAprotect-Bacteria vermischt, um die RNA zu stabilisieren. Die gesamte RNA wurde wie unter Abschnitt 2.4.4.1 beschrieben, extrahiert und mindestens 1 µg an das MPGC geschickt. Der Versand erfolgte gekühlt auf Trockeneis. Dort wurde eine rRNA-Depletion durchgeführt, um die hohen Mengen an rRNA zu entfernen und die Konzentration der kodierenden RNA zu maximieren. Fragmente mit einer Leselänge von 150 bp wurden von beiden Seiten mit einem Illumina HiSeq3000 sequenziert, was zu einer Mindestanzahl von 5.000.000 Reads führte (entspricht 1,50 Gigabasen). Für den Stamm *S. xylosus* J70 wurde das Alignment der mRNA-Reads mit Bowtie (LANGMEAD *et al.*, 2009) und TopHat2 (KIM *et al.*, 2013) durchgeführt. Die Anzahl der Reads wurde mit der Software HTSeq-count (ANDERS *et al.*, 2015) berechnet. Anschließend wurden die mRNA-Reads mit der EdgeR-Software (ROBINSON *et al.*, 2010, MCCARTHY *et al.*, 2012) auf die zuvor erstellte Genomanordnung abgebildet. Differentielle Genexpressionen wurden mit EdgeR unter Verwendung der Standardeinstellungen des Programms berechnet. Für eine EdgeR-Analyse wird die Datenstruktur basierend auf einem negativen Binomialmodell mit Normalisierungsfaktoren und Streuwerten analysiert, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für die restlichen Stämme wurden diese Schritte mit der Software RNASeq analysis der CLC Genomics Workbench (Qiagen Bioinformatics, Hilden, Deutschland) und Differential expression for RNA-seq durchgeführt. Die Berechnungen basierten auf der Gen-Coverage, den statistischen Parametern p-Wert, False Discovery Rate (FDR) und Bonferroni-Wert. Die unterschiedlich exprimierten Gene wurden entsprechend ihrer Bedeutung in Chi-Quadrat-Tests und mindestens 2-facher Expressionsänderung ausgewählt. Die automatischen Annotationen wurden zusätzlich mit Hilfe der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank (Kegg.jp; KANEHISA & GOTO, 2000; KANEHISA *et al.*, 2019) und NCBI Blastp und Blastn Analysen (ALTSCHUL *et al.*, 1990; GISH & STATES, 1993) verifiziert und falls nötig näher spezifiziert.

### 2.4.5 Average Nucleotide Identity (ANI) Analyse

Die generierten Genome wurden weiterhin für eine weitere Speziesverifikation mittels einer ANI-Analyse mit den entsprechenden Referenz- und Typstämmen verwendet. Die durchschnittliche Nukleotididentität (*Average Nucleotide Identity*) ist eine bioinformatische Analyse um Artengrenzen von Bakterien und Archäen zu bestimmen. Für die Identitätsberechnung werden die Genomsequenzen fragmentiert und anschließend die Nukleotidsequenz und Ausrichtung verglichen. Für die ANI Genom-Vergleichsmessung wurde ein Schwellenwert für die Artengrenze bei 95 bis 96 % vorgeschlagen (GORIS *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2014).

Die ANI Analyse erfolgte auf einer Online-Plattform (<https://www.ezbiocloud.net>; YOON *et al.*, 2017). Unter der *Tools*-Rubrik wurde der angeführte ANI Calculator verwendet, wobei die zwei zu vergleichenden Genomsequenzen im Fasta-Dateiformat vorlagen. Die entsprechenden Vergleichsgenome wurden der öffentlich zugänglichen Genom-Datenbank GenBank® entnommen (BENSON *et al.*, 2013).

## 2.5 Statistische Auswertung

In der Regel wurden für alle Experimente Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Fehlerbalken stellen die entsprechende Standardabweichung dar. Die in den Abbildung 17 und Abbildung 20 dargestellten Linien stellen eine lineare Anpassung der Daten dar. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test bestätigt. Die Korrelation wurde mit dem Pearson Produkt-Moment Korrelationstest analysiert. Gegebenenfalls wurden Signifikanztests durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der beidseitige *t*-Test verwendet. Die Auswertung der Daten mit mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels ANOVA ( $p < 0,05$ ), gefolgt von einem Post-Hoc-Test für den paarweisen Mittelwertvergleich (Fisher LSD-Test,  $p < 0,05$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit OriginPro 8G (OriginLab).

## 3 Ergebnisse

Die Untersuchung der beiden lipophilen Verbindungen erfolgte anhand von vier Modellorganismen, wobei jeweils zwei Spezies mit dem Fokus auf isoprenoide Chinone oder Carotinoide getestet worden sind. Aufgrund der verschiedenen Strategien, die sich bei der Nutzung von isoprenoiden Chinonen und Carotinoiden gezeigt haben, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit zur besseren Verknüpfung Spezies-spezifisch gegliedert und dargestellt. In den Abschnitten 3.1 sowie 3.2 werden die Modellorganismen *L. monocytogenes* sowie *P. glucanolyticus* mit dem Fokus auf isoprenoide Chinone aufgeführt. In den Abschnitten 3.3 und 3.4 folgen die Spezies *S. xylosus* sowie *M. luteus* mit dem Schwerpunkt auf Carotinoiden.

### 3.1 Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation in *Listeria monocytogenes* bei niedrigen Temperaturen

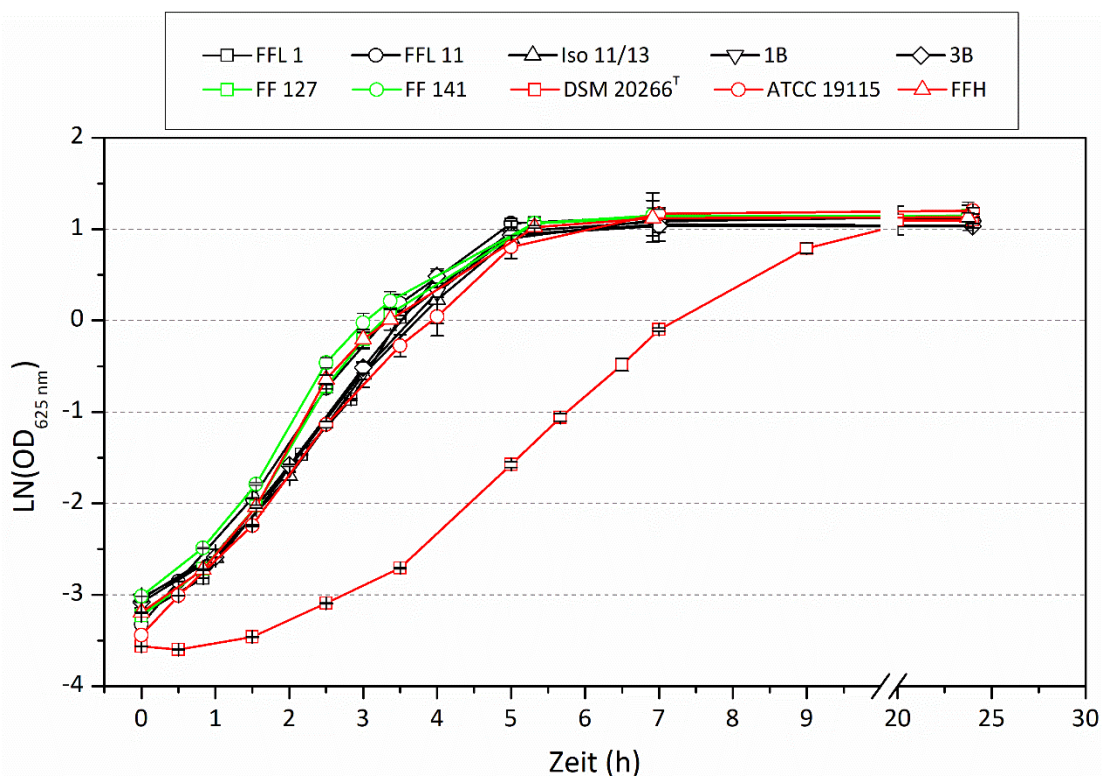
Für die Untersuchung von *L. monocytogenes* standen 10 verschiedene Stämme zur Verfügung (Abschnitt 2.1.1). Insbesondere durch die Vielzahl an verschiedenen Lebensmittelisolaten konnten mehrere Ausprägungen der Fettsäureanpassung an verschiedene Temperaturen erfasst werden. Daraus ergab sich bereits ein Hinweis, dass weitere potentielle Anpassungsmechanismen vorhanden sein könnten, um diese Differenzen auszugleichen.

#### 3.1.1 Wachstumsverlauf der 10 untersuchten *L. monocytogenes* Stämme

Zu Beginn der Arbeit wurde das Wachstum aller verwendeten Stämme bei 37 °C und 6 °C dokumentiert. Diese Erfassung der Wachstumsparameter diente zu einer ersten Beurteilung des Kälteadaptationsausmaßes der 10 verschiedenen *L. monocytogenes* Stämme. Die Anzucht erfolgte wie unter Abschnitt 2.1.1.2 beschrieben in einem Hefeextrakt supplementiertem Komplexmedium (HTB). Die Daten für die Wachstumsverläufe werden nach der Temperatur unterteilt in den Abbildung 9 und 10 dargestellt. Bei 37 °C Wachstumstemperatur zeigten alle Stämme, bis auf Stamm DSM 20600<sup>T</sup>, ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten auf (Abb. 9). Nach der Inokulation zeigte sich ein gleichmäßiges Wachstum. Lag-Phasen waren nicht vorhanden. Die maximale Wachstumsrate für diese Stämme lag bei circa 1,0 h<sup>-1</sup> und entsprach einer Verdopplungszeit von ungefähr 0,7 h (Tab. 6). Eine OD<sub>625 nm</sub> von 1 (ln OD = 0) wurde

### 3 Ergebnisse

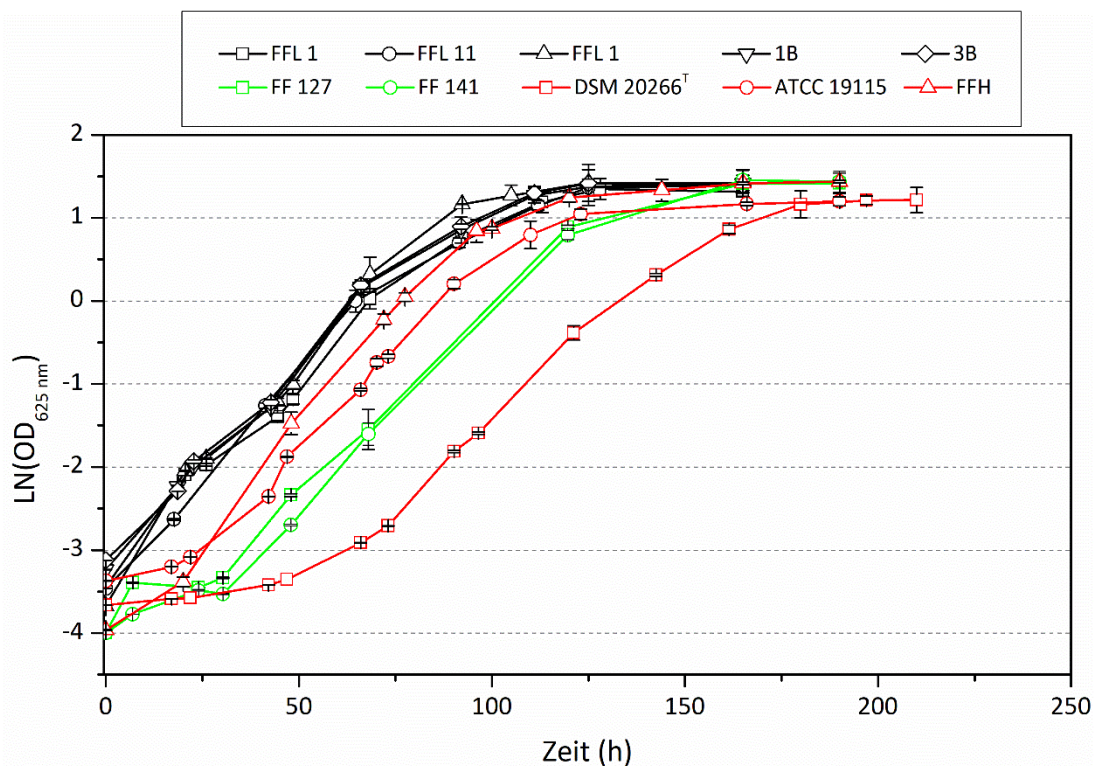
bereits nach vier Stunden erreicht und markierte den Erntezeitpunkt für alle nachfolgenden Versuche. Nach fünf Stunden ging das Wachstum in die stationäre Phase über, wobei maximale  $OD_{625\text{ nm}} \sim 3$  ( $\ln OD_{625\text{ nm}} \sim 1,1$ ) erreicht wurden. Der Typstamm DSM20600<sup>T</sup> zeigte nach der Inokulation eine deutliche Lag-Phase von circa 1,5 h auf. Daraufhin beschleunigte sich das Wachstum bis zum Zeitpunkt 5 h, bei dem eine maximale Wachstumsrate von  $0,75\text{ h}^{-1}$  und Vordopplungszeit von  $\sim 0,9\text{ h}$  gemessen werden konnte. Der Erntezeitpunkt ( $OD_{625\text{ nm}} 1$ ) wurde nach circa einer Stunde erreicht. Der maximale Zellertrag war vergleichbar mit den restlichen Stämmen.



**Abbildung 9: Wachstumsverlauf der *L. monocytogenes* Stämme bei 37 °C Wachstumstemperatur in HTB-Medium.** Dargestellt als natürlicher Logarithmus der  $OD_{625\text{ nm}}$  aufgetragen gegen die Zeit in h. Unterbrochene x-Achse zwischen 10-20 h. Daten stellen einen Mittelwert dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Inkubation bei 6 °C brachte auf den ersten Blick ein heterogenes Wachstumsverhalten hervor (Abb. 10), das in verschiedenen Erntezeitpunkten resultierte. Je nach Stamm wurde die Ziel- $OD_{625\text{ nm}} 1$  ( $\ln OD_{625\text{ nm}} = 0$ ) nach etwa 60 h, 80 h, 100 h oder 120 h erreicht. Die Steigung der Wachstumskurven hingegen erschien als stark kongruent und legte den Schluss nahe, dass die Wachstumsunterschiede von dem Ausmaß der Lag-Phase abhängig waren. Die Stämme FFL 1, FFL 11, Iso 11/13, 1B, 3B und FFH zeigten keine Lag-Phase auf. Die konstante Wachstumsrate beginnend vom Inokulationszeitpunkt bis  $\ln(OD_{625\text{ nm}}) = 1$ , resultierte in den

frühesten Erntezeitpunkten von circa 60 h. Bei den weiteren Stämmen resultierte die einhergehende Temperaturreduktion, von 30 auf 6 °C, bei der Inokulation der Hauptkulturen (Abschnitt 2.1.1.2) in einer Lag-Phase. Der Stamm ATCC 19115 wies eine Lag-Phase von ungefähr 20 h auf und konnte nach 80 h geerntet werden. Entsprechendes Verhalten war bei den Stämmen FF 127 und FF 141 mit einer Lag-Phase von 30 h und Stamm DSM 20600<sup>T</sup> mit der längsten Lag-Phase von 40-50 h zu beobachten. Diese Annahme konnte mit der Berechnung der beiden Wachstumsparameter bestätigt werden (Tab. 6). Die Wachstumsraten aller Stämme zeigten einen Wert von circa 0,05 h<sup>-1</sup>, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag. Daraus resultierten Verdopplungszeiten zwischen 13,4 h und 15,5 h. Die niedrige Inkubationstemperatur hatte bei den Lebensmittelisolaten eine maximale OD<sub>625 nm</sub> ~ 4 zur Folge, was einer 30-%-igen Zunahme im Vergleich zum Wachstum bei 37 °C entsprach.



**Abbildung 10: Wachstumsverlauf der *L. monocytogenes* Stämme bei 6°C Wachstumstemperatur in HTB-Medium.** Dargestellt als natürlicher Logarithmus der OD<sub>625 nm</sub>, aufgetragen gegen die Zeit in h. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Im Gegensatz zur Anzucht bei 37 °C zeigte der Typstamm DSM 20600<sup>T</sup> bei niedrigen Temperaturen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Wachstumsrate und Verdopplungszeit auf. Schlussfolgernd konnte gezeigt werden, dass bis auf eine Ausnahme (Stamm DSM 20600<sup>T</sup> bei 37 °C), alle untersuchten Stämme nahezu identische Wachstumsraten

### 3 Ergebnisse

und somit Verdopplungszeiten, bei der entsprechenden Wachstumstemperatur von 37 oder 6 °C, erreichten. Hierdurch konnten keine divergierenden Anpassungspotentiale an mesophile oder niedrige Temperaturen abgeleitet werden. Das einzige Unterscheidungsmerkmal bildete die Dauer der Lag-Phase, welche insbesondere bei 6 °C zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten führte.

**Tabelle 6: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der *L. monocytogenes* Stämme.** Unterteilt nach den Wachstumstemperaturen von 37 °C und 6 °C im HTB-Medium. Wachstumsraten bei 6 °C der einzelnen Stämme zeigten keinen statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied auf (ANOVA-Test). Daten stellen Mittelwerte dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Das  $\pm$ -Zeichen repräsentiert die Standardabweichung.

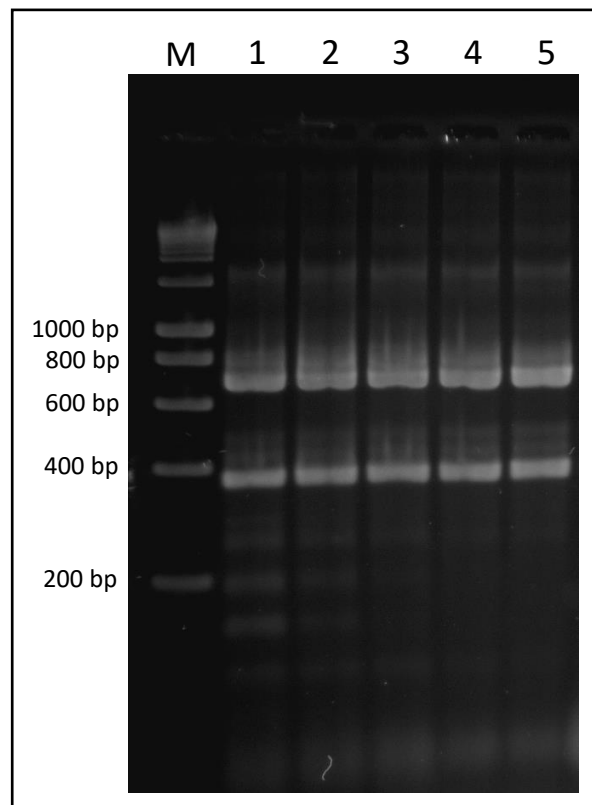
Stamm	37 °C		6 °C	
	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)
FFL 1	1,03 ± 0,07	0,67 ± 0,05	0,051 ± 0,001	13,6 ± 0,3
FLL 11	1,04 ± 0,07	0,67 ± 0,04	0,051 ± 0,004	13,6 ± 1,1
ATCC 19115	0,99 ± 0,07	0,71 ± 0,05	0,051 ± 0,002	13,6 ± 0,5
DSM 20600 <sup>T</sup>	0,75 ± 0,08 **	0,93 ± 0,03	0,048 ± 0,009	14,8 ± 2,8
Iso 11/13	1,00 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,051 ± 0,003	13,6 ± 0,8
1B	1,00 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,051 ± 0,001	13,6 ± 0,3
3B	1,01 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,051 ± 0,001	13,6 ± 0,3
FFH	1,02 ± 0,06	0,68 ± 0,04	0,052 ± 0,003	13,3 ± 0,5
FF 127	1,02 ± 0,06	0,68 ± 0,04	0,046 ± 0,007	15,3 ± 2,4
FF 141	1,01 ± 0,07	0,69 ± 0,02	0,045 ± 0,008	15,6 ± 2,8

\*\* nach ANOVA-Test ist die Wachstumsrate des Stamms DSM 20600<sup>T</sup> statistisch signifikant unterschiedlich zu den restlichen Stämmen bei 37 °C ( $p < 0,01$ ).

#### 3.1.2 Bestimmung der *L. monocytogenes* Serovargruppen

Zur Feststellung einer möglichen Serovar-abhängigen Korrelation der Fettsäuren-unabhängigen Kälteanpassung bei *L. monocytogenes* wurden die verwendeten Stämme mittels

einer Multiplex-PCR in distinkte Serovargruppen unterteilt. Die verwendeten Primer wurden der Veröffentlichung von DOUMITH *et al.* (2004a) entnommen. Die Multiplex-PCR wurde, wie unter Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die in der Publikation genannte Annealing-Temperatur von 53 °C hatte eine Vielzahl zusätzlicher unspezifischer Fragmente zur Folge (Abb. 11). Entsprechend der Temperaturgradienten-PCR wurde eine Anlagerungstemperatur von 59 °C für die nachfolgenden Ansätze verwendet, um die Anzahl der unspezifischen Fragmente zu reduzieren. Hierbei zeigte sich ein gutes Verhältnis von erwartetem Amplifikat und einer geringen Anzahl an unspezifischen Produkten (Abb. 11).

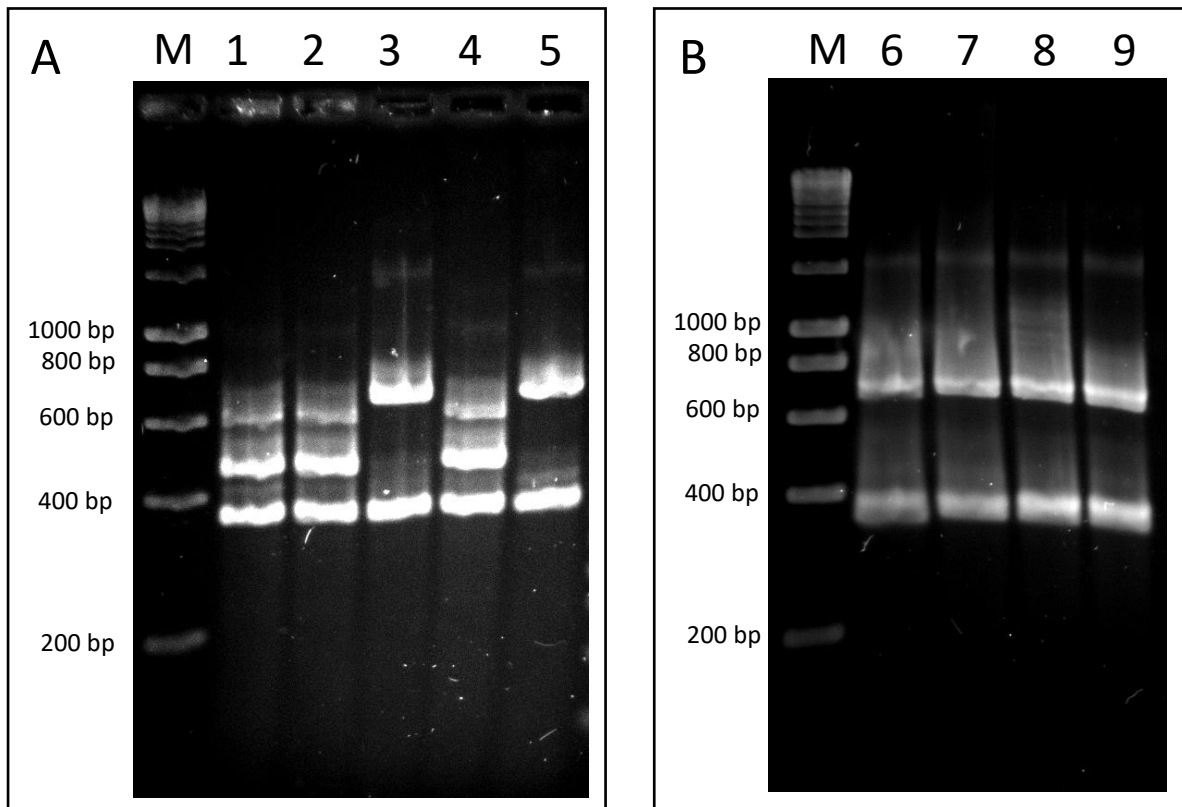


**Abbildung 11: Temperaturgradienten-PCR mit verschiedenen Anlagerungstemperaturen der *L. monocytogenes* Serovarbestimmung.** M = Marker; 1 = 53,1 °C; 2 = 55,0 °C; 3 = 56,6 °C; 4 = 58,7 °C; 5 = 59,1 °C. Genomische DNA des Stammes FFL 11 wurde als Template verwendet. Die zwei spezifischen Banden bei circa 380 bp und 700 bp entsprachen den zu erwartenden Genzielen *prs* mit 370 bp und *lmo0737* mit 691 bp (DOUMITH *et al.*, 2004a).

Die Abbildung 12 zeigt die amplifizierten Banden der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme. Dabei wurden zwei Kombinationen der amplifizierten Banden für alle untersuchten Stämme detektiert. Bei den Stämmen FF 141, FF 127, ATCC 19115 und FFH (nicht gezeigt) wurden drei Banden bei circa 600 bp, 450 bp und 380 bp amplifiziert (Abb. 12A). Das entspricht den Genzielen ORF2110 (597 bp), ORF2819 (471 bp) und dem Gen *prs* (370 bp). Mit dieser Genkombination konnten diese Stämme der Gruppe II.1 mit den Serovaren 4b, 4d, 4e

### 3 Ergebnisse

zugeordnet werden. Bei den restlichen Stämmen DSM 20600<sup>T</sup>, FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13 wurden zwei spezifische Banden mit den Fragmentgrößen von circa 370 bp und 700 bp amplifiziert (Abb. 12A, B). Das entspricht den Genzielen *prs* (370 bp) und *lmo0737* (691 bp) und konnte somit der Gruppe I.1 mit den Serovaren 1/2a und 3a zugeordnet werden. Bei einer Untersuchung von 5000 *L. monocytogenes* Isolaten aus Lebensmitteln und Patienten zeigte sich, dass mindestens 98 % der Isolate den Serovaren 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b zugeordnet werden konnten. Folglich konnten die restlichen Serovare nur selten in Lebensmittelproben detektiert werden. Vor diesem Hintergrund konnten wir davon ausgehen, dass es sich bei unseren getesteten Stämmen höchstwahrscheinlich um die Serovare 1/2a und 4b handeln würde. Für die beiden Stämme DSM 20600<sup>T</sup> (1/2a) und ATCC 19115 (4b) konnten die hier bestimmten Serovare über die entsprechenden Stammsammlungen bestätigt werden.



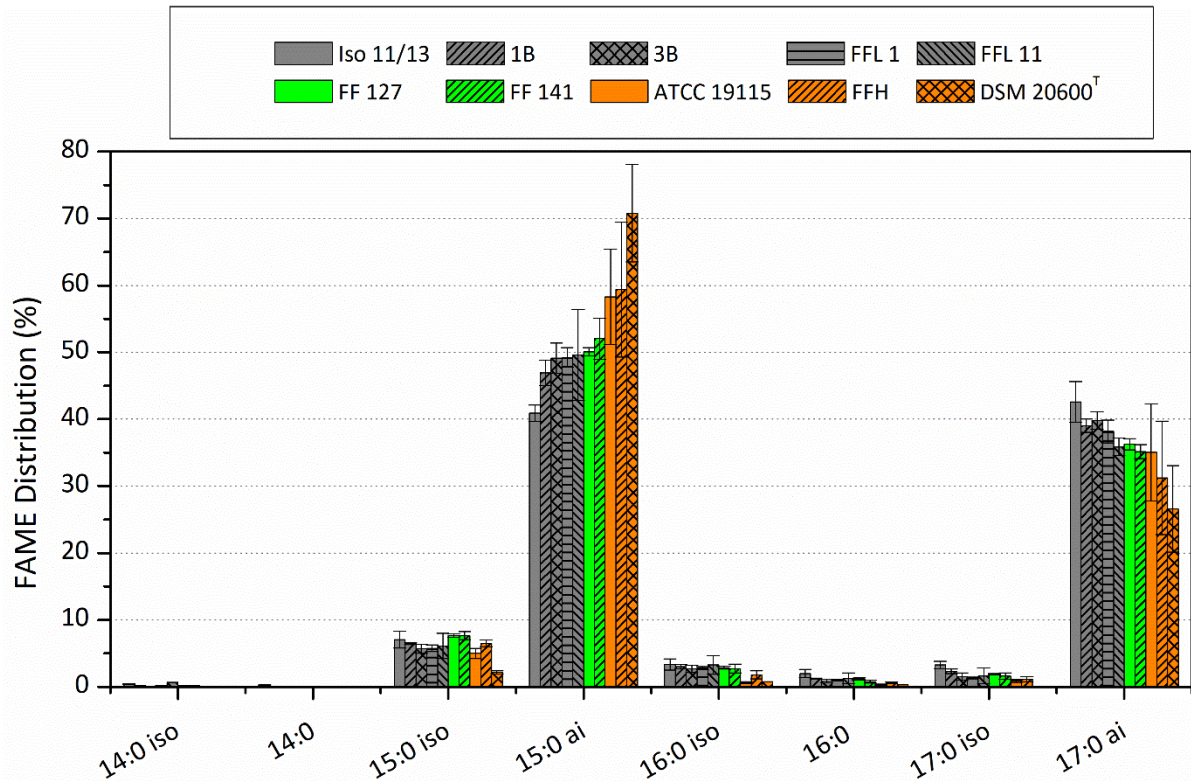
**Abbildung 12: Multiplex-PCR zur Serovarbestimmung der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme.** Die vier spezifischen Banden bei circa 380 bp, 480 bp, 600 bp und 700 bp entsprechen den zu erwartenden Genzielen *prs* mit 370 bp, ORF2819 mit 471 bp, ORF2110 mit 597 bp und *lmo0737* mit 691 bp. M = Marker; 1 = FF 141; 2 = FF 127; 3 = DSM 20600<sup>T</sup>; 4 = ATCC 19115; 5 = FFL 1; 6 = FFL 11; 7 = 3B; 8 = Iso 11/13; 9 = 1B.



### 3.1.3 Fettsäureanalyse und das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung in *L. monocytogenes*

Der erste Schritt zur Erfassung einer potentiellen Fettsäure-unabhängigen Membran-modifikation zur Kälteanpassung bestand darin, das Ausmaß der bekannten homeoviskosen Adaptation als einen Basis- beziehungsweise Referenzwert zu bestimmen. Hierzu wurden mit Hilfe der sauren Methanolyse die Fettsäuren vom Glyceringrundgerüst abgespalten, methyliert und anschließend mittels GC-MS identifiziert sowie quantifiziert (Abschnitt 2.2.1). Die Fettsäure-Distribution wurde dann für die beiden verwendeten Wachstumstemperaturen erstellt. Anhand dieser Profile war es möglich das Ausmaß der Fettsäuremodifikation an die niedrige Wachstumstemperatur zu bestimmen.

Fettsäureprofile der 10 *L. monocytogenes* Stämme wurden bei 37 °C und 6 °C Wachstumstemperatur in der spät-exponentiellen Wachstumsphase analysiert. Fettsäureprofile unter Angabe der einzelnen prozentualen Werte sowie den entsprechenden WAMT-Werten sind in der Tabelle 7 aufgelistet. Zusätzliche Balkendiagramme wurden zur besseren Darstellung der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung (mit einem Mindestanteil von 1 %) der einzelnen Stämme bei 37 °C (Abb. 13) und 6 °C (Abb. 14) Wachstumstemperatur erstellt. Wie anhand der verschiedenen Darstellungen zu entnehmen ist, handelte es sich bei den dominierenden Fettsäuren bei allen Isolaten und Referenzstämmen um 15:0 iso, 15:0 anteiso und 17:0 anteiso. Die Schmelztemperaturen für diese Fettsäuren liegen nach KNOTHE & DUNN (2009) bei 51,4 °C, 24,1 °C und 37,1 °C. Diese drei verzweigt-kettigen Fettsäuren stellten bei beiden Wachstumstemperaturen mindestens 90 % der gesamten Fettsäuren dar. Die Abbildung 13 zeigt die prozentuale Verteilung der detektierten FAMES bei 37 °C Wachstumstemperatur. In Übereinstimmung zur Literatur wurden zwei Hauptfettsäuren, 15:0 anteiso und 17:0 anteiso gemessen, deren Abundanz bei circa 40-60 % lag (ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998). Mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von ungefähr 10 % wurde die Fettsäure 15:0 iso detektiert. Bei den restlichen Fettsäuren handelte es sich hauptsächlich um gradkettige und verzweigte Acylketten mit 16 und 17 C-Atomen (16:0, 16:0 iso und 17:0 iso). Hierbei zeigten sich bereits Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen in ihrem Verhältnis zwischen den Hauptfettsäuren 15:0 anteiso und 17:0 anteiso. Verglichen mit den jeweiligen Fettsäureprofilen bei 6 °C, tendierte das Verhältnis der Hauptfettsäuren bei den Stämmen ATCC 19115, FFH und DSM 20600<sup>T</sup> bei 37 °C schon in Richtung einer Anpassung an niedrige Temperaturen.



**Abbildung 13: FAME-Profil bei 37 °C Wachstumstemperatur der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme in HTB-Medium.** Farbliche Kodierung der Stämme anhand der Stärke ihrer Fettsäureanpassung. Grau = Starke Ausprägung der Fettsäureanpassung (Gruppe A); Orange = Schwache Ausprägung der Fettsäureanpassung (Gruppe B); Grün = Intermediäre Fettsäureanpassung. Iso = Acylkette mit einer Methyl-Verzweigung am vorletzten C-Atom; ai (anteiso) = Acylkette mit einer Methyl-Verzweigung am vorvorletzten C-Atom. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei einer Wachstumstemperatur von 6 °C konnte die bekannte Fettsäure-abhängige Kälteadaptation (ANNOUS *et al.*, 1997) von *L. monocytogenes* für alle untersuchten Stämme beobachtet werden (Abb. 14). Hierbei kam es zu einer starken Verschiebung innerhalb der beiden Hauptfettsäuren, wobei sich im Schnitt der Anteil von 15:0 anteiso auf 80 % erhöhte und die zweite Hauptfettsäure (17:0 anteiso) sich auf 10 % oder niedriger verringerte. Weiterhin ließ sich bei den Geringeren-Fettsäuren eine Verschiebung von Fettsäuren mit 16 und 17 C-Atomen zu den kürzeren Fettsäuren 14:0 und 14:0 iso mit nur 14 C-Atomen erkennen. Somit erfolgte die Fettsäureanpassung an niedrige Temperaturen durch die vermehrte Inkorporation von kürzeren Fettsäuren und der Verschiebung von iso-verzweigten Fettsäuren zu anteiso-verzweigten Fettsäuren. Beide Anpassungsmechanismen resultieren in der Verwendung von Fettsäuren mit geringeren Schmelztemperaturen (Tab. 2). Trotz der geringen Unterschiede zwischen den Stämmen in der Ausprägung der Fettsäure-abhängigen Adaptation an niedrige Temperaturen (Abb. 14) schien die Fettsäureverschiebung bei allen Stämmen substantiell zu sein, sodass eine mögliche Differenzierung nicht trivial erschien.

**Tabelle 7: FAME-Zusammensetzung der *L. monocytogenes* Stämme in Abhängigkeit der Wachstumstemperatur.** Temperaturanpassungen werden als gewichtete durchschnittliche Schmelztemperaturen (WAMT) der entsprechenden Profile dargestellt. Hohe Delta-WAMT-Werte korrelieren mit einer starken Fettsäureantwort auf niedrige Temperaturen, geringe Werte auf eine schwache Kälteantwort. Gruppe A Stämme (schwarz), Gruppe B Stämme (rot), intermediäre Stämme (grün) farblich markiert. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Das ±-Zeichen stellt die Standardabweichung dar.

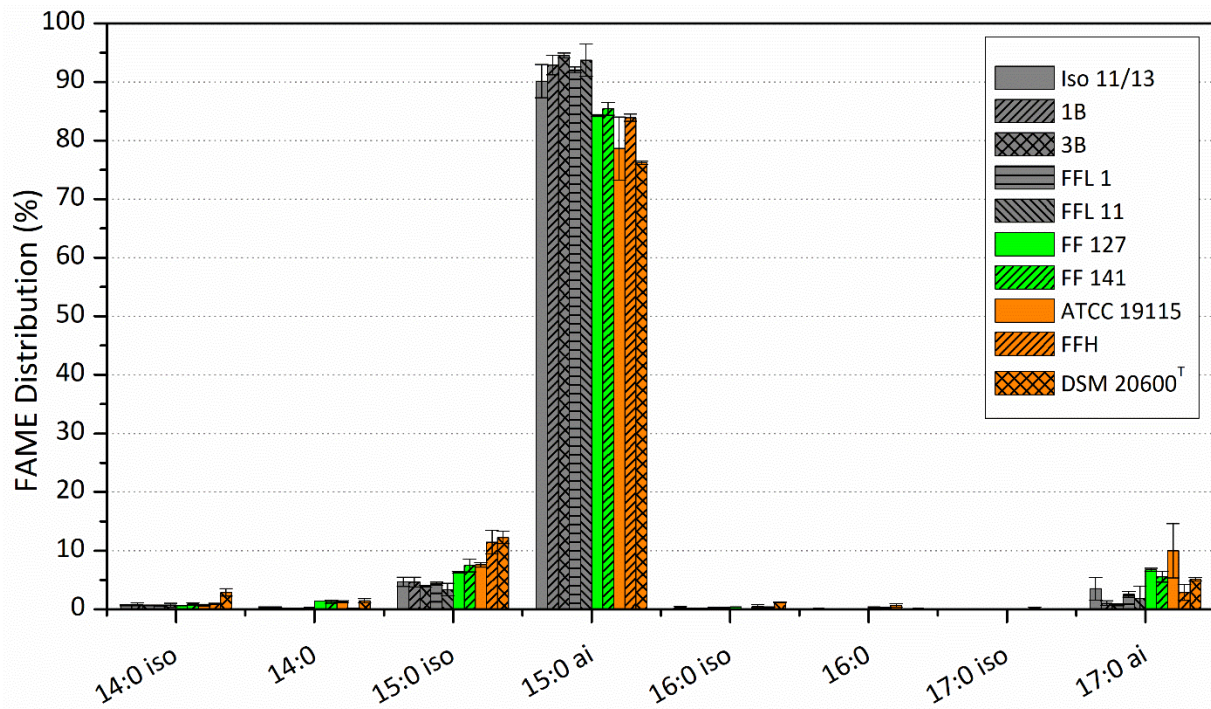
Stamm		Wachstumstemperatur									
		Iso 11/13		1B		3B		FFL 11		FFL 1	
		6 °C	37 °C	6 °C	37 °C	6 °C	37 °C	6 °C	37 °C	6 °C	37 °C
<b>FAME (%)</b>											
<b>14:0 iso</b>	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,1	n.d.	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	
<b>14:0</b>	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	n.d.	0,1 ± 0,1	n.d.	0,2 ± 0,0	n.d.	
<b>15:0 iso</b>	4,7 ± 0,8	7,1 ± 1,3	4,6 ± 0,8	6,5 ± 0,2	3,9 ± 0,2	5,7 ± 0,7	3,4 ± 1,1	6,2 ± 1,9	4,3 ± 0,3	5,9 ± 0,5	
<b>15:0 anteiso</b>	90,1 ± 2,9	40,9 ± 1,2	92,9 ± 1,7	46,9 ± 1,9	94,5 ± 0,4	49,1 ± 2,2	93,7 ± 2,8	49,8 ± 6,8	92,1 ± 0,5	49,4 ± 1,5	
<b>16:0 iso</b>	0,4 ± 0,2	3,4 ± 0,8	0,2 ± 0,0	3,0 ± 0,3	0,2 ± 0,0	2,7 ± 0,6	0,3 ± 0,0	3,4 ± 1,4	0,3 ± 0,0	3,1 ± 0,2	
<b>16:0</b>	0,2 ± 0,0	2,0 ± 0,6	n.d.	1,3 ± 0,1	n.d.	0,9 ± 0,3	n.d.	1,4 ± 0,8	n.d.	1,2 ± 0,1	
<b>17:0 iso</b>	n.d.	3,3 ± 0,5	n.d.	2,3 ± 0,4	n.d.	1,5 ± 0,6	n.d.	1,7 ± 1,2	n.d.	1,5 ± 0,1	
<b>17:0 anteiso</b>	3,5 ± 1,9	42,6 ± 3,0	1,0 ± 0,4	39,0 ± 1,0	0,7 ± 0,2	39,8 ± 1,3	1,9 ± 2,1	36,1 ± 1,3	2,5 ± 0,5	38,4 ± 1,7	
<b>WAMT (°C)</b>	26,4	35,2	25,9	33,3	25,6	32,7	25,7	32,8	25,9	32,9	
<b>ΔWAMT (°C)</b>	8,8		7,4		7,1		7,1		7,0		

n.d. = nicht detektiert

Tabelle 7 fortgesetzt:

Stamm		Wachstumstemperatur									
		FF 127		FF 141		FFH		ATCC 19115		DSM 20600 <sup>T</sup>	
		6 °C	37 °C	6 °C	37 °C	6 °C	37 °C	6 °C	37 °C	6 °C	37 °C
FAME (%)											
<b>14:0 iso</b>	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,9 ± 0,1	n.d.	0,7 ± 0,1	n.d.	2,1 ± 0,6	n.d.	
<b>14:0</b>	1,4 ± 0,0	n.d.	1,3 ± 0,3	n.d.	0,1 ± 0,1	n.d.	1,3 ± 0,2	n.d.	1,0 ± 0,4	n.d.	
<b>15:0 iso</b>	6,3 ± 0,1	7,7 ± 0,3	7,3 ± 1,1	7,7 ± 0,6	11,4 ± 2,0	6,5 ± 0,5	7,6 ± 0,4	5,0 ± 0,8	10,5 ± 1,1	2,2 ± 0,2	
<b>15:0 anteiso</b>	84,3 ± 0,2	50,1 ± 0,6	85,3 ± 1,1	52,0 ± 3,1	83,9 ± 0,6	59,4 ± 10,1	78,6 ± 5,4	58,3 ± 7,1	79,2 ± 0,3	70,8 ± 7,3	
<b>16:0 iso</b>	0,4 ± 0,0	2,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0	2,7 ± 0,7	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	
<b>16:0</b>	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	n.d.	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	
<b>17:0 iso</b>	n.d.	1,9 ± 0,1	n.d.	1,6 ± 0,5	n.d.	1,2 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0	n.d.	
<b>17:0 anteiso</b>	6,8 ± 0,2	36,2 ± 0,8	5,6 ± 0,9	35,2 ± 1,1	2,9 ± 1,4	31,2 ± 8,5	10,0 ± 4,6	35,0 ± 7,2	5,6 ± 0,3	26,6 ± 6,5	
<b>WAMT (°C)</b>	27,7	33,3	27,6	32,8	27,9	31,4	28,5	30,8	28,1	29,9	
<b>ΔWAMT (°C)</b>	5,6		5,2		3,5		2,3		1,8		

n.d. = nicht detektiert



**Abbildung 14: FAME-Profile bei 6 °C Wachstumstemperatur der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme in HTB-Medium.** Farbliche Kodierung der Stämme anhand der Stärke ihrer Fettsäureanpassung. Grau = Starke Ausprägung der Fettsäureanpassung (Gruppe A); Orange = Schwache Ausprägung der Fettsäureanpassung (Gruppe B); Grün = Intermediäre Fettsäureanpassung. Iso = Acylkette mit einer Methyl-Verzweigung am vorletzten C-Atom; ai (anteiso) = Acylkette mit einer Methyl-Verzweigung am vorvorletzten C-Atom. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

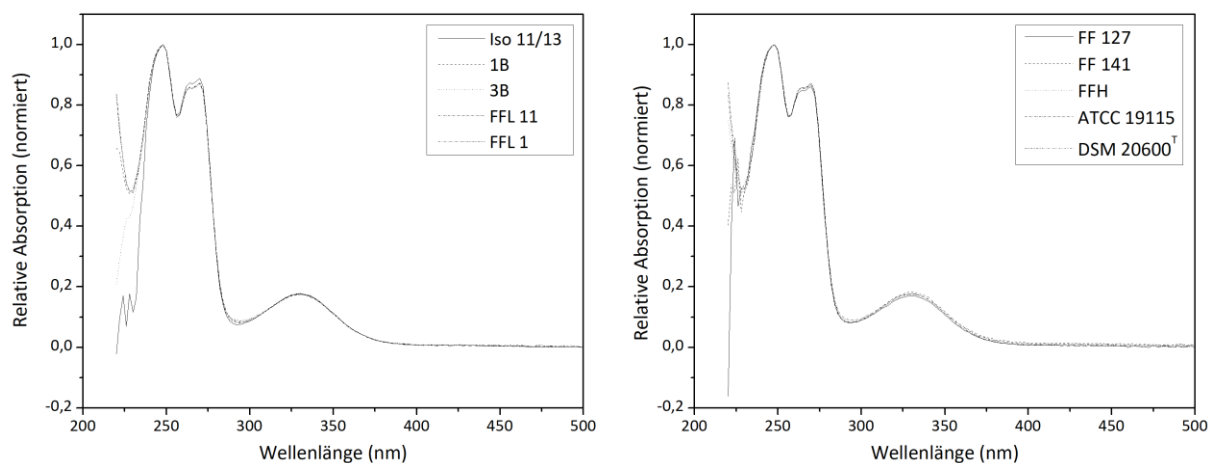
Eine Abhilfe schuf das hier etablierte WAMT-System (Tab. 7). In dieser Arbeit wurde eine Methode ausgearbeitet, bei der für jedes Fettsäureprofil eine gewichtete mittlere Schmelztemperatur berechnet wurde (englisch: *weighted average melting temperature*, Formel 3). Folglich konnte für jeden Stamm der  $\Delta$ WAMT-Wert anhand der WAMT-Werte für 37 °C und 6 °C berechnet werden, um somit die Fettsäureanpassung möglichst objektiv zu quantifizieren. Hohe  $\Delta$ WAMT-Werte entsprechen einer stark ausgeprägten Fettsäureanpassung und niedrige Werte einer entsprechend geringen Adaptation. Bei der Berechnung der  $\Delta$ WAMT-Werte wurden deutliche Unterschiede der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation sichtbar, anhand derer eine Klassifizierung möglich wurde. Die temperaturabhängige Modifikation der FAME-Profile ergab zwei verschiedene Gruppen von Stämmen. Die meisten Isolate (FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13) zeigten eine ausgeprägte Veränderung der Fettsäurezusammensetzung, resultierend in einem  $\Delta$ WAMT > 7 °C. Diese Stämme wurden der Gruppe A zugeordnet. Die Stämme DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH hatten einen  $\Delta$ WAMT < 4 °C. Dies war auf eine weniger ausgeprägte Fettsäureanpassung von 37 °C auf 6 °C zurückzuführen. Die Stämme wurden daraufhin der Gruppe B zugeordnet. Die Isolate FF 127

und FF 141 zeigten eine intermediäre Fettsäureanpassung mit einem  $\Delta WAMT$ -Wert von etwa 5 °C.

Für alle Stämme galt, dass die Temperaturanpassung auf der Regulation der Acylkettenlänge der Fettsäuren basierte, hierbei überwiegend auf der Verschiebung der Anteile an 15:0 anteiso und 17:0 anteiso. Für Isolate der Gruppe B war diese Änderung deutlich weniger stark zwischen den beiden Temperaturen ausgeprägt (Tab. 7, Abb. 14). Der Fettsäuregehalt der Zellen änderte sich nicht bei den unterschiedlichen Temperaturen (Daten nicht gezeigt).

#### 3.1.4 Quantitative Bestimmung des isoprenoiden Chinongehaltes in *L. monocytogenes*

Wie zuvor genannt, bestand der Verdacht bei der Spezies *L. monocytogenes*, dass eine Fettsäure-unabhängige Membranmodifikation durch eine erhöhte Einlagerung der lipophilen Verbindung von isoprenoiden Chinonen erfolgen könnte (Abschnitt 1.5). Für die Extraktion wurde eine modifizierte Methode von HU *et al.* (1999) etabliert. Dabei stand eine vollständige Chinonextraktion, gute Reproduzierbarkeit und geringe Verluste im Vordergrund (Abschnitt 2.2.2).

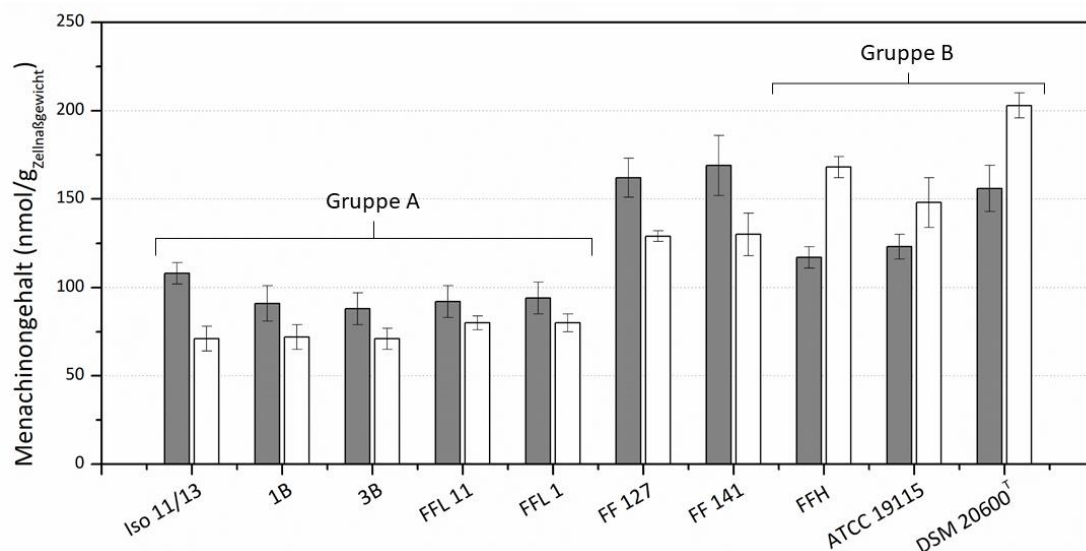


**Abbildung 15: Absorptionsspektren der Menachinonpeaks der getesteten *L. monocytogenes* Stämme.** Zur besser sichtbaren Darstellung wurden die Absorptionsspektren auf zwei Subdiagramme aufgeteilt.

Für alle getesteten *L. monocytogenes* Stämme konnte bei beiden untersuchten Wachstumstemperaturen jeweils nur ein Peak detektiert werden. Die detektierten Absorptionsspektren aller Peaks entsprachen dem typischen Absorptionsmuster von Menachinonen mit den Peaks bei 248 nm, einem Doppelpeak bei 261 nm und 270 nm sowie

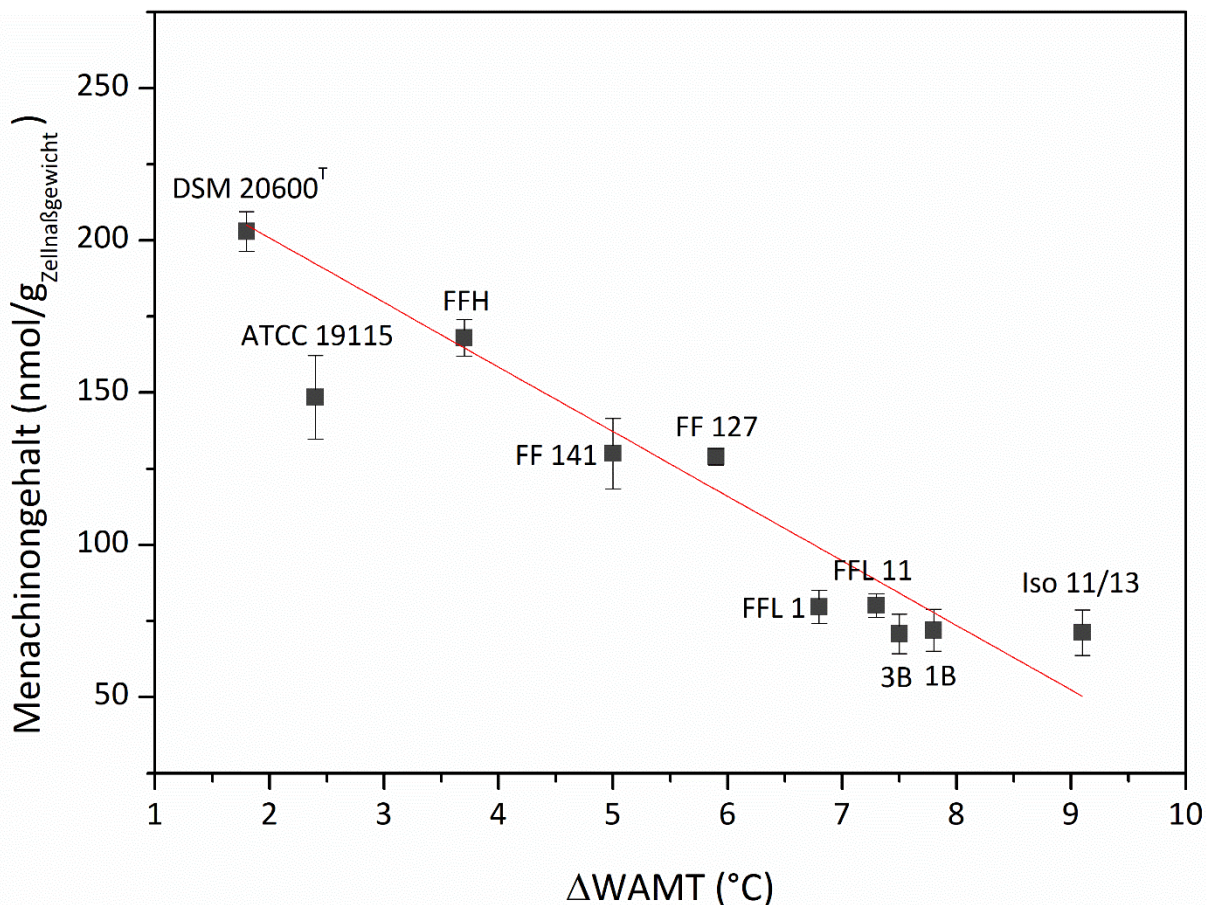
einem breiten Peak bei circa 325 nm (Abb. 15; COLLINS & JONES, 1981). Die genauere Bestimmung der Menachinone erfolgte anhand der relativen Retentionszeit im Vergleich zum verwendeten Vitamin K<sub>1</sub> Standard (RT = 4,9 min) und einer Liste entsprechend normierter Retentionszeiten (RT) verschiedener Chinone. Bei allen Stämmen wurde ein Peak bei circa 6,7 min detektiert. Dies entsprach einer relativen RT von 1,4 womit dieser Peak als MK-7 identifiziert werden konnte. Andere Minorkomponenten wie MK-6 und MK-5, die für *L. monocytogenes* (COLLINS *et al.*, 1979) beschrieben sind, konnten nicht detektiert werden.

Die *L. monocytogenes* Stämme FFL 1, FFL 11, Iso 11/13, 1B und 3B zeigten einen MK-7 Gehalt von etwa 100 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> bei 37 °C Wachstumstemperatur. Die Stämme FF 127 und FF 141 zeigten einen höheren Menachinongehalt von circa 150 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> bei 37 °C. Nach der Kultivierung bei 6 °C reduzierte sich die Menachinonkonzentration dieser Stämme im Bereich von 15-30 %. Obwohl die Stämme DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH einen ähnliches Menachinon-Niveau von 100 bis 150 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> besaßen, äußerte sich die Reaktion auf eine niedrige Wachstumstemperatur signifikant unterschiedlich. Diese drei Stämme zeigten einen deutlichen Anstieg der Menachinonkonzentration bei 6 °C Wachstumstemperatur. Der Menachinongehalt stieg um 33 % für Stamm DSM 20600<sup>T</sup>, um 20 % für den Stamm ATCC 19115 und um 60 % für den Stamm FFH (Abb. 16).



**Abbildung 16: Menachinonkonzentration (nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub>) der verschiedenen *L. monocytogenes* Stämme in HTB.** Gruppe A Stämme mit einer starken Fettsäureanpassung. Gruppe B Stämme mit dem schwächsten Ausmaß der Fettsäureanpassung an niedrige Temperaturen. In grau dargestellt die Menachinongehälter der 37 °C inkubierten Kulturen und in weiß der 6 °C inkubierten Kulturen. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Diese abweichende Reaktion der Stämme entsprach der Differenzierung der Stämme in die Gruppen A und B basierend auf den temperaturabhängigen Fettsäuremodifikationen. Isolate der Gruppe A zeigten einen Rückgang der Menachinonkonzentration bei niedriger Wachstumstemperatur, während Stämme der Gruppe B die konträre Reaktion aufwiesen. In Abbildung 17 wurde der Menachinongehalt bei 6 °C Wachstumstemperatur gegen die  $\Delta$ WAMT-Werte, als ein Maß der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation, der einzelnen Stämme aufgetragen. Hierbei konnte visuell ein linearer Zusammenhang der beiden Parameter erkannt werden, welcher durch das  $R^2$  von 0,88 der linearen Regressionsanalyse bestätigt wurde. Eine Korrelationsanalyse zeigte eine signifikante ( $r = -0,99$ ,  $p < 0,01$ ) Beziehung zwischen dem Ausmaß der Fettsäureprofilanpassung und dem Menachinongehalt unter niedrigen Temperaturen.

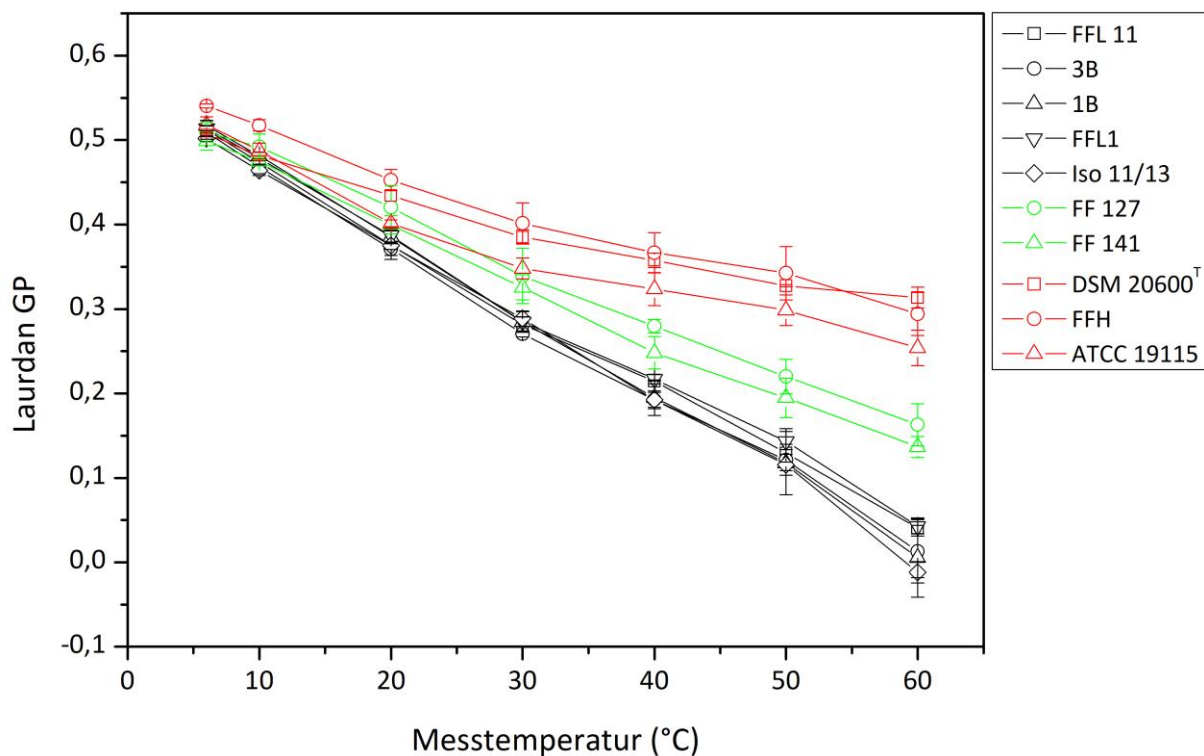


**Abbildung 17: Korrelation des MK-7-Gehalts bei 6 °C Wachstumstemperatur und der Differenz der WAMT-Werte bei beiden Wachstumstemperaturen.**  $\Delta$ WAMT-Werte stellen ein Maß der Kälteanpassung über die Änderung der Fettsäurezusammensetzung dar. Rote Gerade stellt die lineare Regressionslinie der aufgetragenen Punkte dar. Die Pearson Produkt-Moment-Korrelation beträgt  $r = -0,99$ ,  $p < 0,01$ . Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



### 3.1.5 Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in *L. monocytogenes*

Im nächsten Schritt wurden Sonden-abhängige Fluoreszenzmessungen genutzt um direkte Aussagen über die biophysikalischen Parameter der Zellmembran tätigen zu können. Hiermit sollten potentielle Unterschiede in der Charakteristik der Zellmembran aufgrund der verschiedenen Ausprägungen der Kälteanpassung der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme aufgedeckt werden. Unter der Verwendung von zwei verschiedenen Sonden und Messmethoden konnten zwei separate Membraneigenschaften gemessen werden (Abschnitt 1.4). Die Fluoreszenzmessungen erfolgten nach der Methode unter Abschnitt 2.3.

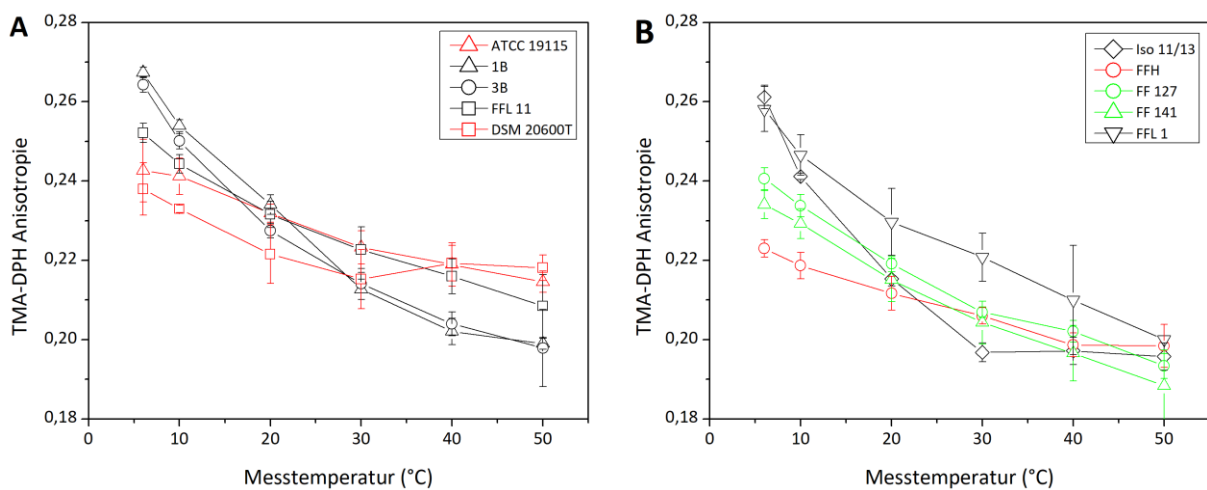


**Abbildung 18: Laurdan GP-Werte aller untersuchten *L. monocytogenes* Stämme.** Stämme mit hohem (rot), intermediärem (grün) und geringem (schwarz) Menachinongehalt wurden farblich kodiert. Messung erfolgte mit 6 °C Kulturen im späten exponentiellen Bereich. Die dargestellten Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Laurdan GP-Messung werden für alle Stämme in der Abbildung 18 dargestellt. Diese Daten zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen den Stämmen mit hohem Menachinongehalt und solchen mit niedrigen Menachinonkonzentrationen. Die Stämme FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13 (schwarze Linien) wiesen eine nahezu lineare Beziehung

### 3 Ergebnisse

zwischen den GP-Werten im Bereich von 0,5 bis 0,0 und den Messtemperaturen im Bereich von 6 °C bis 60 °C auf. Die Stämme mit hohem Menachinongehalt DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH (rote Linien) zeigten eine deutlich geringere Steigung, insbesondere bei Temperaturen über 30 °C im Vergleich zu den restlichen Isolat. Die GP-Werte für diese Werte reduzierten sich über den gesamten Messbereich nur von 0,52 bis 0,3. Dies resultierte in einer höheren Membranordnung bei den hoch chinonhaltigen Stämmen DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH im Messbereich von 30-60 °C. Für die Stämme FF 127 und FF 141 (grüne Linien) wurde, im Vergleich zu den Stämmen der Gruppe A und Gruppe B, eine intermediäre Änderung der Membranordnung gemessen.

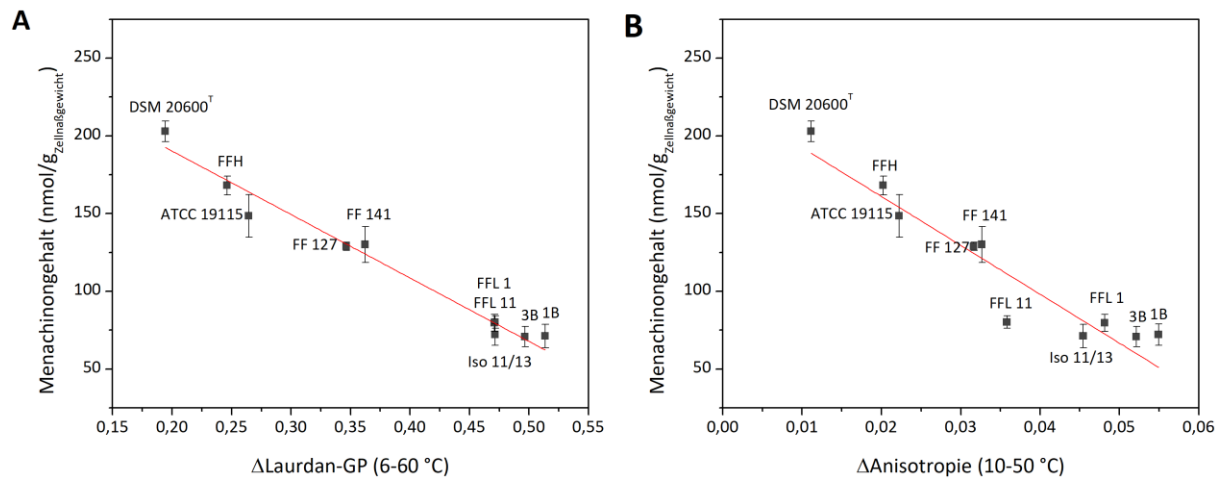


**Abbildung 19: Anisotropie Verläufe der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme.** (A) TMA-DPH-Werte der Stämme DSM 20600T, ATCC 19115, FFL 11, 1B und 3B (48 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) bei 6 °C Wachstumstemperatur. (B) TMA-DPH-Werte der Stämme FFL 1, Iso 11/13, FFH, FF 127 und FF 141 (48 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) bei 6 °C Wachstumstemperatur. Stämme mit hohem (rot), intermediärem (grün) und niedrigem (schwarz) Menachinongehalt sind farblich kodiert. Die Stämme wurden in zwei Unterdiagramme aufgeteilt, um die Lesbarkeit der einzelnen Graphen zu verbessern. Messwerte stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die laterale Diffusion oder Membranfluidität wurde durch die Fluoreszenzanisotropie unter der Verwendung der TMA-DPH Sonde analysiert. Zur besseren Lesbarkeit der Daten wurden die Anisotropieverläufe der 10 Stämme auf zwei Subgrafiken verteilt (Abb. 19). Die Daten dieser Grafik zeigten eine vergleichbare Anisotropie-Temperatur-Beziehung für alle Stämme mit einem niedrigen Menachinongehalt bei 6 °C Wachstumstemperatur (Stämme FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13). Diese Stämme zeigten eine negative Korrelation zwischen Anisotropie und der Messtemperatur. Dabei sank die Anisotropie von einem Wert von 0,26 bei 6 °C auf einen Wert von 0,20 bei 50 °C. Nur bei dem Stamm Iso 11/13 konnte ein konstanter

Anisotropiewert von 0,2 ab 30 °C Messtemperatur gemessen werden und wies damit auf einen vollständigen Phasenübergang der Membran in den fluiden Zustand hin (Abb. 19B). Stämme der Gruppe B zeichneten sich durch eine Zunahme des Menachinongehaltes unter kalten Wachstumsbedingungen aus. Diese Stämme zeigten eine konstantere Membranfluidität, sichtbar durch den geringen Einfluss der Temperatur auf die Anisotropieänderung. Mit anderen Worten war, im Vergleich zu den Stämmen der Gruppe A, der Phasenübergang dieser Membranen deutlich verbreitert worden. Diese Tatsache resultierte in einer signifikant höheren Membranfluidität (entspricht einer niedrigeren Anisotropie) im Vergleich zu den Stämmen mit geringerem Menachinongehalt. Dieser Effekt war bei allen drei Stämmen der Gruppe B zu erkennen, besonders stark ausgeprägt aber in den Stämmen FFH und DSM 20600<sup>T</sup>. Diese Stämme besaßen einen Anisotropiewert von 0,24 (DSM 20600<sup>T</sup>) beziehungsweise 0,22 (FFH) bei 6 °C Messtemperatur. Aufgrund der bereits zuvor genannten Verbreiterung des Phasenübergangs, besaßen diese Stämme einen recht konstanten Anisotropie- oder Fluiditätsverlauf über den gesamten analysierten Temperaturbereich. Die Folge war eine Stabilisation der Anisotropie bei höheren Messtemperaturen einhergehend mit einer geringeren Lipidmotilität im Vergleich zu den Stämmen mit niedrigem Menachinongehalt (Abb. 19A, B).

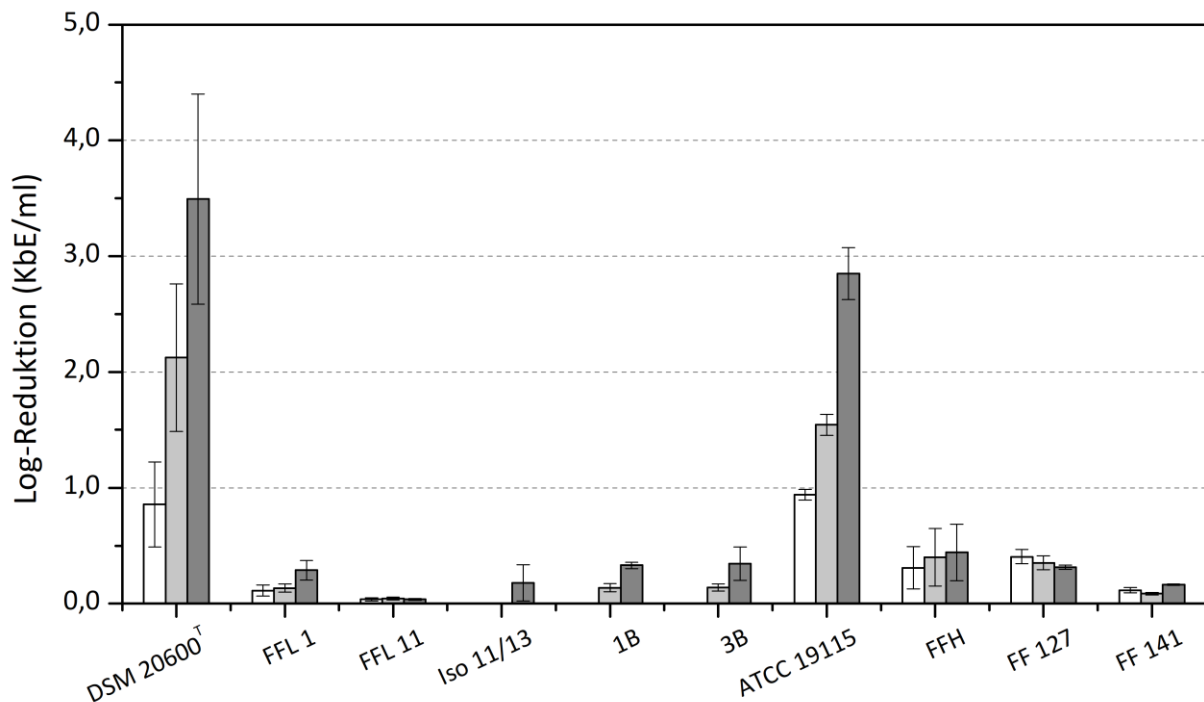
Analog zu der Korrelationsanalyse des Menachinongehaltes und der Ausprägung der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation (Abb. 17) wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem Menachinongehalt und der Änderung der Membranparameter über den Messbereich analysiert (Abb. 20). Dabei ist zu erkennen, dass für beide Membranparameter ein deutlicher Zusammenhang mit der Menachinonkonzentration gegeben war. Für den Zusammenhang von Laurdan-GP und dem Menachinongehalt konnte eine signifikante negative Korrelation ( $r = -0,94, p < 0,01$ ) über den gemessenen Temperaturbereich nachgewiesen werden. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Membranen durch höhere Konzentrationen an isoprenoiden Chinonen im Schnitt eine stärker geordnetere Membran aufweisen. Für den Zusammenhang von TMA-DPH Anisotropie und dem Menachinongehalt ergab sich ein identischer Zusammenhang. Die Daten zeigten eine signifikante, streng negative Pearson-Produkt-Moment-Korrelation ( $r = -0,95, p < 0,01$ ). Zusammengefasst verdeutlichten die Ergebnisse, dass Stämme mit einem höheren Menachinongehalt zwar im Schnitt eine höhere Membranordnung aufwiesen, aber die Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen signifikant verbessert wurde und über einen großen Temperaturbereich im optimalen Bereich vorlag. Die Daten aus Abbildung 20 bestätigen ebenfalls das intermediäre Verhalten der Stämme FF 127 und FF 141 für die GP- und Anisotropie-Analysen.



**Abbildung 20: Korrelation des MK-Gehaltes und der Änderung der Membranordnung sowie -fluidität in *L. monocytogenes* bei 6 °C Wachstumstemperatur.** Änderung der Membranordnung dargestellt als Differenz der Laurdan GP-Werte bei 6 °C und 60 °C Messtemperatur (A). Änderung der Membranfluidität dargestellt als Differenz der Ganzzell-Anisotropie bei 10 °C und 50 °C Messtemperatur (B). Rote Gerade stellt die lineare Regressionslinie der aufgetragenen Datenpunkte dar. Die Pearson-Produkt-Moment-Korrelation beträgt  $r = -0,94$ ,  $p < 0,01$  für A und  $r = -0,95$ ,  $p < 0,01$  für B. Messwerte stellen Mittelwerte dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.1.6 Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen

Ein mehrstufiger Gefrier-Auftau-Stresstest sollte eine mögliche Methode zur Feststellung der Kälteresistenz darstellen. Hierfür wurden die Zellen im spät-exponentiellen Bereich ( $OD_{625\text{ nm}} \sim 1$ ) mittels Zentrifugation gerntet und anschließend gewaschen. Im nächsten Schritt wurden dezimale Verdünnungsreihen erstellt und ausplattiert (Abschnitt 2.1.3). Die Gefrier-Auftau-Zyklen zeigten einen unterschiedlichen Effekt auf die verschiedenen *L. monocytogenes* Stämme (Abb. 21). Alle Lebensmittelisolate zeigten nach drei Gefrier-Auftau-Zyklen keine oder nur eine minimale (bis zu  $\text{Log } 0,4$ ) Reduktion der Lebendzellzahl. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Stämme aus einer Kultursammlung DSM 20600<sup>T</sup> und ATCC 19115 eine deutlich höhere Reduktion der Lebendzellzahl bereits nach dem ersten Gefrier-Auftau-Schritt ( $\text{Log } 1,0$ ). Die Reduktion der Lebendzellzahl nahm mit jedem weiteren Zyklus stetig ab, sodass nach dem dritten Gefrier-Auftau-Schritt eine Reduktion von drei Log-Stufen stattgefunden hatte.



**Abbildung 21: Gefrier-Auftau Stresstest der *L. monocytogenes* Stämme.** Logarithmische Reduktion der Lebendzellzahl der getesteten Stämme nach 1 (weiß), 2 (hellgrau) und 3 (grau) Gefrier-Auftau-Zyklen (je 24 h). Daten stellen Mittelwerte dar (n=3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.1.7 Differentielle Transkriptomanalyse der Kälteanpassung von *L. monocytogenes* FFH

Mit den zuvor genannten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es bei einigen *L. monocytogenes* Stämmen zu einem Anstieg des Menachinongehaltes bei 6 °C Wachstumstemperatur im Vergleich zu 37 °C kam. Daraus resultierte eine starke Korrelation zwischen der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation und dem Menachinongehalt, wobei eine starke Fettsäureverschiebung mit niedrigen Menachinonkonzentrationen einherging und umgekehrt (Abschnitt 3.1.4). Die RNA Extraktion und Aufreinigung erfolgte mit Hilfe eines entsprechenden RNA-Extraktion-Kits (Abschnitt 2.4.4.1). Die differentielle Transkriptomanalyse wurde auf das zuvor erstellte Genom gemappt und die relative x-fache Änderung (englisch *fold-change*) mit entsprechenden Kennzahlen berechnet (Abschnitt 2.4.4.2).

Im Fall von *L. monocytogenes* FFH konnte das Genom aus 15 Contigs ( $\geq 500$  bp) assembliert werden und resultierte in einer Gesamtgröße von 2.888.143 bp. Der GC-Gehalt lag bei 37,9 %.

Das größte Contig war 1.223.693 bp groß, wobei von 28 Contigs 11 Contigs größer als 1000 bp waren und alle weiteren Contigs eine Mindestgröße von 50000 bp aufwiesen. Das Genom wurde bei der DNA-Sequenzdatenbank GenBank hochgeladen. (GenBank WGS Accession Number: VXLE000000000). Der SPAdes Assembler sagte insgesamt 2805 einzigartige Gene voraus, wobei davon 2556 eine Mindestgröße von 300 bp, 357 Gene eine Mindestgröße von 1500 bp und 36 Gene eine Mindestgröße von 3000 bp besaßen. Im nächsten Schritt wurden die RNA-Extrakte sequenziert, analysiert und auf die Gene des zuvor erstellten Genoms gemappt. Die Annotation erfolgte mit Hilfe des RAST Servers (Abschnitt 2.4.4.2). Die Rohdaten der mRNA-Sequenzierung wurden an das NCBI Sequence Read Archive (SRA) mit der Zugangsnummer (PRJNA565874) übermittelt.

Nach Abschluss der differentiellen Transkriptomanalyse wurden insgesamt 2821 einmalige Gene beziehungsweise Reads identifiziert. Die *in situ* Reaktion von *L. monocytogenes* FFH auf die niedrige Wachstumstemperatur im Vergleich zur 37 °C Inkubation äußerte sich in 616 signifikant herunterregulierten Genen und 359 hochregulierten Genen (< 2 *fold change*). Folglich zeigten 1846 Gene keine signifikante Änderung ihrer Expressionsrate bei Änderung der Wachstumstemperatur. Relevante Gene für die Untersuchung von *L. monocytogenes* sind in der Tabelle 8 dargestellt. Für die Menachinonsynthese wurden neun Gene, die Proteine des entsprechenden Synthesewegs kodieren, identifiziert. Dabei handelte es sich zum einen um ein zusammenhängendes *men*-Operon mit den sechs Genen *menABDEFH* (Gen-ID 6 bis 11). Zum anderen wurden die einzeln lokalisierten Gene *menG* (Gen-ID 2403), *menX* (Gen-ID 2583) und *menC* (Gen-ID 2650) vorgefunden. Die Expression der Gene *menA*, *menF* und *menC* war mit einem *fold change* von 1,3 bis 1,5 zwar leicht stärker exprimiert, aber nicht relevant höher. Im Gegensatz zu den restlichen Genen waren die Gene *menE* und *menG* bei 37 °C leicht stärker exprimiert. Im Ganzen fand keine relevante Änderung der Expression statt. Die einzelnen Funktionen der entsprechenden Gene können der Tabelle 8 entnommen werden. Eine signifikante Zunahme der Expression konnte für die MK-7 spezifische Heptaprenyl-Diphosphat-Synthase (2-fache Steigerung) detektiert werden. Als Indikatoren für kalte Wachstumsbedingungen konnten die Expressionssteigerungen des Kälteschock-Protein A (*CspA*) sowie insgesamt über 30 Flagellen-assoziierte Gene kodierend, zum Beispiel für Proteine der Flagellenbiosynthese gefunden werden. Diese Flagellen-assoziierten Gene gehörten zu den am stärksten induzierten Genen bei niedrigen Temperaturen. Die Flagellen-Biosynthesepoteine *FliR*, *FliQ*, *FliP* (Gen-ID 992-994) zeigten im Durchschnitt eine 12-fache Zunahme der Expression bei niedrigen Temperaturen. Das *cspA*-Gen wurde 3,7-fach stärker

exprimiert. Einen weiteren Indikator sollten Gene assoziiert mit der Aufnahme oder Synthese von kompatiblen Soluten darstellen. In der Literatur sind hier hauptsächlich Carnitin sowie Betain genannt (WEMEKAMP-KAMPHUIS *et al.*, 2004). Es wurden mehrere entsprechende Gene der Synthese und des Transportes gefunden und verifiziert. In dem Stamm FFH konnte jedoch keine relevante Expressionsänderung vorgefunden werden. Das Wachstum bei 37 °C konnte anhand der reduzierten Expressionsraten des *actA*-Gens bei niedrigen Temperaturen verifiziert werden. Das für den Aktin-Aufbau relevante Gen wurde bei 37 °C 90-fach stärker exprimiert. Eine korrekte Analyse konnte zusätzlich anhand der Expressionsmuster von *housekeeping*-Genen beurteilt werden. Dabei handelt es sich um Gene basaler Funktionen, wie zum Beispiel die Replikation der DNA, die in der Regel gleich stark induziert sind (ROCHA *et al.*, 2015). In diesem Fall eigneten sich am besten die Gene *gyrA*, *gyrB* und *secA*. Diese zeigten keine Änderung (im Schnitt 1,0-fache Änderung der Expression) bei den unterschiedlichen Temperaturbedingungen.

**Tabelle 8: Auswahl an differentiell exprimierten Genen von *L. monocytogenes* FFH.** Änderungen der Expressionsrate von relevanten Kälte-spezifischen Genen bei der Temperaturabsenkung von 30 °C auf 10 °C. Die Transkriptomanalyse erfolgte im Dreifachansatz.

Gen_ID	Gen	Funktion	Fold change
<b>Temperaturverifikation</b>			
(Flagellen assoziierte Gene, <i>Cold Shock</i> Gene, Aktin-assoziierte Gene)			
321	<i>cpsA</i>	Kälteschockprotein A (CspA)	3,7
992	<i>fliR</i>	Flagellares Biosyntheseprotein FliR	11,2
993	<i>fliQ</i>	Flagellares Biosyntheseprotein FliQ	12,7
994	<i>fliP</i>	Flagellares Biosyntheseprotein FliP	13,2
1238	<i>actA</i>	Actin-Assemblierung induzierendes Protein ActA	-89,5
<b>Menachinonbiosynthese</b>			
6	<i>menA</i>	1,4-Dihydroxy-2-naphthoat-polyprenyltransferase	1,3
7	<i>menF</i>	Menachinon-spezifische Isochorismatsynthase	1,3
8	<i>menD</i>	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylat Synthase	1,2
9	<i>menH</i>	2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylat Synthase	1,2

Tabelle 8 fortgeführt:

Gen_ID	Gen	Funktion	Fold change
10	<i>menB</i>	Naphthoatsynthase	1,1
11	<i>menE</i>	O-Succinylbenzoat-CoA Ligase	-1,4
1664+1665		Heptaprenyl Diphosphate Synthase I + II	2,0
2403	<i>menG</i>	2-Heptaprenyl-1,4-naphthoquinone Methyltransferase	-1,1
2583	<i>menX</i>	Menachinonbiosynthese bezogenes Protein MenX	1,2
2650	<i>menC</i>	O-Succinylbenzoatsynthase	1,5
<b>Referenzgene (<i>housekeeping</i>-Gene)</b>			
1091	<i>secA</i>	Protein-Export Cytoplasmprotein	1,0
1437	<i>gyrA</i>	DNA Gyraseuntereinheit A	-1,1
1438	<i>gyrB</i>	DNA Gyraseuntereinheit B	-1,0

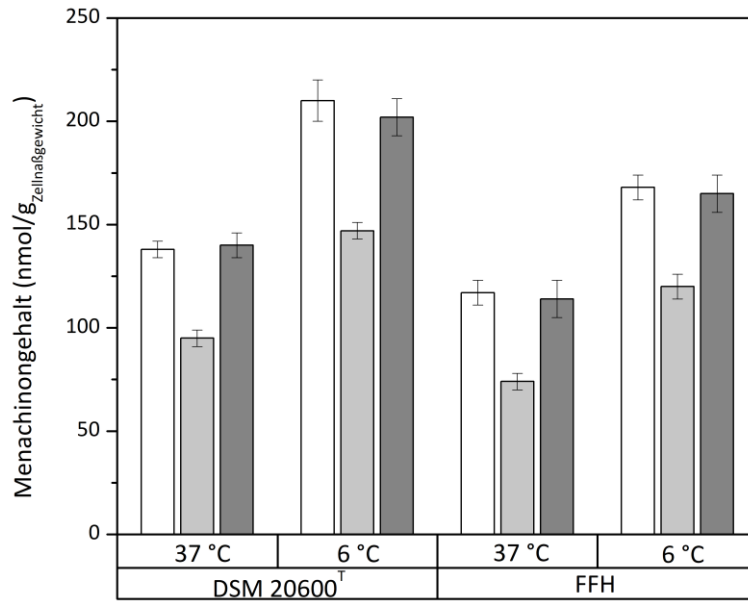
### 3.1.8 Modifikation des Menachinongehaltes in den *L. monocytogenes* Stämmen DSM 20600<sup>T</sup> und FFH

Die hohe Anzahl an getesteten *L. monocytogenes* Stämmen erlaubte es verschieden stark ausgeprägte Fettsäure-abhängige Kälteadaptationen zu detektieren und diese mittels des neu etablierten  $\Delta$ WAMT-Wertes zu quantifizieren. Anschließend wurden Stämme mit einer starken Fettsäureanpassung in Gruppe A eingeordnet und Stämme mit einer schwachen Fettsäure-abhängigen Adaptation in Gruppe B (Abschnitt 3.1.3). Diese Einteilung konnte für die untersuchten Stämme auch bezüglich ihres Menachinongehaltes übernommen werden (Abschnitt 3.1.4). Gruppe A Stämme zeichneten sich durch eine niedrige Konzentration aus im Gegensatz zu den Gruppe B Stämmen, die eine hohe Konzentration aufwiesen. Nachdem die Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen Unterschiede in den untersuchten Membranparametern gezeigt haben, konnte man in diesem Fall von einer zusätzlichen Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation der Membran ausgehen (Abschnitt 3.1.5). Um auszuschließen, dass andere Zellvorgänge, die bei einer niedrigen Temperatur auftreten und möglicherweise ebenfalls die Membraneigenschaften



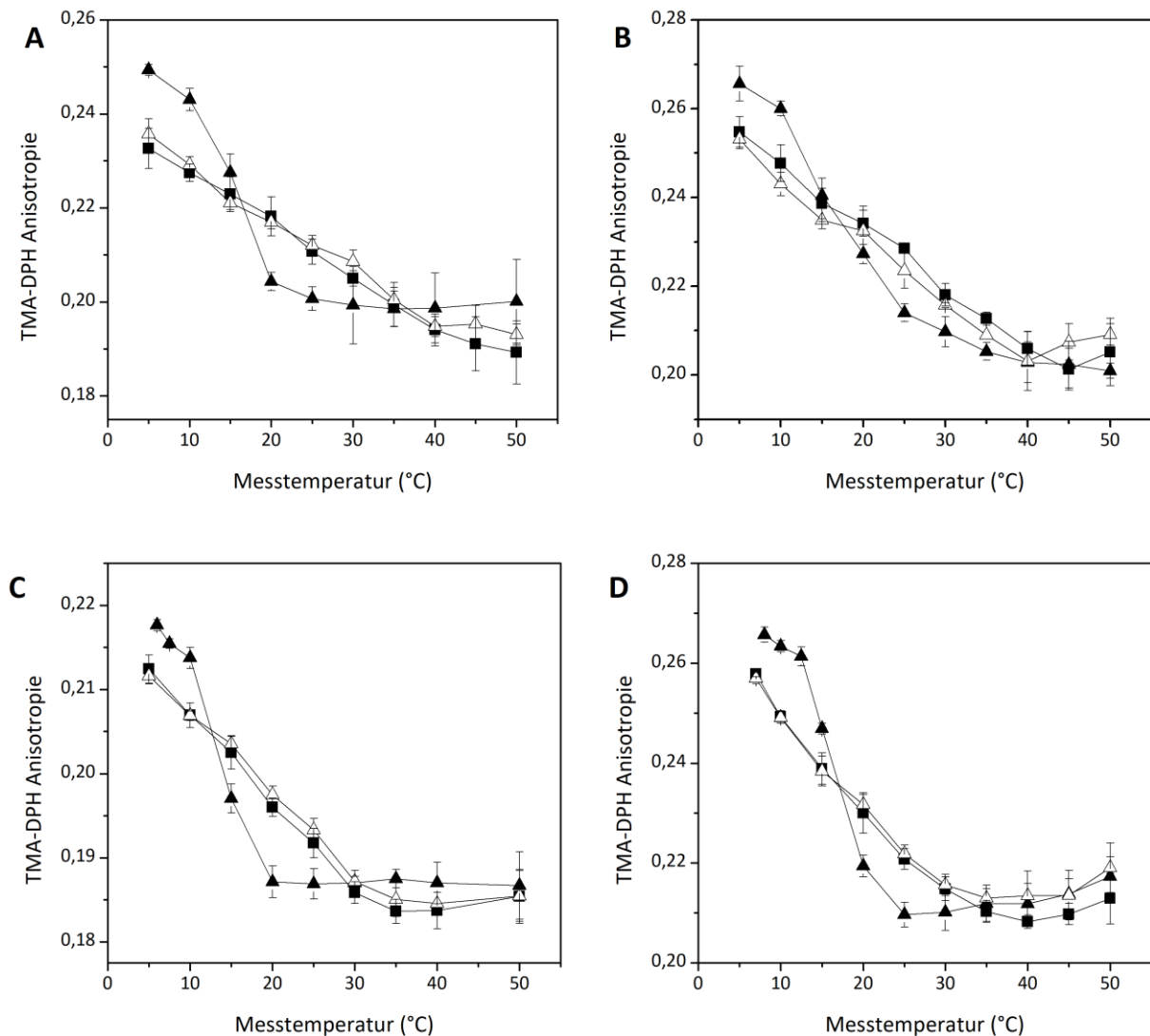
beeinflussen, wurde nach einem Weg geschaut, um die Auswirkung der Menachinone zu verifizieren. Zu Beginn sollte der Gehalt an isoprenoiden Chinonen durch eine Supplementation mit Vitamin K<sub>1</sub> erhöht werden. Wie unter Abschnitt 3.2.7 ausführlicher beschrieben, konnte keine Vitamin K<sub>1</sub> Supplementation ohne den Einsatz eines Emulgators erfolgen. Beim Einsatz von Ethanol wurden die Membraneigenschaften deutlich von diesem Lösemittel beeinflusst und die Fluidität stark erhöht. Aber auch die Verwendung von DMSO zeigte diesen Effekt und konnte nicht verwendet werden.

Um nun den Einfluss der Menachinonkonzentration auf die Membranfluidität sowie -ordnung zu bestätigen, wurde eine Rückkopplungs-basierte Inhibition der Menachinonsynthese wie von TSUKAMOTO *et al.* (2001) für *Bacillus subtilis* beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde die Feedback-Inhibition der Menachinonsynthese durch die Supplementierung mit drei aromatischen Aminosäuren, L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin, bewerkstelligt. Die Grundlage für diese Interaktion stellt der gemeinsame Syntheseweg des Chinonrückgrats und der aromatischen Aminosäuren über den Shikimat-Syntheseweg dar. Liegt dabei eine hohe Konzentration der aromatischen Aminosäuren vor, wird die Synthese der aromatischen Aminosäuren durch eine negative Rückkopplung inhibiert. Gleichzeitig sinkt die Syntheserate für das Chinonrückgrat, sodass es zu einer Reduktion des Menachinongehaltes kommt. In dieser Arbeit wurden die beiden Stämme FFH und DSM 20600<sup>T</sup> aufgrund des hohen Menachinongehaltes für eine Hemmung der Menachinonsynthese ausgewählt und entsprechend Abschnitt 2.1.1 mit aromatischen Aminosäuren supplementiert. Die in Abbildung 22 dargestellten Daten zeigen die Reduktion des Menachinonkonzentration in den *L. monocytogenes* Stämmen FFH und DSM 20600<sup>T</sup> bei 6 °C und 37 °C Wachstumstemperatur. Wie erwartet, sank der Menachinongehalt in beiden Stämmen nach der Supplementierung mit aromatischen Aminosäuren bei beiden Wachstumstemperaturen um etwa 30 bis 40 %. Als Negativkontrolle wurden die nicht aromatischen Aminosäuren L-Alanin, L-Cystein und L-Serin in denselben Konzentrationen in einem separaten Kontrollansatz zugegeben. Die Auswahl dieser Kontroll-Aminosäuren wurde aufgrund der ähnlichen Polaritäten zu L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin gewählt. Bei den Negativkontrollen konnte kein Rückgang der Menachinonkonzentration festgestellt werden (Abb. 22).



**Abbildung 22: Auswirkung der Supplementation mit aromatischen Aminosäuren in *L. monocytogenes* DSM 20600<sup>T</sup> und FFH.** Weiß, ohne Supplementation. Hellgrau, Zugabe von je 180 mg/l L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin. Grau, Zugabe von je 180 mg/l L-Alanin, L-Cystein und L-Serine. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Der verminderte Gehalt an Menachinon zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Membranfluidität, gemessen mittels TMA-DPH Anisotropie. Die in Abbildung 23 dargestellten Daten veranschaulichen den Einfluss des Menachinongehaltes auf die Lipidmobilität in Abhängigkeit von der Temperatur. In beiden Stämmen führte der gesunkene Menachinongehalt zu einer geringeren Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen (< 20 °C), während bei höheren Temperaturen (> 20 °C) eine höhere Membranfluidität, im Vergleich zu einem un-supplementierten Ansatz, beobachtet werden konnte. Dadurch verkleinerte sich der Phasenübergang in den Ansätzen mit reduziertem Menachinongehalt und wurde durch die größere negative Steigung der Kurvenverläufe verdeutlicht. Dieser Effekt trat bei beiden Wachstumstemperaturen 6 °C und 37 °C auf. Die Anisotropieverläufe der Kontrollansätze zeigten einen identischen Verlauf zu den nicht supplementierten Ansätzen und haben somit einen Einfluss der zugesetzten Aminosäuren auf die Membranfluidität ausgeschlossen (Abb. 23). Das deutete darauf hin, dass die Veränderung der Membranfluidität auf die Veränderung der Menachinonkonzentration zurückzuführen ist. Als weitere Kontrolle wurde das FAME-Profil der mit aromatischen Aminosäuren supplementierten Ansätze bestimmt. Es zeigte sich keine Veränderung des Fettsäureprofils (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 23: Auswirkung der Supplementation mit aromatischen Aminosäuren auf die Membranfluidität, gemessen anhand der TMA-DPH Anisotropie (150 mM KCl-Lösung, pH 7,0), in den *L. monocytogenes* Stämmen FFH und DSM 20600<sup>T</sup>.** Diagramme A (6 °C) und B (37 °C) zeigen die Anisotropieverläufe für den Stamm FFH bei den entsprechenden Wachstumstemperaturen. Diagramme C (6 °C) und D (37 °C) zeigen die Anisotropieverläufe für den Stamm DSM 20600<sup>T</sup> bei den entsprechenden Wachstumstemperaturen. Geschlossenes Quadrat, ohne Supplementation. Geschlossenes Dreieck, Supplementation mit je 180 mg/l L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin. Offenes Dreieck, Supplementation mit je 180 mg/l L-Alanin, L-Cystein und L-Serine. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

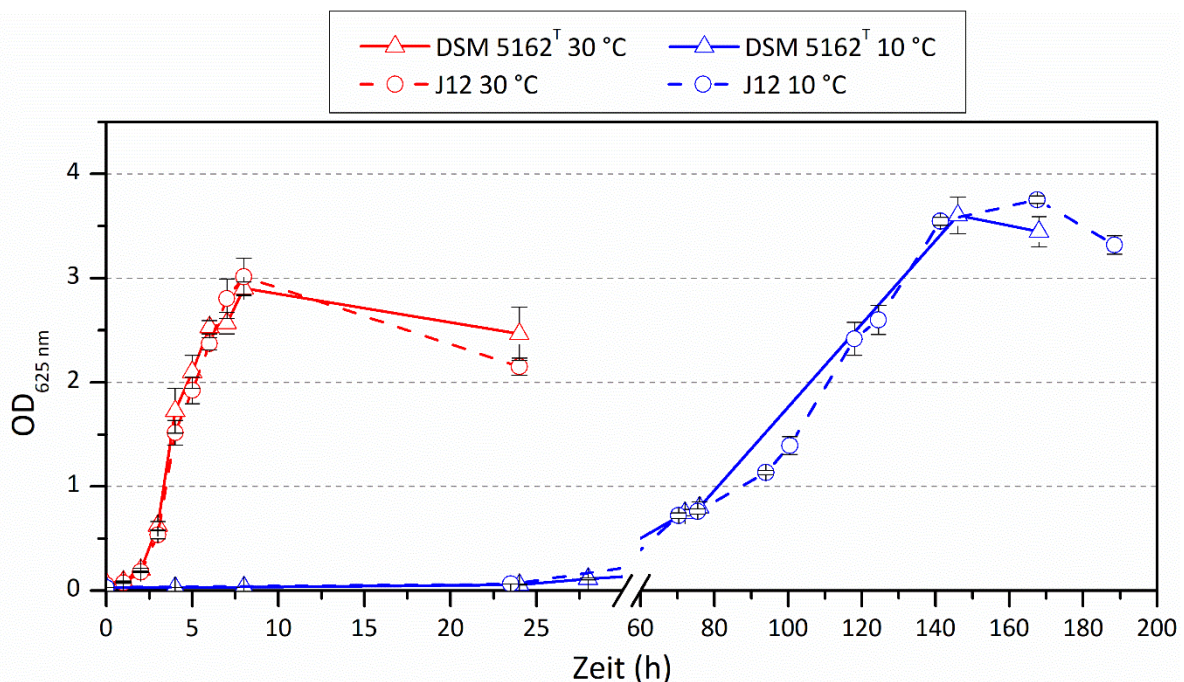
### 3.2 Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation in *Paenibacillus glucanolyticus* bei niedrigen Temperaturen

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Menachinon-modifizierten Kälteanpassung in den zuvor beschriebenen *Listeria*-Stämmen, sollte diese Fettsäure-unabhängige Membranmodifikation

ebenfalls in *P. glucanolyticus* J12 untersucht werden. Als Referenz für das Lebensmittelisolat wurde der Typstamm DSM 5162<sup>T</sup> gewählt und sollte gegebenenfalls Stamm-spezifische Unterschiede aufzeigen.

### 3.2.1 Wachstumsverlauf der beiden untersuchten *P. glucanolyticus* Stämme

Für die erste Einschätzung der Kälteanpassung und der gewährleisteten Vergleichbarkeit aller durchgeführten Messungen wurde der Wachstumsverlauf der beiden *P. glucanolyticus* Stämme bei den beiden untersuchten Wachstumstemperaturen 30 °C und 10 °C bestimmt. Der gemittelte Verlauf der jeweiligen Dreifachansätze ist arithmetisch in Abbildung 24 dargestellt. Zur Bestimmung der maximalen Wachstumsraten und der Beurteilung der einzelnen Wachstumsphasen wurde die halb-logarithmische Darstellung verwendet (Anhang 1).



**Abbildung 24:** Arithmetische Darstellung des Wachstumsverlaufs von *P. glucanolyticus* DSM 5162<sup>T</sup> und J12 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Unterbrochene x-Achse zwischen 30-60 h. Datenpunkte stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme J12 und DSM 5162<sup>T</sup> zeigte bei beiden Temperaturen eine starke Übereinstimmung auf. Bei 30 °C war keine eindeutige Lag-Phase, anhand des ersten einstündigen Messfensters, zu erkennen (Anhang 1). Nach vier Stunden

flachte die exponentielle Phase ab und ging in die stationäre Phase über. Die Trübungsmessung ergab eine maximale Zelldichte von  $OD_{625\text{ nm}} \sim 3$  nach circa acht Stunden. Nach 24 h war eine Reduktion der Zelldichte messbar. Maximale Wachstumsraten bei 30 °C waren mit  $1,08\text{ h}^{-1}$  für Stamm DSM 5162<sup>T</sup> und  $1,07\text{ h}^{-1}$  für Stamm J12 beinahe identisch. Das entsprach einer Verdopplungszeit von circa 40 min. Die Reduktion der Temperatur auf 10 °C hatte eine wesentliche Verringerung der Wachstumsraten zur Folge. Eine Lag-Phase konnte nicht beobachtet werden, die exponentielle Phase flachte nach circa 80 h ab und ging nach 150 h in die stationäre Phase über. Die maximale Zelldichte von  $OD_{625\text{ nm}} \sim 3,5$  bei wurde nach circa 150 h erreicht und bedeutete eine 17-%-ige Steigerung des Zellertrages bei 10 °C gegenüber 30 °C. Die niedrige Temperatur reduzierte die maximale Wachstumsrate auf  $0,05\text{ h}^{-1}$  (entspricht einer Verdopplung alle 13 h) für beide Stämme und stellte somit eine 22-fache Reduktion zur Wachstumsrate bei 30 °C dar (Tab. 9).

**Tabelle 9: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der *P. glucanolyticus* Stämme.** Unterteilt nach den Wachstumstemperaturen von 30 °C und 10 °C im TSB-Medium. Daten stellen Mittelwerte dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Das  $\pm$ -Zeichen stellt die Standardabweichung dar. Dem zweiseitigen  $t$ -Test nach, zeigten die beiden Stämme keinen statistisch signifikanten Unterschied bei der jeweiligen Temperatur auf.

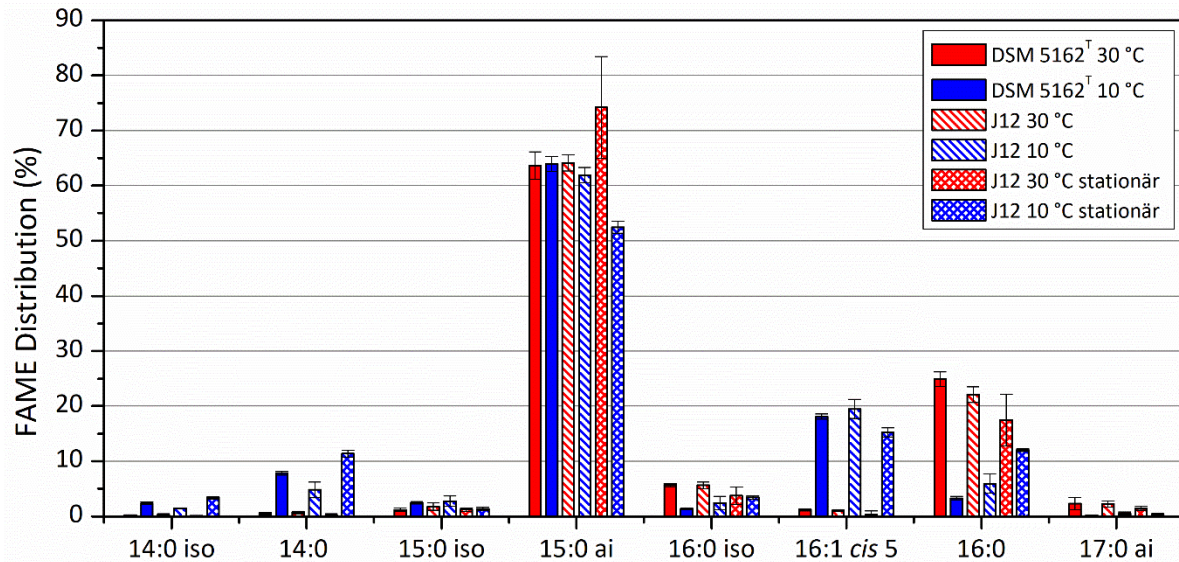
Stamm	30 °C		10 °C	
	Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )	Verdopplungszeit (h)	Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )	Verdopplungszeit (h)
DSM 5162 <sup>T</sup>	$1,08 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,03$	$0,053 \pm 0,001$	$13,0 \pm 0,2$
J12	$1,07 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,02$	$0,052 \pm 0,001$	$13,4 \pm 0,3$

### 3.2.2 Fettsäureanalyse und das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung in *P. glucanolyticus*

Wie zuvor bestand der erste Schritt in der Bestimmung der Fettsäureprofile bei beiden untersuchten Wachstumstemperaturen, um damit eine Aussage über das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung der Zellmembran treffen zu können (Abschnitt 2.2.1). Zusätzlich wurde für Stamm J12 die Fettsäurezusammensetzung im stationären Bereich gemessen, da sich im späteren Verlauf der Arbeit zeigte, dass eine Zunahme des Menachinongehaltes erst in diesem Wachstumsbereich stattfand. Die jeweiligen FAME-Profile und berechneten WAMT-Werte sind in der Tabelle 10 aufgelistet. Ein zusätzliches Säulendiagramm der FAME-

### 3 Ergebnisse

Distribution wurde erstellt, um die Fettsäureverschiebung, bedingt durch die Änderung der Wachstumstemperatur, klarer und sichtbarer darzustellen (Abb. 25). Hierfür wurden nur Fettsäuren mit einem Mindestanteil von 1 % aufgetragen.



**Abbildung 25: FAME Distribution von *P. glucanolyticus* als Säulendiagramm.** Detektierte FAMEs mit mindestens 1%-Anteil der beiden Stämme DSM 5162<sup>T</sup> und J12 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Zusätzliches FAME-Muster des Stamms J12 im stationären Wachstumsbereich. Iso = Acylkette mit einer Methyl-Verzweigung am vorletzten C-Atom; ai (anteiso) = Acylkette mit einer Methyl-Verzweigung am vorvorletzten C-Atom. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Konform zu den Wachstumsverläufen und -raten zeigten sich bei den FAME-Profilen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Stämmen DSM 5162<sup>T</sup> und J12. Die Hauptfettsäuren bei 30 °C waren 15:0 anteiso mit ~60 % und 16:0 mit einem Anteil von ~20 %. Bei den Nebenfettsäuren handelte es sich um 16:0 iso (~6 %) und 17:0 anteiso (~2 %). Die restlichen Fettsäuren besaßen einen Anteil von 1 % oder weniger. Mit der Reduktion der Wachstumstemperatur auf 10 °C zeigte sich eine distinkte Verschiebung der Fettsäurezusammensetzung (Abb. 25). Ausgenommen hiervon war die am stärksten vertretene Fettsäure 15:0 anteiso, die bei beiden Temperaturen einen Anteil von circa 60 % einnahm. Der dominierende Anpassungsmechanismus zeigte sich in der Einführung von Doppelbindungen, sodass der entsprechende Anteil der gesättigten FS 16:0 in die korrespondierende, einfach ungesättigte Fettsäure 16:1 *cis* 5 modifiziert wurde. Eine geringere Anpassung zeigte sich in der Verwendung von kürzeren Fettsäuren. Die größte Änderung konnte bei der zweiten Hauptfettsäure beobachtet werden, die bei 10 °C, die ungesättigte Fettsäure 16:1 *cis* 5 mit einem Anteil von ~20 % war. Der Anteil der entsprechenden gesättigten Fettsäure 16:0

reduzierte sich auf ~5 %. Bei den Nebenfettsäuren zeigte sich eine klare Verschiebung hin zu den kurzkettigen Fettsäuren 14:0 (5-8 %) und 14:0 iso (~2 %). Für die Berechnung der WAMT-Werte wurde eine Einschränkung in Kauf genommen. Literaturwerte für die Schmelztemperatur für 16:1 *cis* 5 wurden nicht vorgefunden. Folglich wurde mit einem Näherungswert, dem bekannten Schmelzpunkt für 16:1 *cis* 9, gerechnet. Für beide Stämme konnten somit ähnliche WAMT-Werte für die entsprechenden Wachstumstemperaturen berechnet werden (Tab. 10), sodass auch die  $\Delta$ WAMT-Werte mit 11 °C für DSM 5162<sup>T</sup> und 10 °C für J12 auf ein gleichwertiges Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung hindeuteten.

**Tabelle 10: FAME-Verteilung von *P. gluconolyticus*.** Detektierte FAMEs der beiden Stämme DSM 5162<sup>T</sup> und J12 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Zusätzliches FAME-Muster des Stamms J12 im stationären Wachstumsbereich. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3). Schmelztemperaturen der einzelnen Fettsäuren für die Berechnung der WAMT-Werte wurden aus der Publikation von KNOTHE & DUNN (2009) entnommen.

Wachstumstemperatur								
FAME (%)	Stamm		DSM 5162 <sup>T</sup>		J12		J12 stationär	
	10 °C	30 °C	10 °C	30 °C	10 °C	30 °C	10 °C	30 °C
14:0 iso	2,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	1,5 ± 0,4	0,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1		
14:0	7,8 ± 0,4	0,5 ± 0,2	4,8 ± 1,4	0,7 ± 0,2	11,4 ± 0,7	0,2 ± 0,2		
15:0 iso	2,5 ± 0,2	1,2 ± 0,3	2,8 ± 0,5	1,8 ± 0,6	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,3		
15:0 anteiso	63,9 ± 1,3	63,6 ± 2,5	61,9 ± 1,4	64,1 ± 1,5	52,5 ± 1,1	74,2 ± 9,2		
16:0 iso	1,4 ± 0,2	5,7 ± 0,3	2,5 ± 1,2	5,6 ± 0,6	3,4 ± 0,4	3,7 ± 1,6		
16:1 <i>cis</i> 5*	18,1 ± 0,5	1,2 ± 0,2	19,5 ± 1,7	1,1 ± 0,1	15,2 ± 0,8	0,4 ± 0,2		
16:0	3,3 ± 0,4	24,9 ± 1,3	6,0 ± 1,8	22,1 ± 1,4	12,0 ± 0,8	17,5 ± 4,6		
17:0 iso	n.d.	0,3 ± 0,2	n.d.	n.d.	0,1 ± 0,1	n.d.		
17:0 anteiso	0,2 ± 0,1	2,3 ± 1,1	0,5 ± 0,3	2,3 ± 0,6	0,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3		
WAMT (°C)	25,3	36,4	25,5	35,0	31,2	32,5		
$\Delta$ WAMT (°C)		11,1		9,5		1,3		

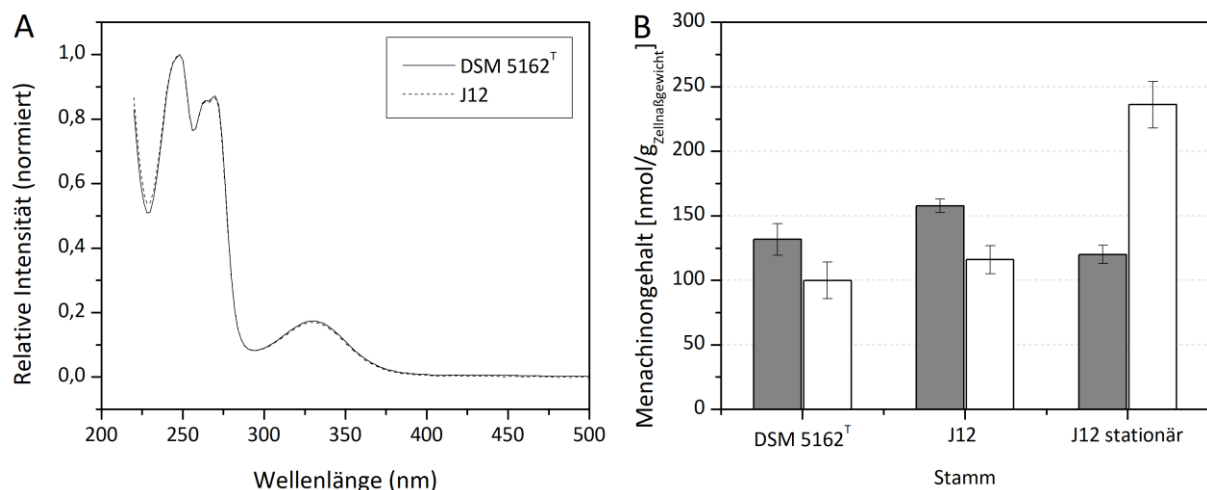
\*Schmelztemperatur für 16:1 *cis* 5 in der Literatur nicht vorgefunden. Als Näherungswert wurde der Schmelzpunkt von 16:1 *cis* 9 verwendet.

Die Verteilung der Fettsäuren des Stammes J12 im stationären Bereich zeigte sichtbare Unterschiede zum spät-exponentiellen Bereich. Bei 30 °C änderte sich die Verteilung der

Hauptfettsäuren zu Gunsten von 15:0 anteiso auf ~75 %, wodurch sich der Anteil von 16:0 auf 18 % reduzierte. Die 10 °C Inkubation zeigte eine analoge Anpassung der Fettsäuren zu den zuvor beschriebenen spät-exponentiellen Proben. Im Gegensatz zu den 30 °C Proben verlagerte sich der Anteil zu Gunsten von 16:0 (12 %) und hatte eine Reduktion der Hauptfettsäure 15:0 anteiso auf ~50 % zur Folge. Daraus resultierte eine leichte Abnahme des WAMT-Wertes bei 30 °C von 35 °C auf 32,5 °C und ein deutlicher Anstieg der WAMT-Werte bei 10 °C von 25,5 °C auf 31,2 °C. Somit besaßen die stationären Ansätze einen  $\Delta$ WAMT-Wert von nur 1 °C und deuteten somit auf ein geringeres Ausmaß der Membranmodifikation über die Fettsäuren hin. Eine quantitative Änderung des Fettsäuregehalt bei den beiden Wachstumstemperaturen konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3 Quantitative Bestimmung des isoprenoiden Chinongehaltes in *P. glucanolyticus*

Isoprenoide Chinone wurden, wie zuvor beschrieben, nach einer modifizierten Methode von Hu *et al.* (1999) aus nassen Zellen extrahiert (Abschnitt 2.2.2). Das Augenmerk der verwendeten Methode, hinsichtlich der quantitativen Analyse, lag auf einer möglichst vollständigen Extraktion mit einer zeitgleichen Minimierung der Verluste.



**Abbildung 26: Menachinonspektren und -gehalt in *P. glucanolyticus*.** A: Darstellung der detektierten Menachinonspektren der beiden *P. glucanolyticus* Stämme. B: Gesamtchinongehalt (nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub>) in den Stämmen DSM 5162<sup>T</sup> und J12 im spät-exponentiellen sowie J12 im stationären Wachstumsbereich bei 30 °C (grau) und 10 °C Wachstumstemperatur (weiß). Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



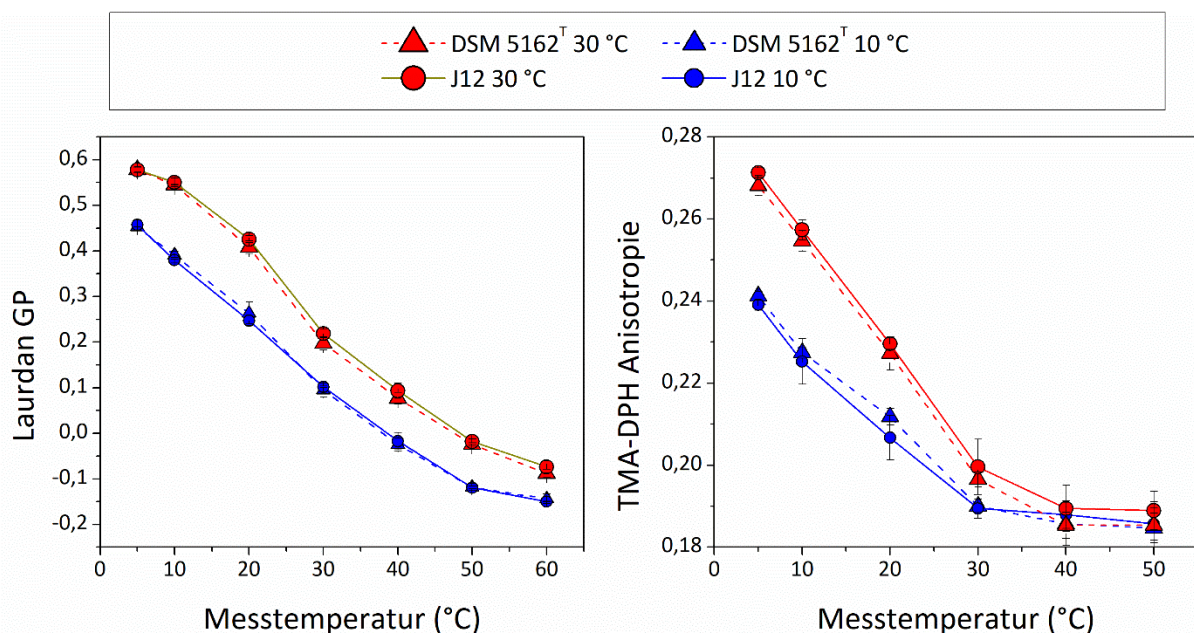
Für beide Stämme konnte ein Gehalt von circa 150 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> bestimmt werden (Abb. 26). Die 10 °C Inkubation hatte daraufhin eine 30-%-ige Reduktion des Menachinongehaltes auf mittlere 110 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> zur Folge. Diese Ergebnisse waren widersprüchlich zu einer vorher gemessenen Erhöhung des Chinongehaltes bei niedrigen Temperaturen des Stammes J12 (DERICHS 2015). Der Vergleich der Wachstumsbedingungen zeigte, dass bei DERICHS (2015) die Zellenernte erst in der stationären Phase erfolgte. Folgend wurden zusätzliche Messungen mit dem Stamm J12 im stationären Bereich durchgeführt. Die Daten in Abbildung 26 zeigen für Stamm J12 im stationärem Bereich eine Verdoppelung des Menachinongehaltes bei 10 °C auf 240 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> im Vergleich zu den Ergebnissen des exponentiellen Bereichs. Geerntet bei 30 °C im stationärem Bereich zeigte sich eine geringe Reduktion des Menachinongehaltes auf 120 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub>. Bei allen Messungen bei 30 °C sowie 10 °C wurde neben dem ISTD (RT = 4,87 ± 0,06 min) nur ein weiterer Peak (RT<sub>DSM 5162T</sub> = 6,74 ± 0,04 min; RT<sub>J12</sub> = 6,75 ± 0,05 min) detektiert. Die Absorptionsspektren sind in Abbildung 26A dargestellt. Diese waren für die beiden Stämme identisch und konnten anhand der Peaks bei 248 nm, 261 nm, 270 nm und 325 nm als Menachinon klassifiziert werden. Die relativen Retentionszeiten zum verwendeten Vitamin K<sub>1</sub> Standard ergaben für beide Stämme eine RT-Ratio von 1,38, sodass Menachinon-7 (MK-7) als einziges isoprenoides Chinon identifiziert werden konnte.

#### **3.2.4 Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in *P. glucanolyticus***

Messung der biophysikalischen Parameter der Zellmembran erfolgte mit Hilfe der Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessung (Abschnitt 2.3). Für beide Stämme zeigten sich identische GP-Werte für die jeweilige Wachstumstemperatur (Abb. 27A). Auch die Reduktion der Wachstumstemperatur äußerte sich in einer identischen Änderung des GP-Verlaufes. Die 30 °C inkubierten Kulturen zeigten bei einer Messtemperatur von 5 °C und 10 °C hohe GP-Werte zwischen 0,55-0,60. Die geringe Änderung der GP-Werte in diesem Temperaturbereich deutete auf den beinahe kompletten Übergang der Membran zur soliden-geordneten (S<sub>0</sub>) Gel-artigen Zellmembran hin. Mit zunehmender Messtemperatur verstärkte sich die Abnahme des GP-Wertes, wobei ein Wendepunkt bei 30 °C erkennbar war. Bei 60 °C Messtemperatur wurde ein mittlerer GP-Wert von -0,05 ermittelt. Die Reduktion der Wachstumstemperatur auf 10 °C hatte eine Verschiebung des GP-Verlaufes hin zu niedrigeren Temperaturen (x-Achse) zur Folge.

### 3 Ergebnisse

Bei 5 °C besaßen die Zellen eine geringere Membranordnung, im Vergleich zu den 30 °C inkubierten Kulturen, die sich in einem GP-Wert von circa 0,45 äußerte. Eine Abflachung war in diesem Fall bei niedrigen Messtemperaturen nicht zu erkennen. Vergleichbar zu den 30 °C inkubierten Proben nahmen mit steigender Messtemperatur die GP-Werte ab und implizierten somit eine stetige Zunahme der Membranunordnung. Im Gegensatz zu den 30 °C Proben konnte eine deutliche Abflachung der Kurve bei hohen Temperaturen zwischen 50 und 60 °C beobachtet werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass die angepasste Membran der 10 °C inkubierten Kulturen, aufgrund der niedrigeren Schmelztemperatur der Membran (Abschnitt 3.2.2), einen beinahe vollständigen Übergang der Membran zum fluiden-ungeordneten ( $L_d$ ) Zustand erreichte. Analog zu den zuvor gezeigten Ergebnissen konnten auch in diesem Fall keine Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Stämmen ausgemacht werden. Aufgrund der ähnlichen Menachinonkonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase war dieser GP-Verlauf zu erwarten. Die leicht gesunkene Membranrigidität der 10 °C Kulturen war aufgrund der geänderten Fettsäureprofile ebenfalls zu erwarten.

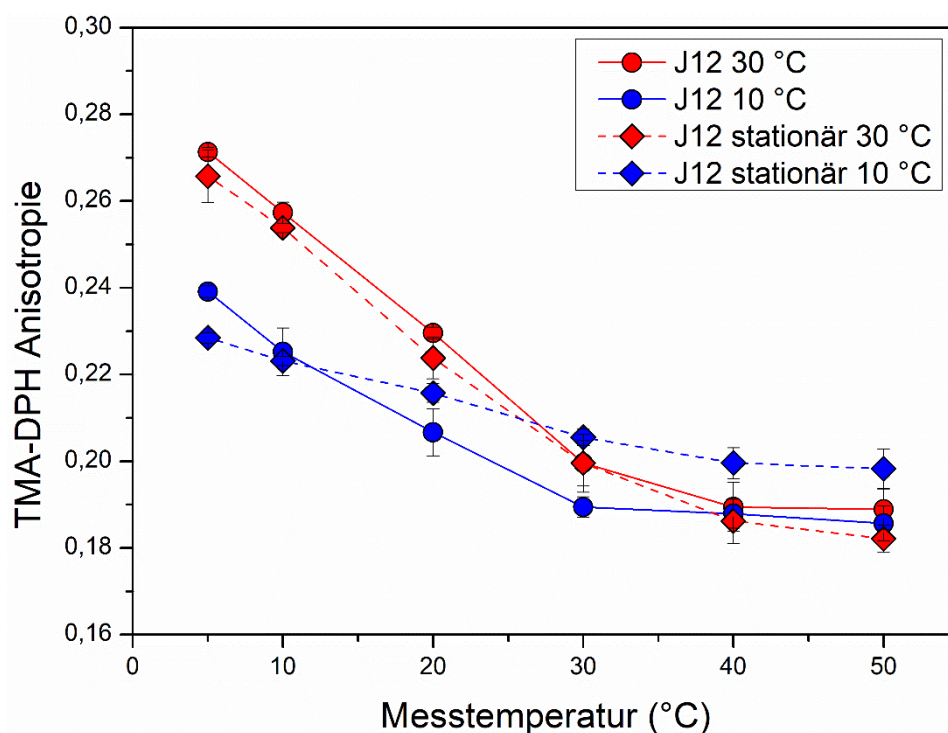


**Abbildung 27: Laurdan-GP und TMA-DPH Messung von *P. glucanolyticus*.** Bestimmung von Laurdan-GP als ein Maß der Membranordnung und TMA-DPH als ein Maß der Membranfluidität in den beiden Stämmen DSM 5162<sup>T</sup> und J12. Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Daten stellen Mittelwerte dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Als zweiter Membranparameter wurde mit Hilfe der Sonde TMA-DPH die Motilität der einzelnen Lipide und somit die Membranfluidität direkt gemessen (Abb. 27B). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Stämmen. Die 30 °C inkubierten

80

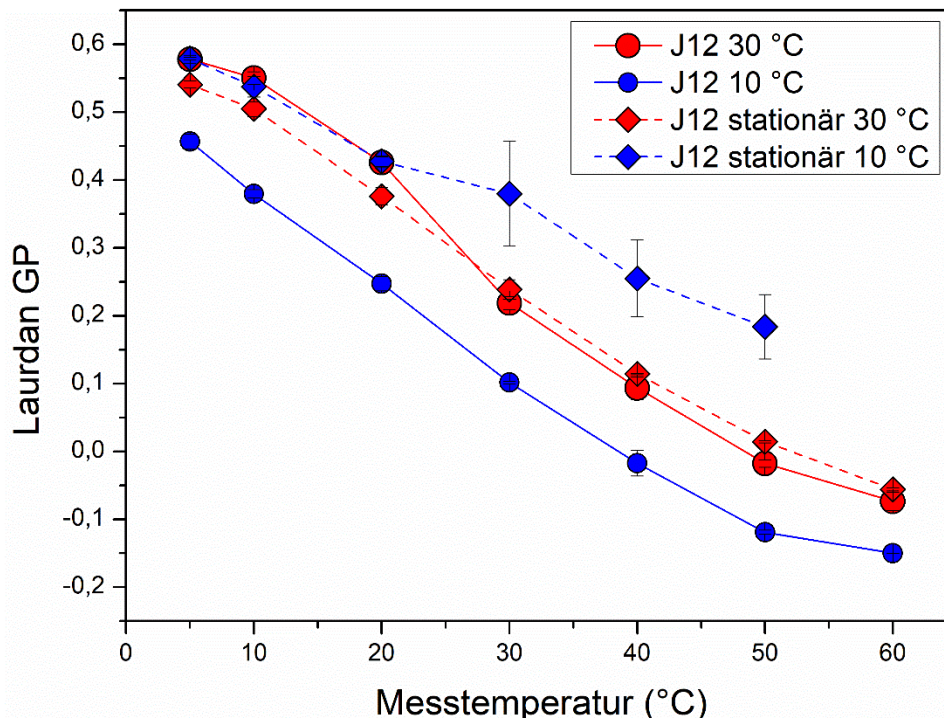
Kulturen zeigten einen GP-Wert von  $\sim 0,27$  bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die zunehmende Messtemperatur äußerte sich in einer stetigen Abnahme der Anisotropie bis  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wobei ein Wert von  $\sim 0,19$  erreicht wurde. Die weitere Erhöhung der Temperatur wirkte sich nicht mehr auf die Anisotropie aus. Nach diesem Anisotropieverlauf erreichten die Kulturen die maximale Membranfluidität bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die starke Fettsäure-abhängige Kälteanpassung der  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubierten Kulturen (Abschnitt 3.2.2) resultierte in deutlich niedrigeren Anisotropiewerten von circa  $0,24$  und somit einer deutlich besseren Membranfluidität. Wie zuvor ging die Erhöhung der Messtemperatur mit einer stetigen Abnahme der Anisotropie einher, wobei bereits ab einer Messtemperatur von  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  keine weitere Anisotropiereduktion mehr stattfand.



**Abbildung 28: TMA-DPH Messung von *P. glucanolyticus* J12 geerntet im stationären Wachstumsbereich.** Bestimmung von TMA-DPH Anisotropie als ein Maß der Membranfluidität in dem Stamm J12. Vergleichende Darstellung zwischen Zellen der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Daten stellen einen Mittelwert dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Weiterhin wurden Sonden-abhängige Fluoreszenzmessungen mit dem Stamm J12 in der stationären Wachstumsphase, bei dem ein erhöhter Menachinongehalt festgestellt wurde, durchgeführt. Dabei wurden die Anisotropieverläufe zwischen der exponentiellen und stationären Phase gemacht, um die Auswirkung der erhöhten Menachinonkonzentration auf die Membranfluidität zu bestimmen. Die folgenden Kulturen wurden in einem Messbereich von  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  gemessen (Abb. 28). Der Anisotropieverlauf der stationären,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubierten

Kulturen war beinahe identisch mit dem zuvor beschriebenen Verlauf der Zellen der exponentiellen Wachstumsphase. Wobei die Anisotropiewerte bei den Proben der stationären Kulturen tendenziell geringer ausfielen im Vergleich zu den Kulturen der exponentiellen Phase. Die 10 °C Kulturen der exponentiellen Phase zeigten, wie zuvor erwähnt, eine deutliche Verringerung der Anisotropie bei allen Messpunkten unterhalb 30 °C. Beginnend mit einem Wert von 0,24 bei 5 °C konnte eine stetige Abnahme der Anisotropie bis 40 °C und einem Wert von 0,19 verzeichnet werden, womit eine fluidere Membran bei niedrigen Temperaturen gegeben war. Die Breite des Phasenübergangs war vergleichbar mit den 30 °C inkubierten Kulturen. Die 10 °C Probe der stationären Phase, geprägt durch den erhöhten Menachinongehalt, zeigte eine deutliche Abweichung zu den vorherigen Kurvenverläufen. Dieser war deutlich flacher und indizierte hiermit einen verbreiterten Phasenübergang. Das resultierte in einer signifikant fluideren Membran unterhalb von 10 °C verglichen mit der 10 °C Probe der exponentiellen Phase. Die Anisotropiewerte begannen bei 0,23 und verringerten sich mit zunehmender Temperatur langsam auf 0,21. Folglich wurde die Membran über 30 °C in diesem Fall stabilisiert und wies leicht höhere Anisotropiewerte im Vergleich zu den anderen Ansätzen auf.



**Abbildung 29: Laurdan-GP Messung von *P. glucanolyticus* J12 geerntet im stationären Wachstumsbereich.** Bestimmung von Laurdan-GP als ein Maß der Membranordnung in dem Stamm J12. Vergleichende Darstellung zwischen Zellen der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Laurdan-GP Messungen der stationären Kulturen bestätigte die Zunahme der Membranordnung durch die verstärkte Einlagerung von Menachinon. Die 30 °C inkubierten Kulturen der stationären Phase wiesen keine Erhöhung des Menachinongehaltes auf und zeigten ebenfalls keine Abweichung der Membranordnung über den gemessenen Temperaturbereich im Vergleich zu den 30 °C Proben der exponentiellen Phase (Abb. 29). Die 10 °C Proben der stationären Ansätze erfuhren eine deutliche Steigerung der Membranordnung im Vergleich zu den 10 °C Proben der exponentiellen Phase. Diese Erhöhung war über den gesamten Messbereich gegeben. Der GP-Wert reduzierte sich von 0,58 bei 5 °C auf 0,2 bei 50 °C. Diese Erhöhung der Membranordnung hatte auch zur Folge, dass die 10 °C Proben der stationären Phase, im Vergleich zu den 30 °C inkubierten Ansätzen, eine höhere Membranrigidität oberhalb von 20 °C besaßen.

### 3.2.5 Differentielle Transkriptomanalyse der Kälteanpassung von *P. glucanolyticus* J12

Anzumerken ist, dass im Fall vom Stamm J12 die RNA-Extraktion beim Übergang zum stationären Wachstumsbereich erfolgte, um die hier auftretende Erhöhung der Menachinonkonzentration erfassen zu können. Dies wirkte sich auf die detektierten Expressionsänderungen aus und sollte dementsprechend berücksichtigt werden. Zuerst wurde das Genom von *P. glucanolyticus* J12 sequenziert und assembliert und anschließend für die Kartierung der Transkriptom Daten verwendet. Das Genom wurde aus 34 Contigs ( $\geq 500$  bp) assembliert und besaß eine Gesamtgröße von 6.490.427 bp und hatte einen GC-Gehalt von 48,9 %. Das größte Contig war 850.343 bp groß, wobei 31 Contigs größer als 1000 bp waren und 21 Contigs eine Länge von über 50.000 bp besaßen (GenBank WGS Accession Number: VXLFF00000000). Der SPAdes Assembler sagte dabei 6086 einmalige Gene vorher. Von diesen vorhergesagten Genen hatten 5325 Gene eine Mindestgröße von 300 bp, 804 Gene eine Mindestgröße von 804 bp und 90 Gene eine Mindestgröße von 3000 bp. Das MPGC sequenzierte, analysierte und kartierte anschließend die sequenzierten RNA-Extrakte auf die zuvor generierten Gene des erstellten Genoms mit dem RAST-Server (Abschnitt 2.4.4.2). Die Rohdaten der mRNA-Sequenzierung wurden an das NCBI Sequence Read Archive (SRA) mit der Zugangsnummer (PRJNA565910) übermittelt.

Nach Abschluss der differentiellen Transkriptomanalyse wurden insgesamt 6098 einmalige Gene/Reads identifiziert. Die *in situ* Antwort von *P. glucanolyticus* J12 auf die Temperaturreduktion ergab eine umfassende Veränderung der Genexpression bei kalten und stationären Wachstumsbedingungen. Es wurden 655 Gene bei 10 °C hochreguliert (*fold change* > 2) und 302 Gene wurden bei 10 °C herunterreguliert (*fold change* > 2). Daraus ergab sich, dass 4770 Gene nicht signifikant verändert exprimiert wurden. Eine Auswahl an verschiedenen relevanten Genen und ihrer Expressionsänderung sind in der Tabelle 11 dargestellt. Es konnten insgesamt 9 Gene identifiziert werden, die in die Menachinonbiosynthese involviert sind. Dabei waren die Gene auf drei Loki verteilt. Den größten Loki bildeten die Gene mit der ID 1050 bis 1055. In der Mitte befanden sich die Gene verantwortlich für die Menachinonbiosynthese selbst. Dabei handelt es sich um eine Methyltransferase (MenG-Homolog, Gen-ID 1051), zwei Polyprenyltransferasen, darunter ein MenA-Homolog (Gen-ID 1052) und ein Flavoprotein der UbiX-Familie (Gen-ID 1053). Innerhalb dieses Lokus war auch das erste Gen des Fualosinweges (*mqnA*, Gen-ID 1054) enthalten. Flankiert wurden diese Gene von den kodierenden Sequenzen der MK-7-spezifischen Heptaprenylsynthase I und II (Gen-ID 1050, 1055). Diese Gene zeigten eine relevante 1,9-2,2-fache Expressionssteigerung. Die weiteren Gene des Fualosinweges waren auf zwei weitere Loki verteilt. Das einzelne *mqnC* (Gen-ID 3319) zeigte eine 1,9-fache Steigerung. Die Gene *mqnD* (Gen-ID 5031) und *mqnB* (Gen-ID 5032) zeigten eine Zunahme von 1,6 und 2,3 *fold changes*.

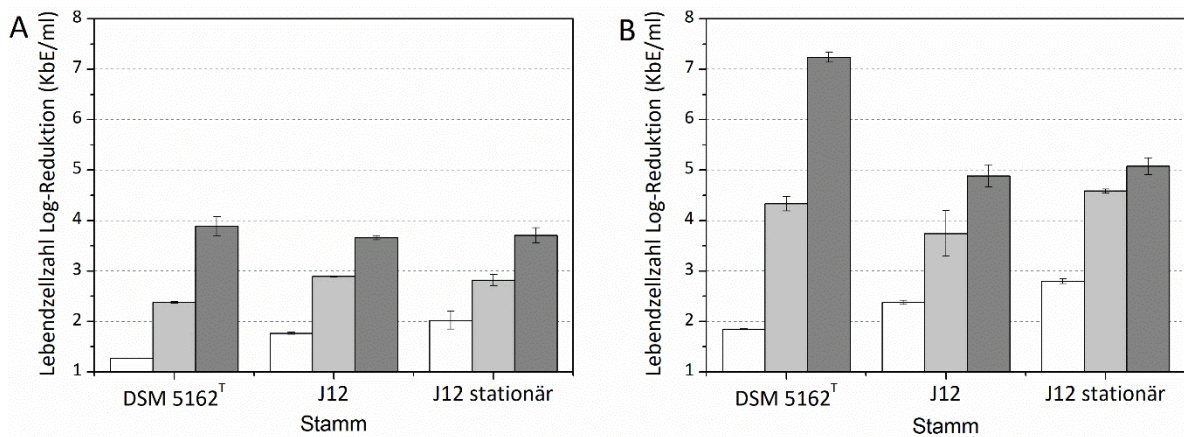
Von den Kälteanpassungs-spezifischen *cold shock proteins* (CSPs) konnten vier Gene annotiert werden, *cspA* und *cspD*\_1-3. Das Gen kodierend für CspA zeigte eine deutliche Zunahme der Expression (6,1-fache Änderung), wobei das CspD\_3 kodierende Gene noch eine 2,2-fache Zunahme zeigte. Die anderen beiden Gene *cspD*\_1/2 wurden unter kalten Bedingungen in ihrer Expression reduziert. Interessanterweise wurde eine relevante Reduktion (-2,8-fache Änderung) der Expression des Gens 3999, kodierend für eine Desaturase, beobachtet. Das könnte die Abnahme des Anteils der ungesättigten Fettsäure 16:1 *cis* 5 von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase erklären (Abschnitt 3.2.2). Weiterhin resultierten die kalten Bedingungen in einer 3,2-fachen Reduktion des generellen Stressproteins. Möglicherweise durch die stationäre Phase bedingt, konnte keine Änderung der Expression von Hsps, die auch als Chaperone fungieren, detektiert werden. Um unsere Analyse zu verifizieren wurden zwei *housekeeping*-Gene kontrolliert (ROCHA *et al.*, 2015): *ftsZ* (kodierend für ein Zellteilungsprotein) und *gyrB* (kodierend für die DNA Gyraseuntereinheit B), die wie erwartet keine signifikante Expressionsänderung aufwiesen.

**Tabelle 11: Auswahl an differentiell exprimierten Genen von *P. glucanolyticus* J12.** Änderung der Expressionsrate von diskutierten Kälte-spezifischen Genen bei der Temperaturabsenkung von 30 °C auf 10 °C. Die Transkriptomanalyse erfolgte im Dreifachansatz.

Gen-ID	Gen	Funktion	Fold change
<b>Menachinonbiosynthese (Futalysinweg)</b>			
1050		Heptaprenyl-Diphosphate Synthase Komponente I	2,1
1051	<i>menG</i> Homolog	2-heptaprenyl-1,4-naphthoquinone methyltransferase	2,0
1052	<i>menA</i> Homolog	Futalysin-spezifische Polyprenyltransferase	2,2
1053		Polyprenyltransferase der UbiX-Familie	2,0
1054	<i>mqnA</i>	Menaquinone- biosynthese Protein	1,9
1055		Heptaprenyl-Diphosphate Synthase Komponente II	2,2
3319	<i>mqnC</i>	Cyclic Dehydroporphyrinyl Futalysin Synthase	1,9
5031	<i>mqnD</i>	1,4-Dihydroxy-6-Naphthoat Synthase	1,6
5032	<i>mqnB</i>	Futalysinhydrolase	2,3
<b>Kälteschockproteine</b>			
1733	<i>cspD_3</i>	Kälteschock Domäne enthaltendes Protein CspC	2,2
5143	<i>cspA</i>	<i>Cold shock protein A</i>	6,1
<b>Referenz- / housekeeping-Gene</b>			
647	<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase Untereinheit B	1,21
5612	<i>ftsZ</i>	Zellteilungs-Protein	-1,13
<b>Genereller Stress / Hitzestress</b>			
565		Hitzeschockprotein (Hsp20)	1,4
773		Generelles Stressprotein	-3,2
5959		Chaperonin (Hsp33)	-1,1
<b>Fettsäuremodifikation</b>			
3999		Fettsäure-spezifische Desaturase	-2,8

### 3.2.6 Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen von *P. glucanolyticus*

Ein drei-stufiger Gefrier-Auftau Stresstest (Abschnitt 2.1.3) wurde mit beiden Stämmen und Wachstumstemperaturen durchgeführt, um potentielle Unterschiede in der Kälteanpassung zu bestimmen. Wie bereits bei den *Listeria* Isolaten beobachtet (Abschnitt 3.1.6), zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Chinongehalt und der Reduktion der Lebendzellzahl nach mehrmaligen Gefrier-Auftau-Schritten. Die 10 °C inkubierten Ansätze zeigten vergleichbare Zellzahlreduktionen (Abb. 30A). Es zeigte sich, dass beide Stämme sowie der stationäre Ansatz von Stamm J12, kennzeichnend durch den erhöhten Menachinongehalt, das gleiche Ausmaß der Zellzahl-Reduktion aufwiesen. Dabei nahm die Zellzahlreduktion mit jedem Schritt stetig zu und betrug ~1,5 Log-Stufen, ~3 Log-Stufen und ~4 Log-Stufen nach respektive ein, zwei und drei Zyklen. Bei den 30 °C Kulturen wurde ein Stamm-spezifischer Unterschied sichtbar (Abb. 30B), wobei die Zellzahl-Reduktion des Typstamms DSM 5162<sup>T</sup> zwei Zehnerpotenzen höher lag als die Reduktion in den beiden Ansätzen des Stamms J12. Im Vergleich zu den 10 °C Kulturen stieg die Zellzahl-Reduktion für Stamm J12 um eine Log-Stufe und für den Typstamm DSM 5162<sup>T</sup> um 3 Log-Stufen.

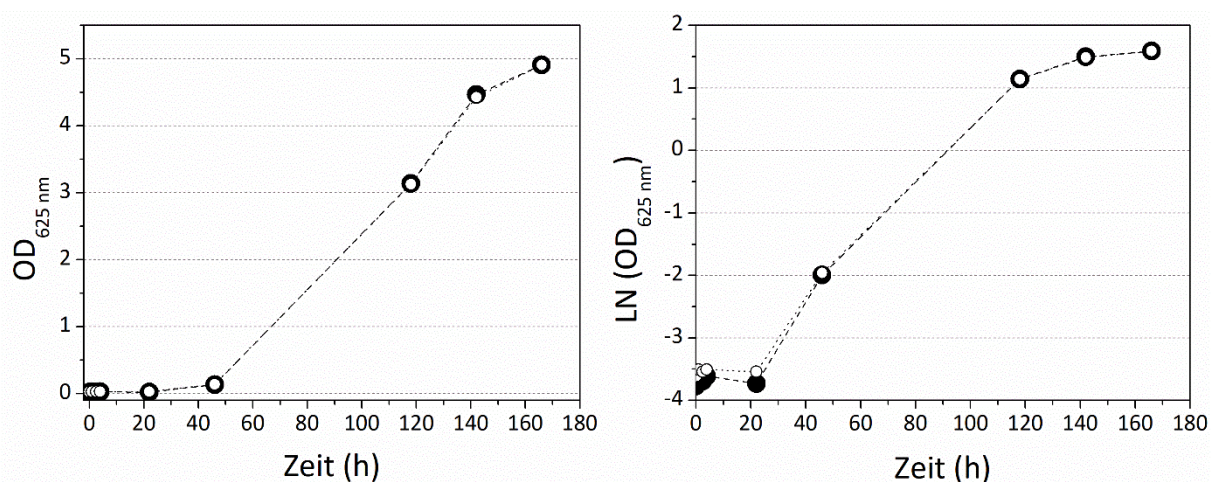


**Abbildung 30: Gefrier-Auftau-Stresstest von *P. glucanolyticus*.** Logarithmische Reduktion der Lebendzellzahl der beiden *P. glucanolyticus* Stämme DSM 5162<sup>T</sup> und J12 bei 10 °C (Links, Abbildung A) und 30 °C (Rechts, Abbildung B) Wachstumstemperatur. Es wurden drei Gefrier-Auftau-Schritte alle 24 Stunden durchgeführt. Weiß, 24 h; Hellgrau, 48 h; Grau, 72 h. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



### 3.2.7 Supplementation von *P. glucanolyticus* mit Vitamin K<sub>1</sub>

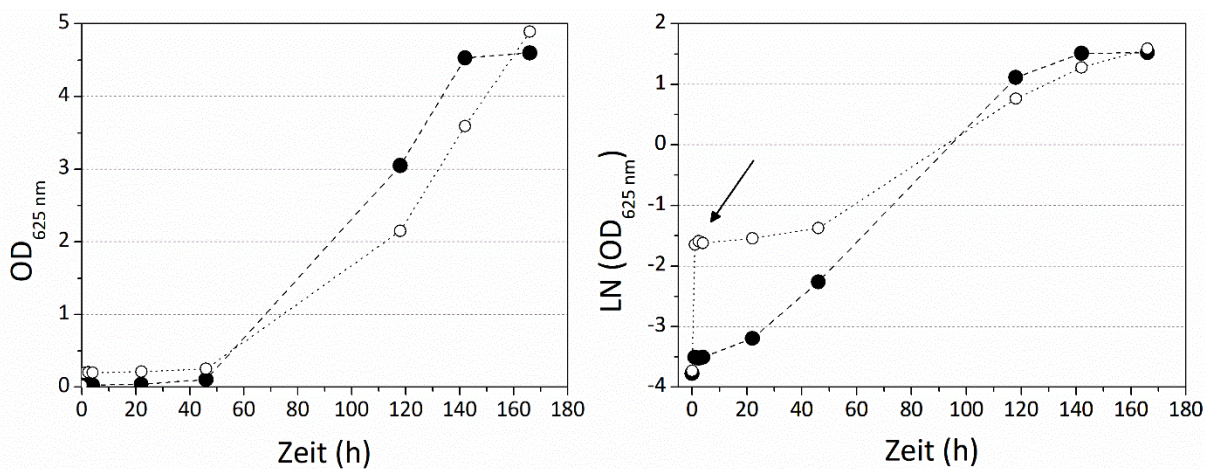
Um die gezeigte Auswirkung des erhöhten Menachinongehaltes auf die Verbreiterung des Phasenübergangs und Verbesserung der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen zu verifizieren, sollte eine Vitamin K<sub>1</sub> Supplementation des Mediums für eine artifizielle Erhöhung des isoprenoiden Chinongehaltes in der Membran sorgen. Aufgrund des lipophilen Charakters von isoprenoiden Chinonen (Abschnitt 1.3.1), wurden verschiedene Emulgatoren in Betracht gezogen, die zum einen eine geringe Zelltoxizität aufweisen und zum anderen die Membranfluidität möglichst gering beeinflussen sollten. Nach einer Recherche stellte sich DMSO als beste Kompromisslösung heraus. DMSO war Ethanol, insbesondere aufgrund des geringeren fluidisierenden Effekts auf die Zellmembran, vorzuziehen. Wie anhand der Abbildung 31 zu erkennen ist, zeigte sich kein Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und dem DMSO-Vitamin K<sub>1</sub> supplementierten Ansatz bei einer Wachstumstemperatur von 10 °C. Für beide Ansätze ließ sich eine maximale Wachstumsrate von 0,051 h<sup>-1</sup> berechnen, womit beide Ansätze, im Vergleich zu den unsupplementierten Ansätzen, eine identische Wachstumsrate aufwiesen (Abschnitt 3.2.1).



**Abbildung 31: Vitamin K<sub>1</sub> in DMSO Supplementation von *P. glucanolyticus* J12.** 4,5 mg/ml von Vitamin K<sub>1</sub> Stammlösung gelöst in DMSO wurde zur Supplementation verwendet. 4,5 mg wurden 100 ml Medium zugegeben. Inkubation erfolgte bei 10 °C. Links, arithmetische Darstellung der optischen Dichte bei 625 nm aufgetragen gegen die Zeit (h). Rechts, halb-logarithmische Darstellung der optischen Dichte bei 625 nm aufgetragen gegen die Zeit (h). ●, DMSO-Kontrolle. ○, DMSO + Vitamin K<sub>1</sub> Supplementation.

Des Weiteren wurde versucht eine Emulgation von Vitamin K<sub>1</sub> durch die Zugabe von niedrig konzentriertem Agar-Agar zu erreichen (Abschnitt 2.1.1.2). Bei Raumtemperatur zeigte sich eine stabile Emulgation. Jedoch konnte diese bei der 10 °C Inkubation nicht erhalten bleiben.

Wie in Abbildung 32 zu erkennen ist, zeigte sich bereits bei der OD-Messung nach einer Stunde eine deutliche Zunahme der optischen Dichte auf eine  $OD_{625\text{ nm}}$  von 0,2. Eine anschließende Lebendzellzahlbestimmung zeigte keine höheren Zellzahlen im Vergleich zu der Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Folglich konnte der Verdacht eines Artefakts, wahrscheinlich durch den Ausfall von Vitamin  $K_1$  unter kalten Temperaturen, angenommen werden. So konnten auch nachfolgende Tests wie eine Menachinonanalyse oder Membranfluoreszenzmessung nicht durchgeführt werden. Dies begründete sich in der schlechten Separation von Zellpellet und Agar nach der Zentrifugation. Die artifizielle Trübung verhinderte eine Messung der Wachstumsraten, da diese im exponentiellen Bereich dadurch maskiert wurden.



**Abbildung 32: Vitamin  $K_1$  + 0,125 % Agar-Agar Supplementation von *P. gluconolyticus* J12.** 4,5 mg/ml von Vitamin  $K_1$  Stammlösung gelöst in DMSO wurde zur Supplementation verwendet. 4,5 mg wurden 100 ml Medium zugegeben. Inkubation erfolgte bei 10 °C. Links, arithmetische Darstellung der optische Dichte bei 625 nm aufgetragen gegen die Zeit (h). Rechts, halb-logarithmische Darstellung der optischen Dichte bei 625 nm aufgetragen gegen die Zeit (h). Pfeil markiert artifizielle Trübung der Kultur. ●, Agar-Kontrolle. ○, Agar + Vitamin  $K_1$  Supplementation.

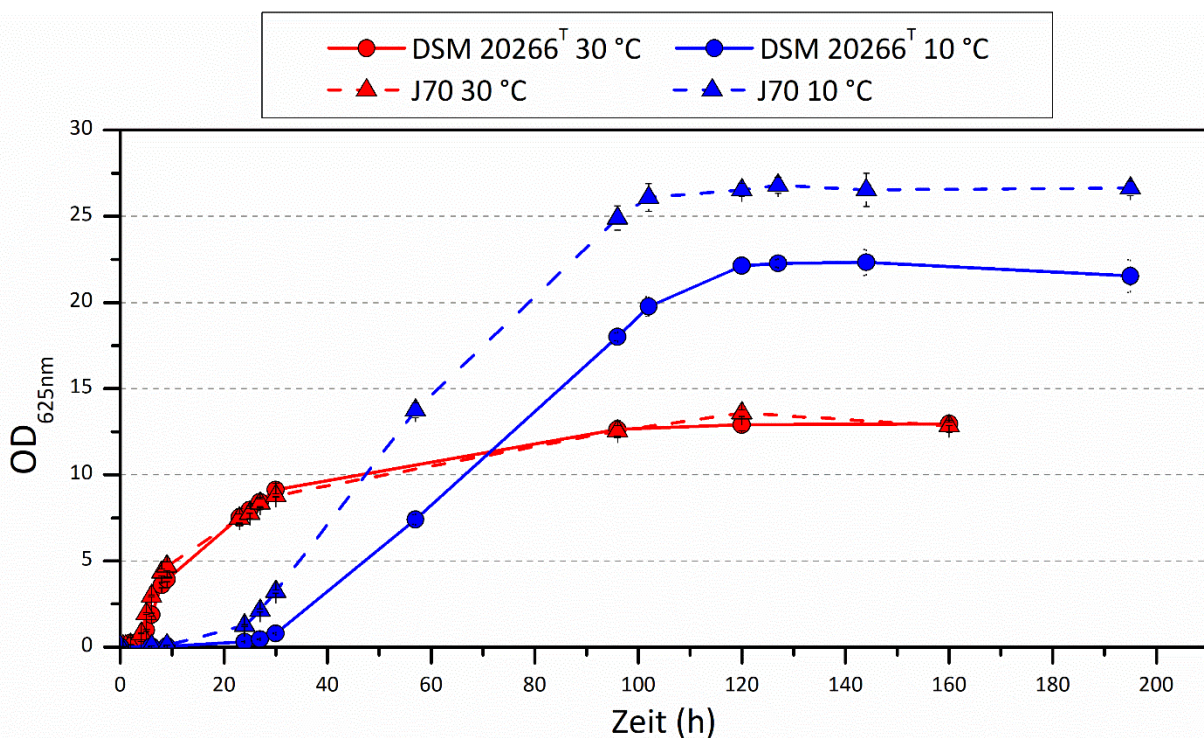
### 3.3 Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation durch erhöhten Carotinoidgehalt in *Staphylococcus xylosus* bei niedrigen Temperaturen

Für die Untersuchung dieses Abschnittes wurden zwei *S. xylosus* Stämme verwendet. Stamm J70 wurde aus einem gekühlten Rohmilchsammeltank isoliert und zeigte bei 30 °C keine Pigmentation. Verringerte man die Inkubationstemperatur auf 10 °C war eine sehr starke gelb-orange Färbung zu erkennen. Diese Pigmentation trat im Flüssig- als auch Festmedium auf. Als Referenzorganismus wurde auch hier der nächstverwandte Typstamm DSM 20266<sup>T</sup> verwendet.

Dadurch sollten mögliche Unterschiede zwischen einem Wildtyp-Stamm und einem Referenzstamm aus langandauernder Stammkulturhaltung offengelegt werden.

### 3.3.1 Wachstumsverlauf der beiden untersuchten *S. xylosus* Stämme bei 30 °C und 10 °C

Wie zuvor wurden auch von beiden *S. xylosus* Stämmen das Wachstumsverhalten aufgezeichnet. Hiermit konnte zum einen die Pigmentation bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen werden und zum anderen mögliche Differenzen in der Kälteresistenz beziehungsweise den Wachstumsraten festgestellt werden. Die gemittelten Daten sind in der arithmetischen Darstellung in Abbildung 33 illustriert. Zur Bestimmung der maximalen Wachstumsrate und der Beurteilung der einzelnen Wachstumsphasen wurde die halb-logarithmische Darstellung verwendet (Anhang 2).



**Abbildung 33: Arithmetische Darstellung des Wachstumsverlaufs von *S. xylosus* DSM 20266<sup>T</sup> und J70 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur.** Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar ( $n = 3$  biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei 30 °C Wachstumstemperatur war kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen zu erkennen. Eine Lag-Phase war nicht vorhanden und die maximale Wachstumsrate konnte in den ersten acht Stunden beobachtet werden. Diese fiel mit  $0,87 \text{ h}^{-1}$  für Stamm J70 geringfügig

höher (4 %) aus als für DSM 20266<sup>T</sup> mit 0,84 h<sup>-1</sup> (Tab. 12). In dieser Zeit wurde eine OD<sub>625 nm</sub> ~ 3,5 erreicht. Daraufhin verlangsamte sich das Wachstum deutlich und nach weiteren 50 h wurde eine maximale OD<sub>625 nm</sub> ~ 13 erreicht. Von 60 h bis 160 h blieb die Zelldichte auf demselben Niveau und bildete die stationäre Phase. Innerhalb des dokumentierten Zeitfensters konnte keine Absterbe-Phase festgestellt werden.

Die 10 °C Inkubation resultierte wiederum in einem ähnlichen Wachstumsverhalten der beiden Stämme, wobei sich der Stamm J70 durch eine höhere Wachstumsrate und Zelldichte auszeichnete (Abb. 33). In beiden Fällen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Verdopplungszeit im Vergleich zu den 30 °C bebrüteten Kulturen. Nach der Inokulation wurde bei beiden Stämmen keine Lag-Phase beobachtet. Die exponentielle Phase konnte vom Inokulationszeitpunkt bis ungefähr 60 h beobachtet werden. Die Wachstumsrate von Stamm J70 war mit 0,16 h<sup>-1</sup> circa 20 % schneller als bei DSM 20266<sup>T</sup> mit einem  $\mu_{\max} = 0,13 \text{ h}^{-1}$  (Tab. 12). Folglich stieg die Verdopplungszeit von 50 min bei Temperaturabsenkung auf 4-5 h an. Nach 120 h ging die exponentielle Phase in die stationäre Phase über, wobei eine maximale Trübung von OD<sub>625 nm</sub> ~22 für Stamm DSM 20266<sup>T</sup> und OD<sub>625 nm</sub> ~26 für J70 detektiert wurde. Analog zur Wachstumsrate zeigte sich auch beim Zellertrag ein circa 20%-iger Mehrertrag des Stammes J70 im Vergleich zum Referenz Stamm.

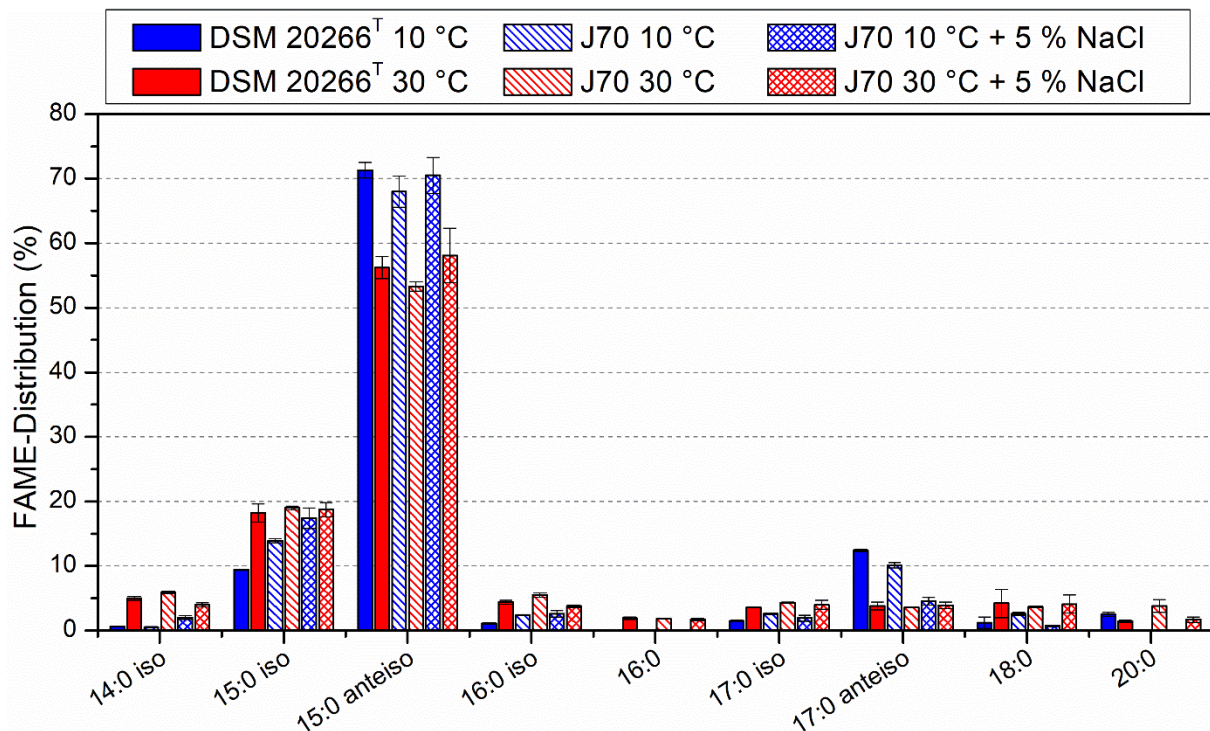
**Tabelle 12: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der *S. xylosus* Stämme.** Unterteilt nach den Wachstumstemperaturen von 30 °C und 10 °C in TSB-Medium. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Das ±-Zeichen stellt die Standardabweichung dar. Wachstumsunterschiede der beiden Stämme waren statistisch signifikant für 30 °C ( $p < 0,05$ ) und 10 °C ( $p < 0,001$ )

Stamm	30 °C		10 °C	
	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)
DSM 20266T	0,84 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,13 ± 0,00	5,33 ± 0,07
J70	0,87 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,16 ± 0,00	4,36 ± 0,01

#### 3.3.2 Fettsäureanalyse und das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation in *S. xylosus*

Die Erfassung der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation basierte auf der Bestimmung der FAME-Profile bei 30 °C und 10 °C von Zellen der spät-exponentiellen Wachstumsphase.

Hierfür wurden die Fettsäuren auf Basis der sauren Methanolyse extrahiert und derivatisiert. Dies ermöglichte eine Identifikation mittels GC-MS (Abschnitt 2.2.1).



**Abbildung 34: FAME Distribution von *S. xylosus* als Säulendiagramm.** Detektierte FAMEs mit mindestens 1%-Anteil der beiden Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Zusätzliches FAME-Muster des Stamms J70 nach einer 5%-igen Supplementation mit NaCl. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die dominierenden Fettsäuren bei 30 °C für beide Stämme waren 15:0 iso (20 %) und 15:0 anteiso (~55 %) und bei 10 °C Ansätzen zusätzlich 17:0 anteiso (10 %) (Abb. 34). Bei den geringen Fettsäuren handelte es sich um weitere gesättigte, verzweigte sowie gradkettige Acylketten im Bereich von 14 bis 20 Kohlenstoffatomen. Alle verzweigten Fettsäuren, unabhängig von der Wachstumstemperatur, machten mindestens 90 % der gesamten Fettsäuren aus. Die Kälteadaptation äußerte sich in einer Zunahme der Fettsäure 15:0 anteiso von 50 bis 60 % auf circa 70 % und einem Anstieg der Fettsäure 17:0 anteiso von 5 % auf 10 %. Interessanterweise reduzierte sich der Anteil an 14:0 anteiso bei den 10 °C Ansätzen im Vergleich zu den 30 °C Ansätzen. Folglich handelte es sich bei dem dominierenden Adaptationsmechanismus um eine Verschiebung von gradkettigen und iso-verzweigten Fettsäuren hin zu anteiso-verzweigten Fettsäuren. Diese zeichnen sich durch niedrigere Schmelztemperaturen aus womit der Temperaturreduktion entgegengewirkt wird (Tab. 2). Darüber hinaus wurden Fettsäureprofile von NaCl-supplementierten Kulturen des Stamms J70

### 3 Ergebnisse

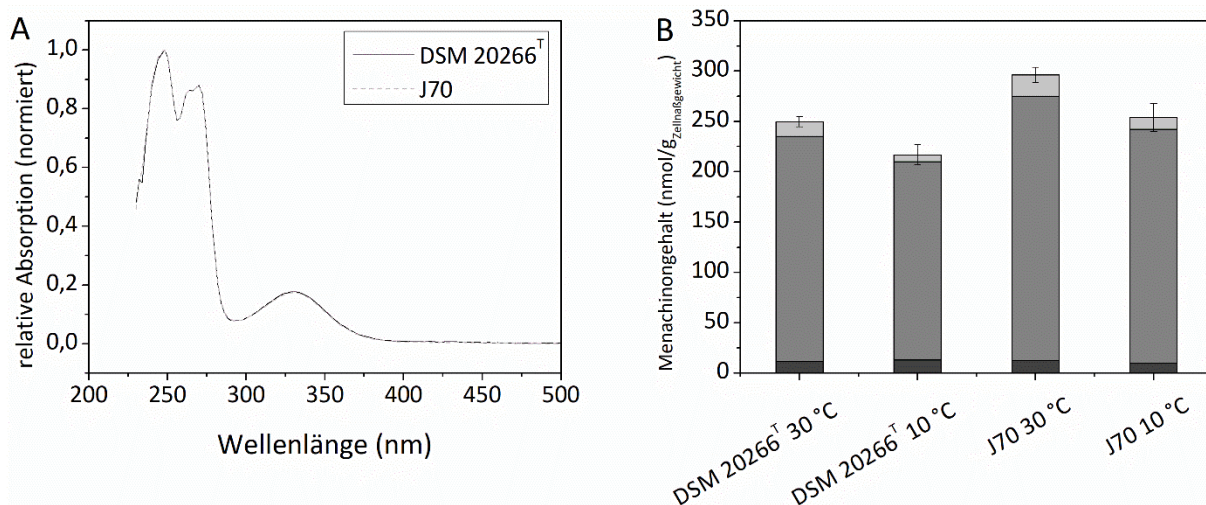
erstellt, um zu überprüfen ob der zusätzliche Salzgehalt einen Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung haben könnte. Die gewonnenen Daten zeigten kleine Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung unter dem zusätzlichen Salzstress, ohne jedoch den Gesamtmechanismus der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation zu verändern (Abb. 34). Das Ausmaß der Kälteadaptation wurde mit Hilfe der Differenz der WAMT-Werte, wie zuvor von SEEL *et al.* (2018) beschrieben, ausgedrückt (Tab. 13). Die WAMT-Werte für die jeweiligen Temperaturen fielen für die drei verschiedenen Ansätze fast identisch aus. Das resultierte in einem  $\Delta$ WAMT-Wert von etwa 6 °C. Der Fettsäuregehalt der Zellen änderte sich nicht bei den unterschiedlichen Temperaturen (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 13: FAME-Verteilung von *S. xylosus*.** Detektierte FAMEs der beiden untersuchten Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Zusätzliches FAME-Muster des Stamms J70 mit einer 5%-igen NaCl-Supplementation. Schmelztemperaturen der einzelnen Fettsäuren für die Berechnung der WAMT-Werte wurden aus KNOTHE & DUNN (2009) entnommen. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Das ±-Zeichen stellt die Standardabweichung dar.

		Wachstumstemperatur					
Stamm		DSM 20266 <sup>T</sup>		J70		J70 + 5 % NaCl	
		10 °C	30 °C	10 °C	30 °C	10 °C	30 °C
FAME (%)							
<b>14:0 iso</b>		0,6 ± 0,0	5,0 ± 0,3	0,5 ± 0,1	5,9 ± 0,2	2,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3
<b>14:0</b>		n.d.	0,7 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>15:0 iso</b>		9,4 ± 0,1	18,2 ± 1,4	13,9 ± 0,3	19,0 ± 0,3	17,4 ± 1,6	18,7 ± 1,1
<b>15:0 anteiso</b>		71,3 ± 1,2	56,2 ± 1,7	68,0 ± 2,4	53,3 ± 0,7	70,5 ± 2,8	58,1 ± 4,2
<b>16:0 iso</b>		1,1 ± 0,1	4,4 ± 0,3	2,4 ± 0,1	5,5 ± 0,3	2,6 ± 0,5	3,8 ± 0,2
<b>16:0</b>		n.d.	1,9 ± 0,2	n.d.	1,8 ± 0,0	n.d.	1,7 ± 0,2
<b>17:0 iso</b>		1,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1	4,3 ± 0,1	1,9 ± 0,5	4,0 ± 0,7
<b>17:0 anteiso</b>		12,4 ± 0,2	3,8 ± 0,6	10,1 ± 0,4	3,6 ± 0,0	4,5 ± 0,6	3,9 ± 0,5
<b>18:0</b>		1,2 ± 0,9	4,2 ± 2,2	2,6 ± 0,2	3,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	4,1 ± 1,4
<b>20:0</b>		2,5 ± 0,3	1,4 ± 0,2	n.d.	3,8 ± 1,0	n.d.	1,7 ± 0,4
<b>WAMT (°C)</b>		31,2	37,4	32,3	38,8	31,9	37,1
<b><math>\Delta</math>WAMT (°C)</b>		6,2		6,5		5,2	

### 3.3.3 Analyse des isoprenoiden Chinongehaltes in *S. xylosus*

Isoprenoide Chinone wurden wie bereits beschrieben aus nassem Zellmaterial, welches in der spät-exponentiellen Wachstumsphase geerntet worden ist, extrahiert. Anschließend wurden die Proben mittels SPE-Säulchen aufgereinigt und mit der HPLC qualitativ sowie quantitativ bestimmt (Abschnitt 2.2.2). Im Fall von *S. xylosus* diente die Chinonanalyse als eine Kontrolle um mögliche Interaktionen mit Carotinoiden und ihrer Auswirkung auf die Membraneigenschaften differenzieren zu können (Abschnitt 3.3.5).



**Abbildung 35: Menachinonspektren und -gehalt in *S. xylosus*.** A: Darstellung der detektierten Menachinonspektren der beiden *S. xylosus* Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70. Stellvertretend dargestellt MK-7 für alle drei detektierten Peaks. B: Gesamt-Menachinongehalt (nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub>) der beiden Stämme im spät-exponentiellen Wachstumsbereich bei den entsprechenden Wachstumstemperaturen. Dunkelgrau = MK-6, Grau = MK-7 und Hellgrau = MK-8. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei den untersuchten *S. xylosus* Stämmen konnten jeweils drei Peaks detektiert werden. Die Absorptionsspektren waren dabei für alle Peaks und Proben identisch und zeigten die Menachinon spezifischen Peaks bei 248 nm, einen Doppelpeak bei 261 nm und 270 nm und einen breiten Peak bei circa 325 nm (Abb. 35A). Die weitere Identifikation der Menachinone erfolgte anhand der relativen Retentionszeit im Vergleich zum Vitamin K<sub>1</sub> Standard (Tab. 14). Die drei Peaks konnten MK-6, MK-7 und MK-8 zugeordnet werden. Das Hauptchinon war MK-7 und war bei beiden Temperaturen zu 90 % vertreten. Die beiden Minorkomponenten MK-6 und MK-8 waren ungefähr gleichverteilt. Beide Stämme quittierten die Reduktion der Wachstumstemperatur auf 10 °C mit einer 15 bis 20-%-igen Verringerung des Menachinongehaltes (Abb. 35). Bei Stamm J70 reduzierte sich die Konzentration von

### 3 Ergebnisse

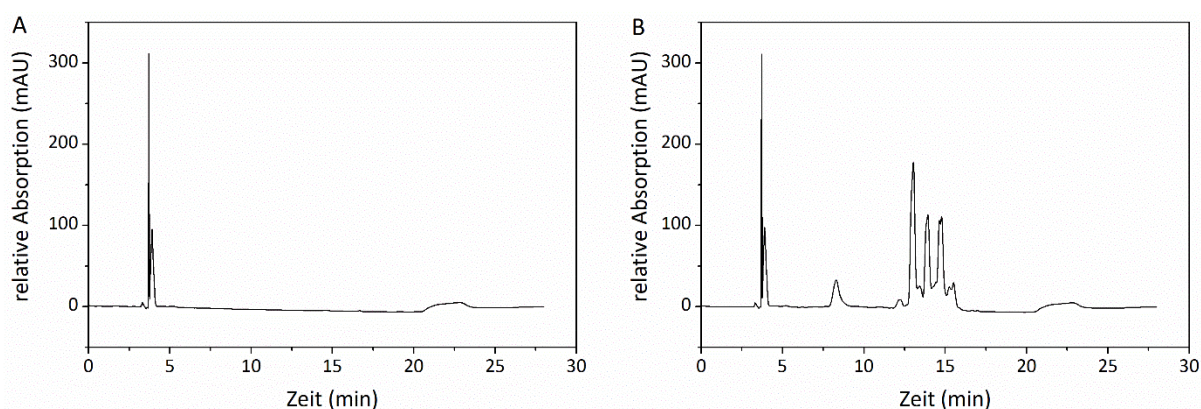
293 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> bei 30 °C auf 256 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub>. Beim Typstamm reduzierte sich der Gehalt von 250 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> auf 217 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> bei 10 °C.

**Tabelle 14: Qualitative Chinonbestimmung von *S. xylosus*.** Retentionszeiten (RT) der detektierten Peaks für die Stämme DSM 20266T und J70. Bei 30 °C und 10 °C wurden dieselben Peaks detektiert und folglich zusammengefasst. Angegebene RT stellen einen Mittelwert dar (n = 6). Als Standard wurde Vitamin K<sub>1</sub> verwendet mit einer gemittelten RT von 4,94 ± 0,04 min. Das ±-Zeichen repräsentiert die Standardabweichung.

Stamm	Peak-		RT relativ zu		Entsprechendes	Anteil	Anteil
	Nummer	RT (min)	Stamm	Vitamin K <sub>1</sub>	Menachinon	30 °C (%)	10 °C (%)
DSM 20266 <sup>T</sup>	1	5,58 ± 0,02		1,13	MK-6	4,7	6,0
	2	6,86 ± 0,04		1,38	MK-7	89,5	90,8
	3	8,54 ± 0,09		1,73	MK-8	5,8	3,2
J70	1	5,55 ± 0,04		1,12	MK-6	3,4	4,6
	2	6,82 ± 0,07		1,38	MK-7	89,4	90,7
	3	8,50 ± 0,13		1,72	MK-8	7,2	4,7

#### 3.3.4 Carotinoidanalyse von *S. xylosus* zur Bestimmung des potentiellen Fettsäure-unabhängigen Kälteanpassungsmechanismus

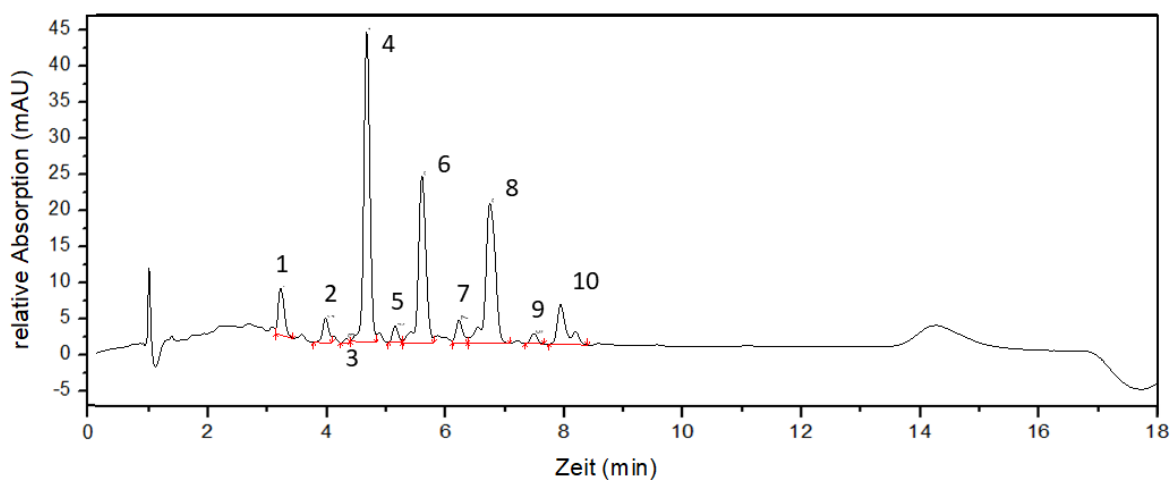
Die ersten chromatographischen Auftrennungen der Carotinoidextraktionen erfolgten an einer C-18-RP-Säule an der auch die isoprenoiden Chinone aufgetrennt worden sind (Abschnitt 2.2.3). Mit diesem System konnte keine ausreichende Trennung der einzelnen Peaks erfolgen, sodass die Quantifizierung nicht verlässlich war (Abb. 36).



**Abbildung 36: Chromatogramm der *S. xylosus* J70 Carotinoidauftrennung an einer C18-RP-Säule.** HPLC-Analyse nach Abschnitt 2.2.3, Linie zeigt die Integration der Absorption bei 450 nm. Chromatogramme zeigen die Extrakte nach einer Inkubation bei 30 °C (A) und 10 °C (B). Repräsentativ für beide Stämme.



Folglich wurde mit Hilfe der AG Molekulare Lebensmitteltechnologie die Auftrennung an einer C30-Säule vorgenommen. Aufgrund der geringeren Porengröße und der größeren Wechselwirkung des Säulenmaterials mit den Carotinoiden wurde hierdurch eine deutlich bessere Trennungsleistung erreicht. Die meisten Peaks konnten anhand der Basislinie integriert werden, womit relevante Quantifizierungsdaten gewonnen werden konnten. Repräsentativ für beide *S. xylosus* Stämme wird in Abbildung 37 das Chromatogramm für Stamm J70 bei 10 °C Wachstumstemperatur gezeigt. Bei beiden Stämmen konnten die identischen Peaks detektiert werden. Die jeweiligen Absorptionsspektren der detektierten Peaks sind im Anhang 4 abgebildet.



**Abbildung 37: Chromatogramm der *S. xylosus* J70 Carotinoidauftrennung an einer C30-RP-Säule.** HPLC-Analyse nach Abschnitt 2.2.3 an einem (U)HPLC-System, Linie zeigt die Integration der aufgezeichneten Spektren bei 450 nm. Chromatogramme zeigen die Extrakte nach einer Inkubation bei 10 °C. Für beide getesteten Stämme wurden die gleichen Peaks detektiert.

Kolonien beider *S. xylosus* Stämme zeigten bei 30 °C Wachstumstemperatur keine sichtbare Pigmentierung. Dies wurde durch die chromatographische Analyse bestätigt, die eine Carotinoidekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 µg/gZellrockengewicht zeigte (Tab. 15). Die Inkubation bei niedrigen Temperaturen führte zu einer starken orangefarbenen Pigmentierung der Zellpellets und der Kolonien der Stämme J70 und DSM 20266<sup>T</sup>. Der Gesamt-Carotinoidgehalt war bei dem Typstamm mit 450 µg/gZellrockengewicht signifikant höher als bei dem Lebensmittel-assoziierten Stamm J70 mit 170 µg/gZellrockengewicht. Anhand der massenspektrometrisch gekoppelten HPLC wurden Staphyloxanthin oder Staphyloxanthin-ähnliche Carotinoide als Haupt-Carotinoide im Stamm J70 (85 %) und DSM 20266<sup>T</sup> (90 %) identifiziert. Im Unterschied zu Staphyloxanthin zeichneten sich die drei Staphyloxanthin-ähnlichen Verbindungen durch eine Fettsäure aus, die sich von 15:0 anteiso unterschied. Einige

### 3 Ergebnisse

der Staphyloxanthin-ähnlichen Moleküle zeigten Massezahlen im MS-Spektrum, die zusätzliche CH<sub>2</sub>-Molekülteile indizierten und somit eine längere Fettsäure besaßen. In dem Stamm J70 betrug der Anteil der Staphyloxanthin-ähnlichen Verbindungen 30 % und war deutlich niedriger als in Stamm DSM 20226<sup>T</sup> mit etwa 60 % (Tab. 15). Das Vorläufermolekül von Staphyloxanthin, *all-trans*-4,4'-Diaponeurosporeat stellte ebenfalls ein Neben-Carotinoid mit einem Anteil von 15 % im Stamm J70 und 7 % im Stamm DSM 20266<sup>T</sup> dar. *cis*-Isomere einiger Verbindungen (Werte in Klammern, Tab. 15) wurden ebenfalls mit einem Anteil von jeweils 0,5 bis 3 % nachgewiesen.

**Tabelle 15: Carotinoid-Zusammensetzung in % der *S. xylosus* Stämme J70 und DSM 20266<sup>T</sup> bezogen auf die Wachstumstemperatur.** Identifikation und Quantifikation erhalten durch die HPLC-DAD-APCI-MS<sup>n</sup> (Abschnitt 2.2.3). Entsprechende *cis*-Peaks in Klammern dargestellt. Die Gesamtkonzentration der Carotinoide wird als Mittelwert in (µg/g<sub>Zellrockengewicht</sub>) dargestellt (n = 3 biologische Replikate). Das ±-Zeichen repräsentiert die Standardabweichung.

Peak-Nr.	Carotinoidanteil (%)	Stamm t <sub>R</sub> (min) UV	DSM 20266 <sup>T</sup>		J70	
			10 °C	30 °C	10 °C	30 °C
1	<i>all-trans</i> -4,4'-Diaponeurosporeat	3,199	6,7	n.d.	15,0	n.d.
2	Staphyloxanthin-ähnliches Molekül_1	4,003	2,5	n.d.	4,0	n.d.
(3)/4	<i>all-trans</i> -Staphyloxanthin	4,691 (4,318)	32,5 (0,4)	n.d.	50,5 (0,9)	n.d.
(5)/6	Staphyloxanthin-ähnliches Molekül_2	5,638 (5,165)	21,8 (1,8)	n.d.	13,2 (1,7)	n.d.
(7)/8	Staphyloxanthin-ähnliches Molekül_3	6,800 (6,227)	23,7 (2,8)	n.d.	11,3 (1,4)	n.d.
(9)/10	Staphyloxanthin-ähnliches Molekül_4	7,991 (7,475)	6,7 (1,2)	n.d.	2,0 (0,0)	n.d.
<b>Gesamt-Carotinoidkonzentration (µg/g<sub>Zellrockengewicht</sub>)</b>			451,4 ± 20,0	n.d.	169,0 ± 11,1	n.d.

N.d. = nicht detektiert, unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 µg/g<sub>Zellrockengewicht</sub>.

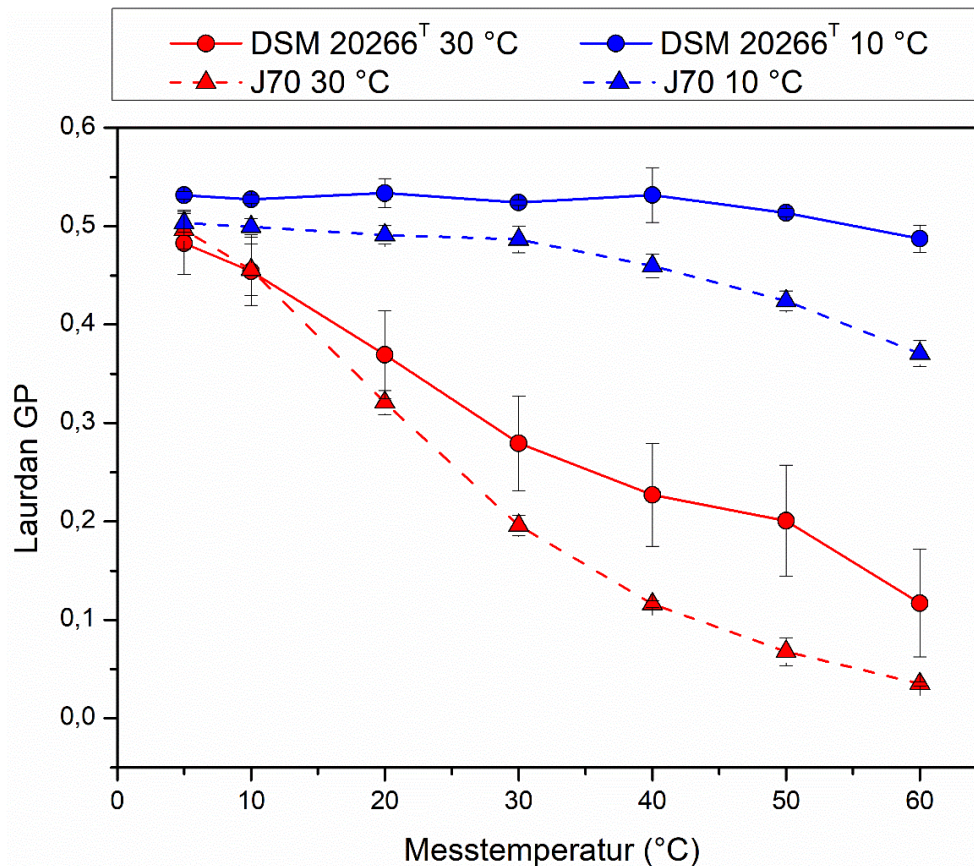
### 3.3.5 Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in *S. xylosus*

Die Auswirkung der Carotinoidinkorporation auf die Membranparameter der Ordnung und Fluidität wurde mit Hilfe von Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen bestimmt (Abschnitt 2.3).

Die Laurdan-GP Daten der untersuchten Stämme bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur zeigten eine deutliche Auswirkung der Carotinoide auf die Rigidität der Zellmembran (Abb. 38). Die Messung erfolgte von 5 °C bis 60 °C. Es war eine deutliche Diskrepanz der Laurdan-GP Werte zwischen den Ansätzen mit und ohne Carotinoiden (entsprechen den jeweiligen 10 °C und 30 °C Kulturen) erkennbar. Zellen, deren Inkubation bei mesophilen Temperaturbedingungen erfolgte, zeigten mit steigender Messtemperatur eine stetige Reduktion der GP-Werte. Beide Stämme wiesen bei 5 °C den höchsten GP-Wert von circa 0,5 auf. Das heißt, dass die Membranordnung an diesem Punkt am größten war. Mit zunehmender Temperatur sanken die GP-Werte stetig bis das Minimum von circa 0,1 bei 60 °C erreicht wurde. Folglich nahm auch die Membranordnung stetig ab. Im Gegensatz dazu zeigten die niedrig temperierten Kulturen konstant hohe GP-Werte bis zu einer Messtemperatur von 40 °C. Stamm J70 zeigte im Bereich von 5 °C bis 30 °C einen gleichbleibenden GP-Wert von 0,5 an und indizierte über diesen Messbereich eine stark geordnete Membran. Eine weitere Erhöhung der Temperatur führte zu einer langsamen aber stetigen Laurdan GP-Wert Reduktion von 0,5 auf 0,37. Folglich nahm die Membranordnung auch erst mit Temperaturen über 30 °C ab. Der Stamm DSM 20266<sup>T</sup> zeigte ein ähnliches Verhalten, wobei die GP-Werte im Vergleich zu Stamm J70 noch etwas höher lagen. Im Bereich von 5 °C bis 40 °C waren die Laurdan GP-Werte konstant bei circa 0,53. Von 40 °C bis 60 °C erfolgte eine sehr langsame Abnahme des GP-Wertes auf 0,48. Dies implizierte einen höheren Grad an Zellmembranorganisation beim Typstamm im Vergleich zum Isolat. Dies korrelierte ebenfalls mit dem höheren Carotinoidgehalt des Stammes DSM 20266<sup>T</sup> im Vergleich zu J70 (Tab. 15).

Entsprechend zu den GP-Wert Daten sind in Abbildung 39 die gemessenen TMA-DPH Werte dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse zeigten ein ähnliches Verhalten der beiden getesteten Stämme mit einer deutlich sichtbaren Auswirkung des Carotinoidgehaltes auf die Membranfluidität. Die 30 °C inkubierten Kulturen, ohne detektierbare Carotinoide (Tab. 15), wiesen hohe Anisotropiewerte von etwa 0,28 bei der niedrigsten Messtemperatur auf. Dies

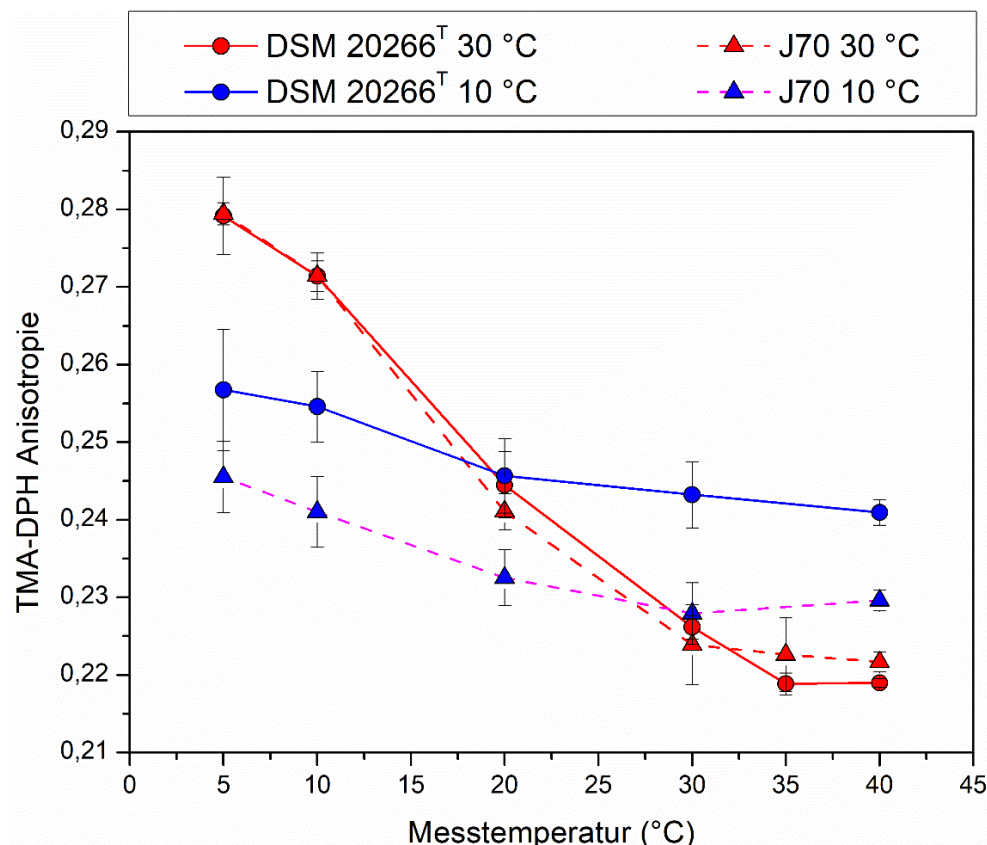
implizierte eine geringe Membranfluidität. Mit der Erhöhung der Messtemperatur nahm die TMA-DPH Anisotropie stetig ab, bis Stamm J70 bei 30 °C und DSM 20266<sup>T</sup> bei 35 °C ein Minimum von circa 0,22 erreichten. Anschließend wurde eine konstante Anisotropie bis 40 °C beobachtet. Das bedeutete auch, dass in Stamm J70 der Phasenübergang der Membran vom S<sub>o</sub>-Zustand zum L<sub>d</sub>-Zustand, im Vergleich zum Referenzstamm DSM 20266<sup>T</sup>, bereits 5 °C zuvor ereignete.



**Abbildung 38: Laurdan-GP Werte der getesteten *S. xylosus* Stämme J70 und DSM 20266<sup>T</sup>.** Die entsprechenden Stämme wurden zuvor bei 30 °C beziehungsweise 10 °C bis zur spät-exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei den 10 °C Kulturen, mit der entsprechend hohen Carotinoidbildung (Tab. 15), konnte ein komplett differenter Anisotropieverlauf über den gesamten Messbereich beobachtet werden. Diese Kulturen zeigten eine signifikant geringere Anisotropieänderung von 5 °C bis 40 °C. Dieses Verhalten deutete auf eine extrem erhöhte Membranstabilität sowie einen stark verbreiterten Phasenübergang hin. Gleichzeitig waren die Anisotropiewerte bei 5 °C mit 0,245 für Stamm J70 und 0,255 für DSM 20266<sup>T</sup> signifikant und deutlich niedriger im Vergleich zu den Carotinoid-freien Ansätzen. Daraus folgte eine stark verringerte und verbesserte

Membranfluidität der Carotinoid-haltigen Kulturen bei niedrigen Temperaturen. Andererseits sanken die Anisotropiewerte der Carotinoid-haltigen Proben nur geringfügig über den gesamten Messbereich mit den Minima von 0,24 für den Stamm DSM 20266<sup>T</sup> und 0,23 für J70. Hieraus resultierten im Vergleich zu den Carotinoid-freien Kulturen geringere Fluiditäten bei höheren Messtemperaturen.



**Abbildung 39: TMA-DPH Anisotropiewerte der *S. xylosus* Stämme J70 und DSM 20266<sup>T</sup>.** Die entsprechenden Stämme wurden zuvor bei 30 °C beziehungsweise 10 °C bis zur spät-exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.3.6 Differentielle Transkriptomanalyse zur Kälteanpassung von *S. xylosus* J70

Die Genomsequenz von *S. xylosus* J70 wurde aus 14 Contigs ( $\geq 500$  bp) zusammengesetzt, und besaß eine Gesamtgröße von 2.820.948 bp sowie einen GC-Gehalt von 32,7 %. Das größte Contig war 1.059.256 bp groß, wobei von insgesamt 28 Contigs 14 eine Mindestgröße von 1000 bp besaßen. Eine Größe über 50.000 bp besaßen noch 7 Contigs. Das assemblierte Genom wurde bei der DNA-Sequenzbank GenBank archiviert (GenBank WGS Accession number SSMH00000000). Der SPAdes Assembler sagte insgesamt 2656 einzigartige Gene voraus von

denen 2380 Gene ( $\geq 300$  bp), 282 Gene ( $\geq 1500$  bp) und 24 Gene ( $\geq 3000$  bp) eine entsprechende Mindestgröße aufwiesen. Im nächsten Schritt wurden die RNA-Extrakte depletiert, sequenziert und auf das assemblierte Genom gemappt. Die Annotation erfolgte mit Hilfe der GO-Server (The Gene Ontology Resource). Die Rohdaten der mRNA Sequenzierung wurden im NCBI SRA mit der Zugangsnummer PRJNA532330 archiviert.

Die *in situ* Reaktion von *S. xylosus* J70 ergab eine umfassende Veränderung der Genexpression bei kalten Wachstumsbedingungen. Dies führte zu 514 hochregulierten, 502 herunterregulierten und zu 1568 Genen ohne temperaturabhängigen Einfluss auf die Expressionsraten ( $< 2$  fold change). Eine Auswahl an relevanten Kälte-assoziierten Genen und ihrer differentiellen Expressionsraten sind in der Tabelle 16 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kälte-induzierte Pigmentierung des Stamms J70 von der Hochregulation des mit der Carotinoid-biosynthese verbundenen Operons *crtOPQMN* einhergeht.

**Tabelle 16: Auswahl an differentiell exprimierten Genen von *S. xylosus* J70.** Änderungen der Expressionsrate von relevanten Kälte-assoziierten Genen bei der Temperabsenkung von 30 °C auf 10 °C. Die Transkriptomanalyse erfolgte im Dreifachansatz.

Gen ID	Gen Name	Funktion	Fold change
<b>Carotinoïdsynthese</b>			
1195	<i>crtN</i>	Dehydrosqualen-Desaturase	4,4
1196	<i>crtM</i>	Dehydrosqualen-Synthase	4,1
1197	<i>crtQ</i>	4,4-Diaponeurosporenoat-Glykosyltransferase	4,1
1198	<i>crtP</i>	Diapolycopen-Oxygenase	3,9
1199	<i>crtO</i>	Glykosyl-4,4-diaponeurosporenoat Acyltransferase	4,4
<b>Betainsynthese (als Kryoschutzmittel)</b>			
1019	<i>cudB</i>	Sauerstoffabhängige Cholin-Dehydrogenase	7,6
1020	<i>cudA</i>	Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase	7,0
1021	<i>cudC</i>	Regulator für die Glycinbetain-Synthese	21,6
1022	<i>cudT</i>	Cholin-Transporter	4,0
<b>Kälteschockproteine (Csps)</b>			
1434	<i>cspA-family</i>	Kälteschockprotein A	2,1

Tabelle 16 fortgeführt:

Gen ID	Gen Name	Gen Beschreibung / Funktion	Fold change
<b>Menachinonsynthese</b>			
48	<i>menE</i>	2-Succinylbenzoat-CoA-Ligase	1,0
49	<i>menC</i>	O-Succinylbenzoesäure-Synthetase	0,9
838	<i>menB</i>	1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA-Synthase	0,9
839	<i>menH</i>	2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadien-1-carboxylatsynthase	1,2
840	<i>menD</i>	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carbonsäure-Synthase	1,2
841	<i>menF</i>	Isochorismat-Synthase	1,7
842	<i>menA</i>	1,4-dihydroxy-2-naphthoat octaprenyltransferase	0,6
<b>Housekeeping-Gene (Kontrolle)</b>			
1262	<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase Untereinheit B	1,1
1261	<i>gyrA</i>	DNA-Gyrase Untereinheit A	1,2
2221	<i>secA</i>	Preprotein Translokase Untereinheit	1,1
<b>Hitzeschockproteine (Hsps)</b>			
2397	<i>groES</i>	Co-Chaperon GroES (Hsp10)	0,2
2398	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL (Hsp60)	0,2
245	<i>hrcA</i>	wärmeinduzierbarer Transkriptionsrepressor HrcA	0,4
246	<i>grpE</i>	Co-Chaperon for DnaK	0,5
247	<i>dnaK</i>	Molekulares Chaperon DnaK (Hsp70)	0,4
248	<i>dnaJ</i>	Molekulares Chaperon DnaJ (Hsp40)	0,6

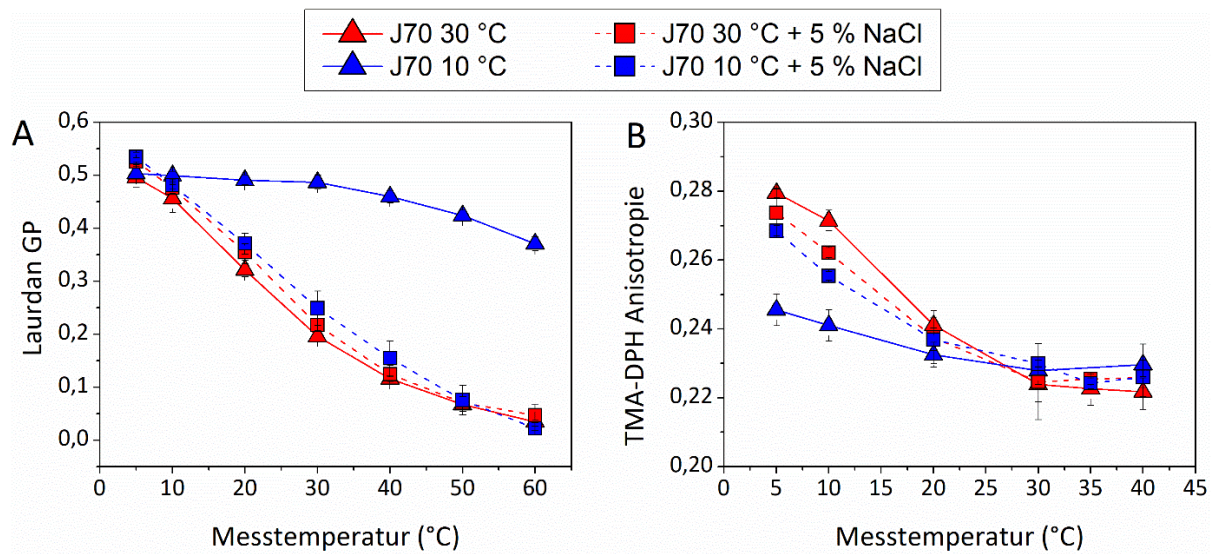
Im Durchschnitt konnte eine 4-fache Zunahme der Expressionsrate der einzelnen Gene, die an der Carotinoidsynthese beteiligt sind, verzeichnet werden. Als Referenzdatensatz für hochregulierte Gene unter niedrigen Wachstumstemperaturen wurden die Expressionsraten der Gene *cudBACT*, kodierend für die Proteine der Betainbiosynthese und ein Gen der *cspA*-Familie, verwendet. Hier zeigte sich eine 2 bis 22-fache Hochregulation bei niedrigen Temperaturen. Gene die mit der Menachinonbiosynthese (*menA-F*) assoziiert sind, zeigten im Durchschnitt keine signifikante Veränderung. Zur weiteren Bestätigung wurde ein Satz von sechs Hitzeschockproteinen-(Hsps)-kodierenden Genen ausgewählt, welche eine deutlich reduzierte Expression bei niedrigen Temperaturen besaßen. Die Gene *groEL* und *groES* zeigten eine bemerkenswerte 5-fache Verringerung der Expressionsrate, obwohl ihre Funktion der

korrekten Proteinfaltung einen ziemlich grundlegenden Mechanismus darstellt. Als Referenzgene, ohne eine erwartete Veränderung des Expressionsniveaus, wurden drei *house-keeping* Gene *gyrA*, *gyrB* und *secA* aufgeführt, die keine temperaturabhängige Änderung der Expression zeigten.

#### **3.3.7 Verifikation der Carotinoid-abhängigen Kälteadaptation der Zellmembran**

Um die Auswirkung von Carotinoiden auf die Zellmembranordnung sowie -fluidität zu überprüfen, wurde ihre Konzentration bei niedrigen Wachstumstemperaturen durch die Inhibition der Carotinoidsynthese reduziert. Die anfängliche Inhibition wurde mit der Supplementation von DPA erreicht (2.1.1.2). Bei einer Konzentration von 74  $\mu\text{M}$  konnte ein vollständiger Verlust der Pigmentierung beobachtet werden. Aufgrund der starken Akkumulation von DPA in der Zellmembran zeichnete sich eine deutliche Veränderung der gemessenen Membranparameter ab (Daten nicht gezeigt). Somit konnte dieser Ansatz nicht für diese Arbeit verwendet werden. Die Synthese wurde durch die Zugabe von Natriumchlorid nach einem Bericht von FONG *et al.* (26) inhibiert. Sie berichteten über den Zusammenhang zwischen NaCl-Konzentration und Carotinoidsynthese bei einem *Arthrobacter*-Stamm. Eine ähnliche Korrelation konnte für die analysierten *S. xylosum*-Stämme beobachtet werden. Beide Stämme wurden mit einer NaCl-Supplementierung von 2,5 %, 5 % und 10 % getestet. Es konnte nur eine geringe Reduktion der Zellpigmentierung bei 2,5 % NaCl-Zugabe beobachtet werden. Bei 10 % NaCl-Addition zeigten Zellen beider Stämme keine Pigmentation mehr auf, aber der hohe Salzstress hatte einen negativen Einfluss auf die Wachstumsrate. Folglich waren diese beiden Konzentrationen nicht geeignet für die Hemmung der Carotinoidsynthese. Die 5-%-ige NaCl-Supplementierung erreichte eine nahezu vollständige Hemmung der Carotinoidsynthese im Stamm J70 bei niedrigen Wachstumstemperaturen. Dies ermöglichte es uns, die Wirkung von Carotinoiden auf die biophysikalischen Zellmembranparameter bei gleicher Wachstumstemperatur zu überprüfen. Zuerst wurde eine mögliche Auswirkung der NaCl-Supplementierung auf die Fettsäurezusammensetzung kontrolliert. Es konnte gezeigt werden, dass die NaCl-Supplementierung nur einen geringen Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung hatte (Tab. 13). Die berechneten WAMT-Werte indizierten einen ähnlichen Grad der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation, unabhängig von den Salzkonzentrationen. Darüber hinaus konnte keine Beeinträchtigung der Wachstumsraten bei einer 5-%-igen NaCl-Supplementation festgestellt werden.





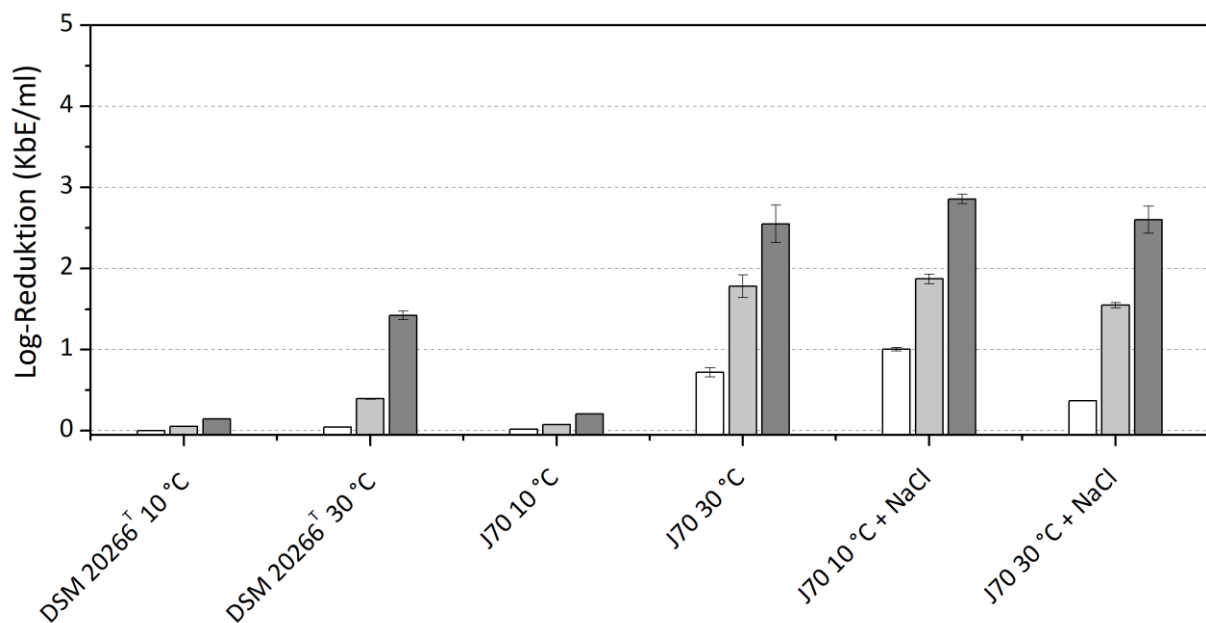
**Abbildung 40: Auswirkung der Carotinoidsynthese-Inhibition auf Laurdan-GP (A) und TMA-DPH Anisotropiewerte (B) in dem *S. xylosus* Stamm J70.** Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Der verminderte Carotinoidgehalt in den supplementierten 10 °C Ansätzen zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Membranordnung und -fluidität (Abb. 40). Die starke Induktion der Membranordnung, verursacht durch die hohe Carotinoidkonzentration, ging vollständig verloren und resultierte in einen vergleichbaren Rückgang der Laurdan GP-Werte wie sie zuvor für die Carotinoid-freien Proben beobachtet werden konnte (Abb. 40A). Die TMA-DPH-Anisotropiewerte zeigten die Konformität des Phasenübergangsmusters zwischen Carotinoid-freien Proben, die bei 30 °C und 10 °C gewachsen sind sowie der mit den NaCl-supplementierten Kulturen (Abb. 40B). Dies führte zu einer Verschlechterung der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen. Die NaCl-Supplementierung von Kulturen, die bei 30 °C inkubiert wurden, bestätigte, dass die NaCl-Zugabe selbst keinen Einfluss auf die Membranordnung und Fluidität hatte.

### 3.3.8 Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen als Maß der Kälteanpassung mittels eines Gefrier-Auftau-Stresstests

Ein mehrstufiger Gefrier-Auftau-Stresstest sollte auch in diesem Fall das Ausmaß der Kälteresistenz feststellen und gegebenenfalls eine Abhängigkeit vom Carotinoidgehalt aufdecken. Die Zellen wurden in der entsprechenden Wachstumsphase geerntet und gewaschen. Für die Ausgangskeimzahl wurde eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt und

die restlichen Proben eingefroren (Abschnitt 2.1.3). Beide *S. xylosus* Stämme zeigten eine deutliche Reduktion der Lebendzellzahl nach einer Inkubation bei 30 °C im Vergleich zu den 10 °C Kulturen. Bei 30 °C reduzierte sich die Lebendzellzahl stetig bei jedem Gefrier-Auftau-Schritt bis zu einer Log-Stufe von 1 beim Stamm DSM 20266<sup>T</sup> und 2 Log-Stufen bei J70. Die stark pigmentierten 10 °C Kulturen wiesen, selbst nach dem dritten Gefrier-Auftau-Schritt, keine relevante Reduktion der Lebendzellzahl auf. Zur Verifikation der Korrelation zwischen Carotinoidkonzentration und der erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber einem Gefrier-Auftau-Stress wurden ebenfalls NaCl-supplementierte J70 Kulturen diesem Test unterzogen. Die NaCl supplementierten 10 °C Kulturen mit einer inhibierten Carotinoidsynthese verloren ihre Resistenz und zeigten eine vergleichbare Reduktion der Lebendzellzahl wie die entsprechenden 30 °C Kulturen mit entsprechend fehlender Carotinoidsynthese. Zusätzlich wurden 30 °C Kulturen des Stamms J70 mit NaCl supplementiert. Aufgrund der fehlenden Carotinoidsynthese bei dieser Temperatur konnte der Einfluss des Salzstresses überprüft werden. Die gezeigten Daten deuteten darauf hin, dass kein relevanter Einfluss des Salzstresses auf die Gefrier-Auftau-Resistenz vorlag (Abb. 41).



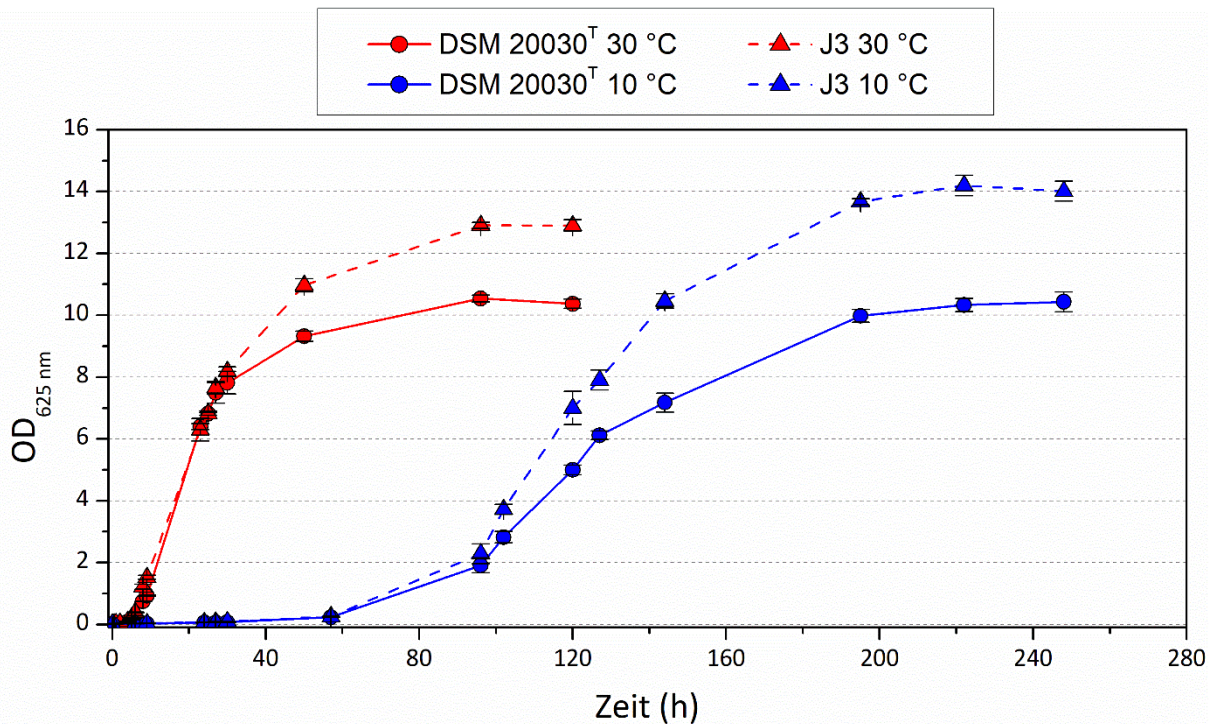
**Abbildung 41: Gefrier-Auftau-Stresstest der untersuchten *S. xylosus* Stämme.** Logarithmische Reduktion der Lebendzellzahl der getesteten Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70 bei beiden Wachstumstemperaturen. Zusätzlicher Stresstest mit 5%-ig supplementierten J70 Kulturen. Aufgetragen ist die logarithmische Reduktion nach 1 (weiß), 2 (hellgrau) und 3 (grau) Gefrier-Auftau-Zyklen (je 24 h). Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.4 Auswirkung der Fettsäure-unabhängigen Membranmodifikation durch erhöhten Carotinoidgehalt in *Micrococcus luteus* bei niedrigen Temperaturen

Zuletzt werden die gewonnenen Ergebnisse zum Modellorganismus *M. luteus* dargestellt. Hierbei standen weiterhin Carotinoide im Fokus einer Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation. Zur Verfügung standen ebenfalls ein Lebensmittel-assoziiertes Isolat mit der Bezeichnung Stamm J3 und als Referenzstamm wurde der nächstverwandte Typstamm DSM 20300<sup>T</sup> verwendet. Der Stamm J3 wurde aus einer Auswahl von acht verschiedenen Isolaten, die zu diesem Zeitraum in der Arbeitsgruppe isoliert worden waren, selektiert. Als Merkmal diente der visuelle bestimmte Pigmentierungsgrad der Kolonien bei 30 °C und 10 °C. Dabei wies Stamm J3 den deutlichsten Unterschied in der temperaturabhängigen Pigmentierung auf. Im Gegensatz zu den *S. xylosus* Stämmen zeigten alle *M. luteus* Stämme bereits eine sichtbare Gelbfärbung der Kolonien bei mesophilen Temperaturbedingungen. Das bot aber die Möglichkeit die temperaturabhängige Zusammensetzung der produzierten Carotinoide zu untersuchen und zum Beispiel den Einfluss von verschiedenen polaren Carotinoiden auf die Membraneigenschaften zu untersuchen.

#### 3.4.1 Wachstumsverlauf der beiden untersuchten *M. luteus* Stämme bei 30 °C und 10 °C

Die Inokulation der Hauptkulturen und die Dokumentation des Wachstums erfolgte gemäß der Abschnitte 2.1.1.2 und 2.1.2. Die Daten der Abbildung 42 zeigen in arithmetischer Darstellung den Wachstumsverlauf der beiden Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 bei den beiden verwendeten Temperaturen, wobei hierbei der Zellertrag abgeleitet werden konnte. Die halb-logarithmische Darstellung legte die Grundlage für die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate und die Beurteilung der einzelnen Wachstumsphasen (Anhang 3). Bei 30 °C Wachstumstemperatur zeigte der Stamm J3 im Vergleich zum Typstamm DSM 20030<sup>T</sup> ein besseres Wachstum auf. Die halbstündige Lag-Phase ging in die exponentielle Wachstumsphase über, wobei eine maximale Wachstumsrate von 0,58 h<sup>-1</sup> erreicht wurde (Tab. 17), was einer Verdopplungszeit von 1,2 h entsprach. Die maximale OD<sub>625 nm</sub> 12,9 wurde nach 96 h erreicht und bildete sogleich den Beginn der stationären Phase. Beim Typstamm verdoppelte sich die Lag-Phase auf eine Stunde. Der maximale Zellertrag mit OD<sub>625 nm</sub> ~ 10,5 lag deutlich unter dem gemessenen Wert für den Stamm J3 und wurde ebenfalls nach 96 h erreicht.



**Abbildung 42: Arithmetische Darstellung des Wachstumsverlaufs von *M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup> und J3 bei 30 °C und 10 °C.** Inkubation fand unter aeroben Bedingungen statt. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Reduktion der Wachstumstemperatur äußerte sich insbesondere in einer Verringerung der Wachstumsrate, die für beide Stämme  $0,05 \text{ h}^{-1}$  betrug. Das entsprach in etwa einer Verdopplung alle 13,5 Stunden (Tab. 17). Entgegen der Erwartung wurde innerhalb des ersten Messintervalls von 6 h für beide Stämme keine Lag-Phase detektiert (Anhang 3). Der Typstamm erreichte nach 195 h die stationäre Phase und konnte mit einer maximalen  $\text{OD}_{625\text{nm}} \sim 10,5$  denselben Zellertag wie bei mesophilen Temperaturbedingungen erzielen. Der Stamm J3 erreichte die stationäre Phase zwar auch nach etwa 195 h, jedoch steigerte sich der Zellertrag im Vergleich zu 30 °C um 10 % und betrug  $\text{OD}_{625\text{nm}} 14,2$ .

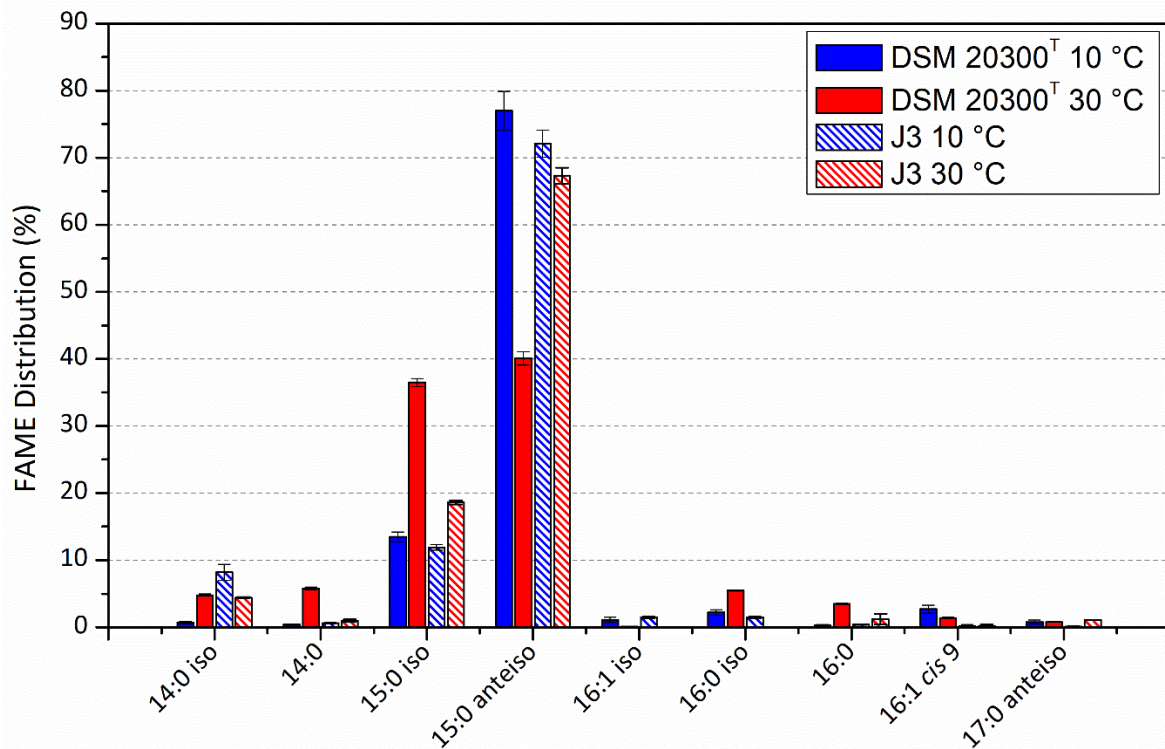
**Tabelle 17: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der untersuchten *M. luteus* Stämme.** Unterteilt nach den Wachstumstemperaturen von 30 °C und 10 °C in TSB-Medium. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Das ±-Zeichen repräsentiert die Standardabweichung. Wachstumsunterschiede der beiden Stämme waren statistisch signifikant für 30 °C ( $p < 0,01$ ).

Stamm	30 °C		10 °C	
	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)
DSM 20030 <sup>T</sup>	0,53 ± 0,01	1,31 ± 0,03	0,05 ± 0,00	13,44 ± 0,15
J3	0,58 ± 0,01	1,20 ± 0,03	0,05 ± 0,00	13,49 ± 0,18

### 3.4.2 Fettsäureanalyse 30 °C und 10 °C als Maß zur Fettsäure-abhängigen Membrananpassung in den beiden *M. luteus* Stämmen

Nachdem das Wachstum erfasst und die spät-exponentielle Wachstumsphase bestimmt werden konnte, wurde die Fettsäure-abhängige Kälteadaptation der Zellmembran bestimmt. Die Fettsäuren wurden wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben extrahiert, derivatisiert und mittels GC-MS identifiziert.

Die Hauptfettsäuren waren bei beiden untersuchten Stämmen 15:0 anteiso und 15:0 iso unabhängig von der Temperatur (Abb. 43). Je nach Temperatur konnten verschiedene Nebenfettsäuren beobachtet werden. Die gesättigten, verzweigten Fettsäuren waren unabhängig der Temperatur mindestens zu 90 % vertreten. Im Gegensatz zu den Fettsäureprofilen bei 10 °C konnte bei 30 °C ein deutlicher Unterschied zwischen den Stämmen beobachtet werden. Der Typstamm DSM 20300<sup>T</sup> besaß mit 36 % der Fettsäure 15:0 iso und 40 % der Fettsäure 15:0 anteiso eine beinahe 1:1-Verteilung der beiden Hauptfettsäuren. Bei Stamm J3 verschob sich diese Verteilung bereits bei 30 °C zu Gunsten der Fettsäure 15:0 anteiso, sodass deren Anteil mit 67 % 30 Prozentpunkte höher lag im Vergleich zum Referenzstamm. Dementsprechend fiel der Anteil der Fettsäure 15:0 iso mit 19 % niedriger aus. Auch die Anteile der Nebenfettsäure waren bei beiden Stämmen unterschiedlich. Bei Stamm J3 war nur die Fettsäure 14:0 iso nennenswert vorhanden, wohingegen bei DSM 20300<sup>T</sup> daneben noch die Fettsäuren 14:0, 16:0 iso und 16:0 zu nennen waren.



**Abbildung 43: FAME Distribution von *M. luteus* als Säulendiagramm.** Detektierte FAMEs mit einem Mindestanteil von 1 % der beiden Stämme bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die 10 °C Inkubation der Kulturen hatte folglich für den Referenzstamm eine deutlich größere Änderung zur Folge (Abb. 43). Die Fettsäure 15:0 anteiso war mit 70 bis 80 % die dominanteste Fettsäure, was mit einer Reduktion des Anteils an der Fettsäure 15:0 iso einherging. Beide Stämme zeigten einen leichten Anstieg zweier ungesättigter Fettsäuren 16:1 *cis* 9 und 16:1 iso, die zusammen ungefähr einen Anteil von 3 % erreichten. Beim Stamm J3 zeigte sich zusätzlich noch eine Verdoppelung des Anteils der verzweigten Fettsäure 14:0 iso von 4 % auf 8 %. Aufgrund der genannten Unterschiede besaßen beide Stämme bei 10 °C einen ähnlichen WAMT-Wert von ungefähr 30 °C. Das Wachstum bei 30 °C resultierte in divergenten WAMT-Werten von 40 °C für Stamm DSM 20300<sup>T</sup> und 33 °C für den Stamm J3 (Tab. 18). Dementsprechend fiel die Fettsäure-abhängige Kälteadaptation für den Referenzstamm ( $\Delta\text{WAMT} = 12,1$  °C), verglichen mit Stamm J3 ( $\Delta\text{WAMT} = 3,1$  °C), deutlicher stärker aus. Eine quantitative Änderung des Fettsäuregehalt bei den beiden Wachstumstemperaturen konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 18: FAME-Verteilung von *M. luteus*.** Detektierte FAMEs der beiden Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Schmelztemperaturen der einzelnen Fettsäuren für die Berechnung der WAMT-Werte wurde aus KNOTHE & DUNN (2009) entnommen. Das ±-Zeichen repräsentiert die Standardabweichung.

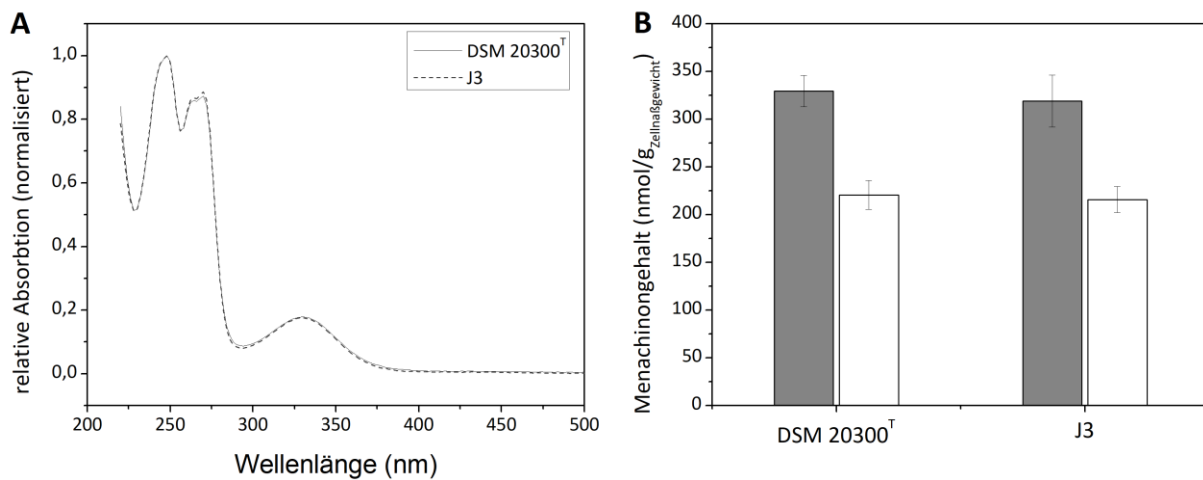
Wachstumstemperatur					
FAME (%)	Stamm	DSM 20030 <sup>T</sup>		J3	
		10 °C	30 °C	10 °C	30 °C
13:0 iso		n.d.	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	n.d.
13:0 anteiso		n.d.	0,2 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1
14:0 iso		0,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	8,2 ± 1,2	4,4 ± 0,1
14:0		0,4 ± 0,1	5,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2
15:0 iso		13,5 ± 0,7	36,5 ± 0,6	11,9 ± 0,4	18,6 ± 0,3
15:0 anteiso		77,0 ± 2,9	40,1 ± 1,0	72,1 ± 2,0	67,3 ± 1,2
16:1 iso		1,1 ± 0,4	0,1 ± 0,0	1,5 ± 0,2	n.d.
16:0 iso		2,2 ± 0,4	5,5 ± 0,1	2,7 ± 0,3	5,6 ± 0,1
16:0		0,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,8
16:1 <i>cis</i> 9		2,7 ± 0,6	1,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
17:0 iso		n.d.	0,2 ± 0,0	n.d.	n.d.
17:0 anteiso		0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0
WAMT (°C)		28,0	40,1	30,2	33,3
ΔWAMT (°C)		12,1		3,1	

n.d. = nicht detektiert

### 3.4.3 Analyse des isoprenoiden Chinongehaltes in *M. luteus*

Für die Analyse der isoprenoiden Chinone wurde nasses Zellmaterial aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben, wurden die Chinone nach einer modifizierten Methode von HU *et al.* (1999) extrahiert, mittels SPE-Säulchen aufgereinigt und chromatographisch mit einer HPLC qualitativ und quantitativ determiniert. Für diesen Modellorganismus diente dieser Punkt hauptsächlich, um bei einer

möglichen Carotinoid-abhängigen Kälteadaptation der Zellmembran eine Ko-Auswirkung aufgrund erhöhter Chinonkonzentrationen bei niedrigen Temperaturen auszuschließen.



**Abbildung 44: Menachinonspektren und -gehalt in *M. luteus*.** A: Darstellung der detektierten Menachinonspektren der beiden *M. luteus* Stämme DSM 20300<sup>T</sup> und J3. Stellvertretend dargestellt MK-8 und MK-8(H<sub>2</sub>) für die jeweiligen detektierten Peaks. B: Gesamtchinongehalt (nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub>) der beiden Stämme im spät-exponentiellen Wachstumsbereich bei 30 °C (grau) und 10 °C (weiß) Wachstumstemperatur. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei den beiden untersuchten *M. luteus* Stämmen DSM 20300<sup>T</sup> und J3 konnten im Vergleich zu den restlichen untersuchten Stämmen die meisten Peaks detektiert werden. Bei Stamm J3 handelte es sich um fünf Peaks bei 30 °C und vier Peaks bei 10 °C. Der Typstamm besaß sieben Peaks bei 30 °C und vier Peaks bei 10 °C. Die Absorptionsspektren waren für alle Peaks und Proben bei beiden Wachstumstemperaturen identisch und zeigten die Menachinon-spezifischen Peaks bei 248 nm, einen Doppelpeak bei 261 nm und 270 nm und einen breiten Peak bei circa 325 nm (Abb. 44). Hierbei wurden exemplarisch die Absorptionsspektren der größten Peaks des jeweiligen Stammes dargestellt. Bei Stamm J3 konnten die fünf Peaks detektiert bei 30 °C, anhand ihrer relativen Retentionszeit zum verwendeten Standard VitaminK<sub>1</sub>, als MK-6(H<sub>2</sub>), MK-7(H<sub>2</sub>), MK-8, MK-8(H<sub>2</sub>) und MK-9(H<sub>2</sub>) bestimmt werden (Tab. 19). Bei dem Hauptchinon handelte es sich um MK-8(H<sub>2</sub>) mit 80 %. Die restlichen Menachinone hatten einen Anteil von 2-8 %. Die Reduktion der Wachstumstemperatur auf 10 °C hatte zur Folge, dass MK-6(H<sub>2</sub>) nicht mehr detektiert wurde und sich der Anteil des Hauptchinons auf 87 % erhöhte. Der Anteil an MK-9(H<sub>2</sub>) reduzierte sich von 8 % auf 3 % und der Anteil von MK-7(H<sub>2</sub>) erhöhte sich um zwei Prozentpunkte auf 8 %.



**Tabelle 19: Qualitative Menachinonbestimmung von *M. luteus*.** Retentionszeiten (RT) der detektierten Peaks für die Stämme DSM 20300<sup>T</sup> und J3. Angegebene RT stellen einen Mittelwert dar (n = 6). Als Standard wurde Vitamin K<sub>1</sub> verwendet mit einer gemittelten RT von 6,26 ± 0,04 min. Das ±-Zeichen repräsentiert die Standardabweichung.

Stamm	Peak-		RT relativ zu		Entsprechendes	Anteil 30 °C (%)	Anteil 10 °C (%)
	Nummer	RT (min)	Stamm	Vitamin K <sub>1</sub>			
DSM 20300 <sup>T</sup>	1	5,87 ± 0,01		0,94	MK-5	2,2	n.d.
	2	7,11 ± 0,01		1,13	MK-6	2,6	n.d.
	3	8,73 ± 0,01		1,39	MK-7	4,8	5,3
	4	9,64 ± 0,02		1,54	MK-7(H <sub>2</sub> )	n.d.	4,6
	5	10,97 ± 0,04		1,75	MK-8	65,5	51,2
	6	12,19 ± 0,04		1,94	MK-8(H <sub>2</sub> )	16,1	38,9
	7	14,02 ± 0,01		2,24	MK-9(H <sub>2</sub> )	7,0	n.d.
	8	15,63 ± 0,02		2,50	MK-9(H <sub>4</sub> )	1,8	n.d.
J3	1	7,79 ± 0,10		1,24	MK-6(H <sub>2</sub> )	4,6	n.d.
	2	9,64 ± 0,03		1,54	MK-7(H <sub>2</sub> )	5,9	8,0
	3	10,97 ± 0,04		1,75	MK-8	2,0	2,1
	4	12,19 ± 0,05		1,94	MK-8(H <sub>2</sub> )	79,3	87,0
	5	15,63 ± 0,07		2,50	MK-9(H <sub>4</sub> )	8,1	2,9

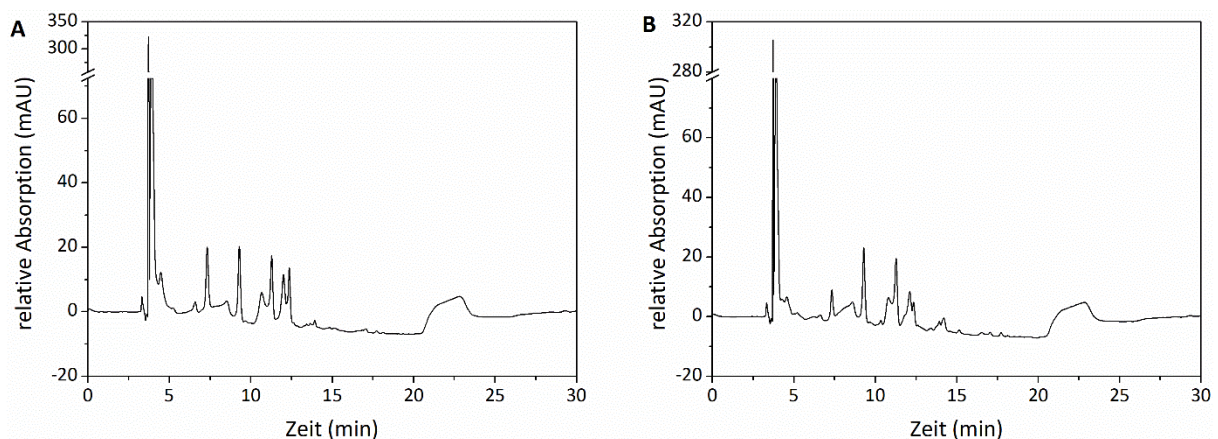
n.d. = nicht detektiert

Der Typstamm wies eine abweichende Menachinon-Zusammensetzung im Vergleich zum verwendeten Lebensmittelisolat J3 auf. Bei 30 °C wurden insgesamt sieben verschiedene Menachinone identifiziert (Tab. 19). Dabei handelte es sich um MK-5, MK-6, MK-7, MK-7(H<sub>2</sub>), MK-8, MK-8(H<sub>2</sub>), MK-9(H<sub>2</sub>) und MK-9(H<sub>4</sub>). Die Hauptchinone waren MK-8 mit einem Anteil von 66 % und MK-8(H<sub>2</sub>) mit 16 %. Die restlichen Minorkomponenten besaßen einen Anteil von 2-7 %. Die Inkubation bei niedrigen Temperaturen führte zu einer Reduktion der Anzahl an detektierten Peaks auf vier. Bei den Hauptchinonen verdoppelte sich der Anteil an MK-8(H<sub>2</sub>) auf 39 % wohingegen sich der Anteil an MK-8 auf 51 % reduzierte. Die beiden Minorkomponenten MK-7 und MK-7(H<sub>2</sub>) waren gleich stark vertreten mit je 5 %. Analog zu den *S. xylosus* Stämmen hatte die Inkubation bei 10 °C eine Reduktion des Gesamt-Menachinongehaltes zur Folge. In Stamm J3 reduzierte sich der Menachinongehalt von 319,2 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> auf 215,9 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> (Abb. 44). Im Typstamm war der Menachinongehalt vergleichbar, dieser wurde bei 30 °C mit 329,6 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> quantifiziert und reduzierte sich auf 220,6 nmol/g<sub>Zellnaßgewicht</sub> bei der niedrigen

Inkubationstemperatur. Für beide Stämme stellte das einen 33-%-igen Verlust des Menachinongehaltes dar.

#### 3.4.4 Carotinoidanalyse von *M. luteus* zur Bestimmung des potentiellen Fettsäure-unabhängigen Kälteanpassungsmechanismus

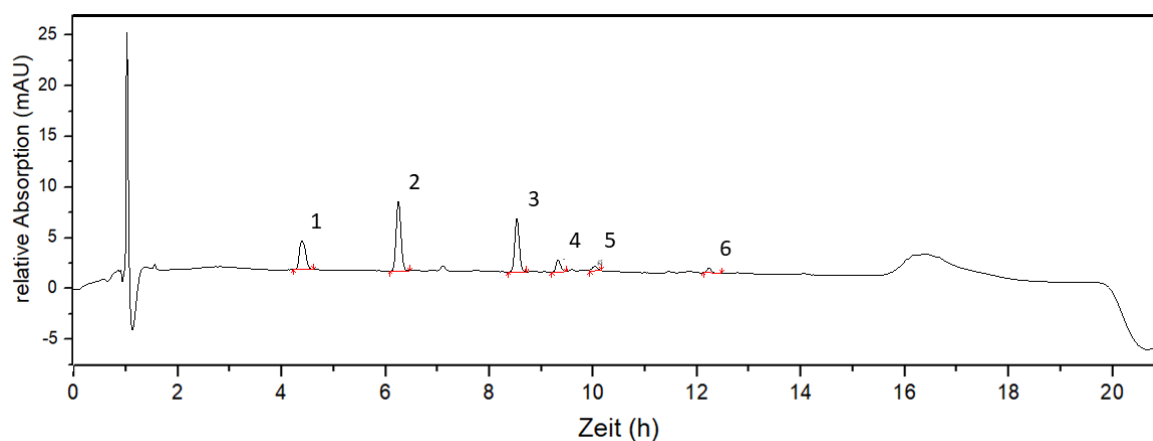
Analog zu den *S. xylosus* Proben zeigten die Carotinoid-Extrakte der beiden *M. luteus* Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 ebenfalls keine ausreichende Auftrennung anhand der C-18-RP-Säule (Abb. 45). Sodass auch in diesem sowohl Fall die Quantifizierung als auch die Identifikation an einer (U)HPLC samt C30-RP-Säule in Kooperation mit der AG Molekulare Lebensmitteltechnologie erfolgte.



**Abbildung 45: Chromatogramm der *M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup> Carotinoidaufreinigung an einer C18-RP-Säule.** HPLC-Analyse nach Abschnitt 2.2.3, Linie zeigt die Integration der aufgezeichneten Spektren bei 450 nm. Chromatogramme zeigen die Extrakte nach einer Inkubation bei 30 °C (A) und 10 °C (B). Repräsentativ für beide Stämme.

Die Extraktion und Auftrennung mittels (U)HPLC erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Die verbesserte Trennleistung ermöglichte die Detektion der einzelnen Peaks und deren Integration anhand der Basislinie. Repräsentativ für beide *M. luteus* Stämme wird in Abbildung 46 das Chromatogramm für Stamm DSM 20030<sup>T</sup> bei 30 °C Wachstumstemperatur gezeigt. Peaks 1, 2 und 3 wurden in jedem Ansatz detektiert. Peaks 4, 5 und 6 variierten je nach Stamm und Inkubationstemperatur (Tab. 20).

Die Kolonien der beiden *M. luteus* Stämme zeigten bei 30 °C bereits eine Pigmentierung auf, die sich bei niedrigen Temperaturen zumindest für Stamm J3 nochmals visuell verstärkte. Dies zeigte sich auch an den ermittelten Gesamtkonzentrationen. Beide Stämme erreichten bei 10 °C eine Carotinoidkonzentration von etwa 110 µg/g<sub>Zelltrockengewicht</sub>. Bei 30 °C reduzierte sich der Gehalt für den Typstamm DSM 20030<sup>T</sup> auf circa 81 µg/g<sub>Zelltrockengewicht</sub> (-27 %) und für den Stamm J3 auf 49 µg/g<sub>Zelltrockengewicht</sub> (-55 %). Anhand der Massenspektrometer gekoppelten HPLC konnten für alle Ansätze die ersten drei Peaks als Hauptcarotinoide identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die erwarteten Endprodukte Sarcinaxanthin und die entsprechenden Mono- und Diglucosid-Derivate (NETZER *et al.*, 2010). Von den restlichen Peaks konnte nur Peak 5 als putatives Sarcinen identifiziert werden. Peak 4 und 6 konnten nur nach der Inkubation bei 30 °C detektiert werden und besaßen dasselbe Absorptionsspektrum (Anhang 5), konnten jedoch nicht identifiziert werden.



**Abbildung 46: Chromatogramm der *M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup> Carotinoidaufreinigung an einer C30-RP-Säule.** HPLC-Analyse nach Abschnitt 2.2.3 an einem (U)HPLC-System, Linie zeigt die Integration der aufgezeichneten Spektren bei 450 nm. Chromatogramme zeigen die Extrakte nach einer Inkubation bei 30 °C. Injektionsvolumen betrug 5 µl. Peaks 1, 2 und 3 wurden in jedem Ansatz detektiert. Peaks 4, 5 und 6 variierten je nach Stamm und Inkubationstemperatur (Tab. 20).

Die Temperaturreduktion äußerte sich für den Stamm DSM 20030<sup>T</sup> in einer moderaten Zunahme des polarsten Carotinoids Sarcinaxanthin-Diglucosid um 15 Prozentpunkt auf 35,6 % und des vermuteten Sarcinens von 2,8 % auf 10,5 %. Ansonsten zeigten die Hauptcarotinoide eine ähnliche Verteilung auf. Gleichzeitig konnten die unbekanntenen Peaks 4 sowie 6 nicht mehr detektiert werden. Der Stamm J3 zeigte bereits bei 30 °C eine Verteilung der Hauptcarotinoide, die mit der Carotinoiddistribution des Typstamm bei 10 °C vergleichbar war. Die Temperaturreduktion hatte eine starke Verschiebung zum polarsten Carotinoid zur Folge. Sarcinaxanthin besaß einen Anteil von 86,2 % und das einfach glucosylierte Carotinoid konnte

### 3 Ergebnisse

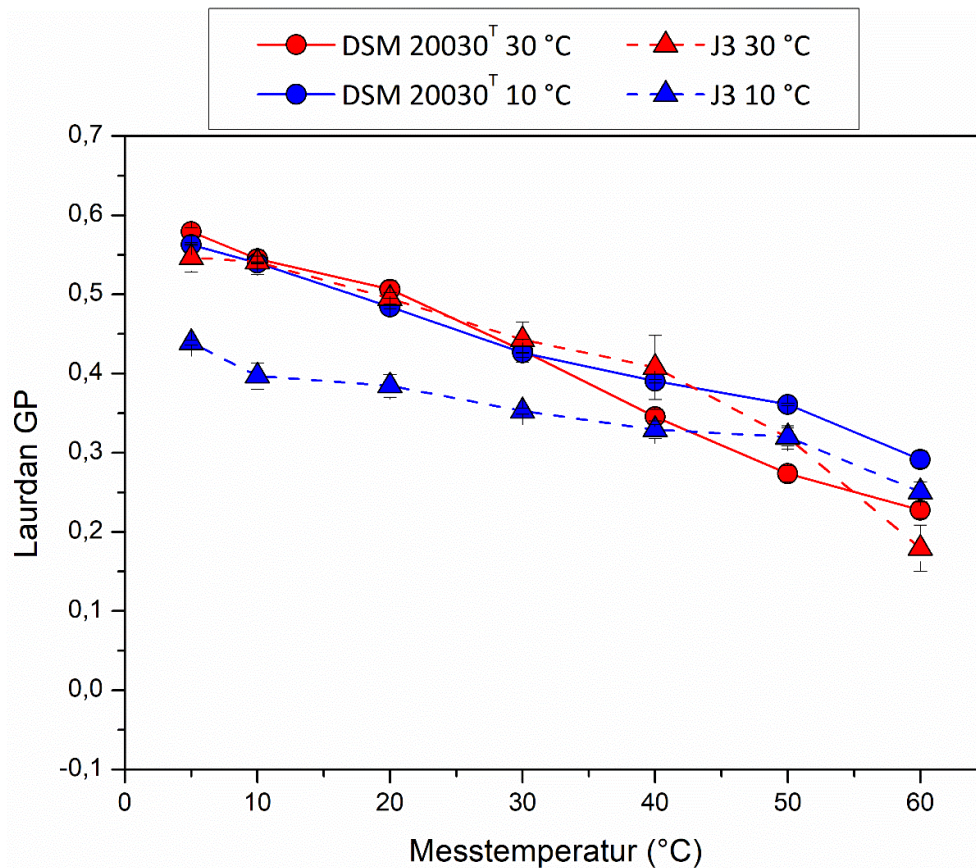
noch zu 10 % detektiert werden. Das underivatisierte Sarcinaxanthin verringerte seinen Anteil von 17,6 % auf 3,6 %. Die Minorkomponenten waren im Stamm J3 kaum vertreten. Einzig das unbekannte Carotinoid\_1 konnte bei der 30 °C Inkubation mit einem Anteil von 1,8 °C detektiert werden (Tab. 20).

**Tabelle 20: Carotinoid-Zusammensetzung in % der *M. luteus* Stämme J3 und DSM 20030<sup>T</sup> bezogen auf die Wachstumstemperatur.** Chromatogramm, erhalten durch die HPLC-DAD-APCI-MSn. Die Gesamtkonzentration der Carotinoide wird in ( $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{Zellrockengewicht}}$ ) dargestellt. N.d. = nicht detektiert, unterhalb der Nachweisgrenze von  $0,2 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{Zellrockengewicht}}$ . (n = 3 biologische Replikate). Das  $\pm$ -Zeichen stellt die Standardabweichung dar.

Peak-Nr.	Carotinoidanteil (%)	Stamm $t_R$ (min) UV	DSM 20030 <sup>T</sup>		J3	
			10 °C	30 °C	10 °C	30 °C
1	Sarcinaxanthin Diglucosid	4,403	35,6	20,6	86,2	40,3
2	Sarcinaxanthin Monoglucosid	6,263	31,6	39,7	10,2	40,3
3	Sarcinaxanthin	8,540	22,3	28,0	3,6	17,6
4	Unbekanntes Carotinoid_1	9,333	n.d.	6,4	n.d.	1,8
5	Vermutlich Sarcinene	9,972	10,5	2,8	n.d.	n.d.
6	Unbekanntes Carotinoid_2	12,238	n.d.	2,5	n.d.	n.d.
<b>Gesamt-Carotinoidkonzentration</b> ( $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{Zellrockengewicht}}$ )			108,1 $\pm$ 9,7	81,2 $\pm$ 9,7	112,6 $\pm$ 18,6	49,2 $\pm$ 5,5.

#### 3.4.5 Bestimmung der Zellmembraneigenschaften, Membranordnung und -fluidität in *M. luteus*

Die vorherigen Ergebnisse zeigten eine relevante Reduktion des Menachinongehaltes (Abschnitt 3.4.3) und eine leichte (Stamm DSM 20030<sup>T</sup>) bis moderate (Stamm J3) Zunahme der Carotinoidkonzentration (Abschnitt 3.4.4). Insbesondere der Stamm J3 zeigte eine ausgeprägte Verschiebung der Carotinoidzusammensetzung zum polarsten Carotinoid Sarcinaxanthin-Diglucosid (Tab. 20). Die Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen sollten auch in diesem Fall die Auswirkung dieser Fettsäure-unabhängigen Adaptation auf die Eigenschaften der Zellmembran aufzeigen. Die beiden Parameter, Ordnung und Fluidität der Membran, wurden wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben, bestimmt.



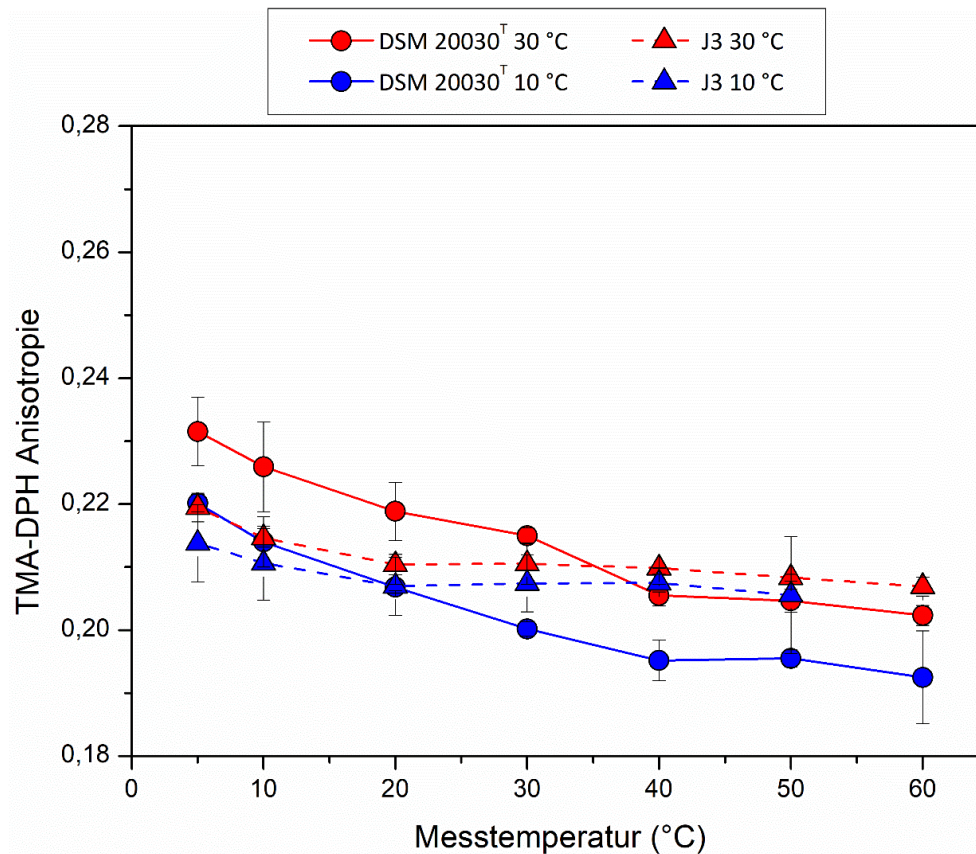
**Abbildung 47: Laurdan-GP Werte der getesteten *M. luteus* Stämme J3 und DSM 20030<sup>T</sup>.** Messbereich von 5 °C bis 60 °C. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

In Abbildung 47 sind die Laurdan-GP Daten der Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 bei den beiden untersuchten Wachstumstemperaturen dargestellt. Die Messung erfolgte in einem Temperaturbereich von 5-60 °C. Wie erwartet zeigte sich für den Stamm DSM 20030<sup>T</sup> ein ähnlicher Kurvenverlauf für beide Inkubationsbedingungen. Bei niedrigen Messtemperaturen lag der maximale GP-Wert von 0,56-0,57 vor und implizierte eine sehr hohe Membranordnung. Die Temperaturzunahme bis 30 °C äußerte sich in beiden Stämmen in einer identischen Reduktion des GP-Wertes auf circa 0,45. Die weitere Erwärmung des Probenhalters resultierte in einer geringeren Abnahme der 10 °C Kulturen auf einen GP-Wert von 0,3 im Vergleich zu den 30 ° inkubierten Kulturen, deren GP-Wert sich auf circa 0,25 reduzierte und somit einen leicht höheren Grad der Membranunordnung aufwies. Möglicherweise resultierte diese Diskrepanz durch den Unterschied der Carotinoidkonzentration. Die 30 °C Kultur des Stamm J3 zeigte einen nahezu identischen Verlauf mit den beiden zuvor beschriebenen Kurven des Typstamms. Die Unterscheidung trat wiederum oberhalb der Messtemperatur von 30 °C auf. Hierbei zeigte sich die stärkste Abnahme des GP-Werts aller Ansätze auf 0,18. Dadurch zeigte

sich, dass der Ansatz mit der geringsten Carotinoidkonzentration die stärkste Zunahme des Grades der Membranunordnung aufwies.

Die 10 °C inkubierten Ansätze des Stamms J3 zeigten ein teilweise unerwartetes Verhalten bezüglich des GP-Wertes auf, denn die gemessenen GP-Werte bei niedrigen Temperaturen waren mit 0,45-0,4 deutlich niedriger im Vergleich zu den restlichen Ansätzen. Aufgrund der hohen Carotinoidkonzentration und dem hohen Anteil des polarsten Carotinoides wurde ebenfalls eine sehr hohe Membranordnung analog zu den restlichen Ansätzen erwartet. Eine mögliche Begründung könnten die entsprechenden Absorptionsspektren bieten und werden unter Abschnitt 4.2.8 diskutiert. Im Gegensatz zu den anderen Ansätzen zeigte sich zwischen 10 °C und 50 °C Messtemperatur beinahe keine Änderung des GP-Wertes und somit der Membranordnung. Dies entsprach eher dem erwarteten Verhalten einer hohen Carotinoidkonzentration (Abb. 47).

Entsprechend der Laurdan Messungen sind in Abbildung 48 die ermittelten TMA-DPH Werte dargestellt, aus denen die direkte Beweglichkeit der Lipide abgeleitet werden kann. Die *M. luteus* Ansätze waren die Einzigen bei denen die Anisotropie bis zu einer Messtemperatur von 60 °C ermittelt werden konnte. Alle Ansätze zeigten niedrige Anisotropie Werte zwischen 0,21 und 0,23 bei einer Messtemperatur von 5 °C auf. Im Vergleich mit den vorherigen Ergebnissen konnte hieraus abgeleitet werden, dass hierbei eine stark fluide Zellmembran vorlag. Beide Stämme zeigten eine geringe Änderung der Anisotropiewerte über den gesamten Messbereich, wobei die Verbreiterung des Phasenüberganges insbesondere bei dem Stamm J3 stark ausgeprägt war. Daraus resultierten minimale Anisotropiewerte von 0,21-0,19 bei 50-60 °C Messtemperatur. Eine Auffälligkeit stellte der ähnliche Kurvenverlauf der jeweiligen Stamm-spezifischen Anisotropiewerte dar. Für den Stamm DSM 20030<sup>T</sup> fiel dabei die Verschiebung um die y-Achse stärker aus als für den Stamm J3 und könnte durch die verschiedenen Fettsäure-Distributionen der beiden Stämme begründet sein (Abschnitt 3.4.2).



**Abbildung 48:** TMA-DPH Anisotropiewerte der *M. luteus* Stämme J3 und DSM 20030<sup>T</sup>. Messbereich von 5 °C bis 60 °C. Der Stamm J3 (10 °C) konnte nur bis 50 °C gemessen werden. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.4.6 Differentielle Transkriptomanalyse zur Kälteanpassung von *M. luteus* J3

Die Genomsequenzen mit einer Mindestgröße von 500 bp wurden für die Assemblierung von *M. luteus* J3 benutzt. Die Gesamtgröße des Genoms war 3.092.389 bp und hatte einen GC-Gehalt von 72,7 %. Das größte Contig war mit 303.178 bp im Vergleich zu den anderen Genomsequenzierungen deutlich kleiner. Im Schnitt waren die Contigs in diesem Fall kleiner, was an der hohen Anzahl an kleineren Contigs sichtbar wurde. Es wurden 236 Contigs zwischen 1-5 kb und 1167 Contigs zwischen 0-1 kb gebildet. 15 Fragmente besaßen eine Mindestgröße von 50 kb. Das assemblierte Genom wurde in dem DNA-Sequenzarchiv GenBank gespeichert (GenBank Accession number VXLG00000000). Der SPAdes Assembler prognostizierte 3142 einzigartige Gene, wobei 2714 Gene ( $\geq 300$  bp), 386 Gene ( $\geq 1500$  bp) und 37 Gene ( $\geq 3000$  bp) eine entsprechende Mindestgröße aufwiesen. Für die Transkriptomanalyse wurde aus der kompletten RNA-Extraktion nur die mRNA verwendet. Die sequenzierten Reads

wurden auf das zuvor erstellte Genom gemappt. Die Annotation erfolgte mit Hilfe der RAST-Server. Die Rohdaten der mRNA Sequenzierungen wurden im NCBI SRA mit der Zugangsnummer PRJNA566075 archiviert.

Die Anzucht bei niedrigen Temperaturen von *M. luteus* J3 äußerte sich in einer *in situ* Reaktion, bei der 248 Gene hochreguliert und 118 Gene herunterreguliert wurden. Bei 1817 Genen erfolgte keine temperaturabhängige Änderung des Expressionsmusters ( $< 2$  fold change). Die für diese Arbeit relevanten Gene und ihre Expressionsänderung wurden in der Tabelle 21 aufgelistet. Das entsprechende Operon *crtEBIE2YgYhX*, bestehend aus den einzelnen Genen der Carotinoidsynthese in *M. luteus* J3, konnte dem Locus mit den Gen-IDs 1813-1820 zugeordnet werden. Die einzelnen Gene erfuhren eine 1,3-2,1-fache Expressionssteigerung. Eine relevante 2,1-fache Expressionssteigerung zeigte nur die C50 Carotinoid Glucosyltransferase (Gen-ID 1820) auf. Direkt an die Carotinoidbiosynthese-Gene anschließend, wurde eine putative Nucleosid-di-Phosphat Epimerase entdeckt mit einer 3,8-fachen Expressionssteigerung bei niedrigen Temperaturen. Möglicherweise könnte es sich hierbei um ein Enzym handeln, das aktivierte Zuckerreste für die Glucosylierung von Carotinoiden isomerisiert (Tab. 21).

Die Menachinonbiosynthese assoziierten *men*-Gene (*menADEFG*) zeigten teils relevante Reduktionen der Expressionsrate (Gen-IDs 356, 359, 375, 1022, 1087). Als Referenzdatensatz für hochregulierte beziehungsweise herunterregulierte Gene bei niedrigen Temperaturen wurden die Gene *cspA* (Gen-ID 1224), kodierend für das Kälteschockprotein A, und einige Hitzeschockproteine kodierende Gene (Gen-IDs 1292, 1293, 1708, 2301, 2302, 2303) ausgewählt. Für keines dieser Gene konnte eine relevante Expressionsänderung festgestellt werden. Als Referenzgene, ohne eine erwartete Veränderung des Expressionsniveaus, wurden zwei *housekeeping*-Gene *gyrB* (Gen-ID 1885) und *secA* (Gen-ID 489) aufgeführt, die keine temperaturabhängige Änderung der Expression zeigten.

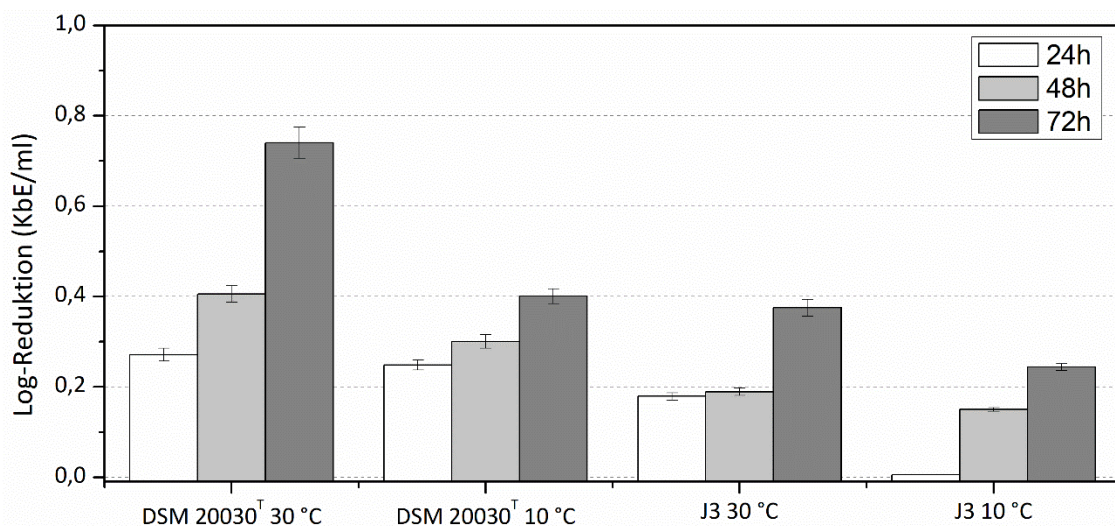


**Tabelle 21: Auswahl an differentiell exprimierten Genen von *M. luteus* J3.** Änderungen der Expressionsrate von Kälte-assoziierten Genen bei der Temperaturabsenkung von 30 °C auf 10 °C. Die Transkriptomanalyse erfolgte im Dreifachansatz.

Gen ID	Gen Name	Gen Beschreibung / Funktion	Fold change
<b>Carotinoïdsynthese</b>			
1813	<i>crtE</i>	Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase	1,4
1814	<i>crtB</i>	Phytoen Synthase	1,7
1815	<i>crtI</i>	Phytoen Dehydrogenase	1,5
1816	<i>crtE2</i>	Lycoplen Elongase	1,4
1817	<i>crtYg</i>	C50 Carotinoid ε-Cyclase_1	1,8
1818	<i>crtYh</i>	Lycoplen ε-Cyclase Isoprenoidtransferase	1,3
1819		Hypothetisches Protein	1,7
1820	<i>crtX</i>	C50 Carotinoid Glucosyltransferase	2,1
1821		Putative Nukleosid-di-Phosphat-Zucker Epimerase	3,8
<b>Kälteschockproteine (Csps)</b>			
1224	<i>cspA</i>	Kälteschockprotein A	1,8
<b>Menachinonsynthese</b>			
356	<i>menD</i>	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carbonsäure-Synthase	-1,1
359	<i>menC</i>	O-Succinylbenzoat Synthase	-1,9
374	<i>menE</i>	2-Succinylbenzoat-CoA-Ligase	1,4
375	<i>menA</i>	1,4-Dihydroxy-2-Naphthoate Polyprenyltransferase	-1,1
1022	<i>menG</i>	2-Heptaprenyl-1,4-Naphthoquinone Methyltransferase	-1,9
1087	<i>menF</i>	Menachinon-spezifische Isochorismate-synthase	1,3
<b>Housekeeping-Gene (Kontrolle)</b>			
1885	<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase Untereinheit B	-1,2
489	<i>secA</i>	Proteinexport Cytoplasmprotein SecA	1,2
<b>Hitzeschockproteine (Hsps)</b>			
1292	<i>groES</i>	Co-Chaperon GroES (Hsp 60 Familie)	-1,0
1293	<i>groEL</i>	Chaperone GroEL_1 (Hsp 60 Familie)	-1,4
2301	<i>dnaJ</i>	Chaperon DnaJ (Hsp40)	1,2
2302	<i>grpE</i>	Hitzeschockprotein GrpE	-1,2
2303	<i>dnaK</i>	Chaperon DnaK	-1,4

### 3.4.7 Bestimmung der Zellfitness bei niedrigen Temperaturen als Maß der Kälteanpassung mittels eines Gefrier-Auftau-Stresstests

Die Reduktion der Lebendzellzahl durch den Gefrier-Auftau-Stresstest wurde als Logarithmische Reduktion der KBE/ml dargestellt (Abb. 49). Beide Stämme zeigten bei beiden Temperaturen nach dem letzten Gefrier-Auftau-Schritt eine geringe Reduktion der Lebendzellzahl ( $< \text{Log } 1$ ). Für den Typstamm fiel die Reduktion im Vergleich zum Stamm J3 insgesamt etwas stärker aus. Weiterhin führte die 30 °C Kultivierung zu einem leicht höheren Zellzahlverlust. Die 10 °C Kulturen zeigten nach dem ersten Schritt eine Reduktion von 0,25 Log-Stufen auf, welche sich im Verlauf nur leicht erhöhte und nach dem letzten Schritt einer Reduktion von 0,4 Log-Stufen entsprach. Im Vergleich dazu startete die 30 °C Kultur mit einer vergleichbaren Reduktion zu Beginn mit 0,27 Log-Stufen, zeigte aber daraufhin eine stärkere Abnahme der Lebendzellzahl mit jedem weiteren Gefrier-Auftauschritt. Zuletzt wurde eine Reduktion von 0,74 Log-Stufen im Vergleich zur Ausgangskeimzahl verzeichnet. Im Stamm J3 zeigte sich ebenfalls ein leicht verbessertes Resistenzverhalten der niedrig temperierten Kulturen im Vergleich zu einer Inkubation bei 30 °C. Dessen Lebendzellzahl zeigte nach dem ersten Schritt beinahe keine Reduktion auf (Log 0,01). Jeder weitere Gefrier-Auftau-Schritt erhöhte leicht die Reduktion auf Log 0,15 nach 48 Stunden und final auf Log 0,24.



**Abbildung 49: Gefrier-Auftau-Stresstest von *M. luteus*.** Die Reduktion der Lebendzellzahl der beiden *M. luteus* Stämme DSM 20300<sup>T</sup> und J3 bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Es wurde je ein Gefrier-Auftau-Schritt alle 24 Stunden durchgeführt. Daten stellen einen Mittelwert dar (n = 3). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.5 ANI Analyse

Aufgrund der teilweise unterschiedlichen Ergebnisse für die jeweiligen Lebensmittelisolate und der entsprechenden Referenzstämme, wurde eine ANI-Analyse (Abschnitt 2.4.5) durchgeführt um die Spezieszugehörigkeit zu verifizieren. Hierfür wurden die Genome, die zuvor für die differentielle Transkriptomanalyse erstellt worden sind (Abschnitt 2.3.4), mit entsprechenden Referenzgenomen verglichen. Diese wurden von dem Nukleotidsequenzarchiv GenBank bezogen.

Das *S. xylosus* J70 Genom wurde mit dem Genom des Typstamms DSM 20266<sup>T</sup> mit der NCBI Reference Sequence NZ\_LT963439.1 (BioProject PRJEB22856) verglichen. Die beiden Genome besaßen eine Größe von 2,8 Mb. Im Durchschnitt betrug die angelagerte Länge 1,9 Mb, womit 68 % des Genoms des Stamms J70 und 69 % von DSM 20266<sup>T</sup> abgedeckt wurde. Der OrthoANIu Wert betrug 98,0%, womit die Spezieszugehörigkeit des Stamms J70 zu *S. xylosus* bestätigt werden konnte.

Für *M. luteus* J3 wurde zur Verifikation das Genom von DSM 20030<sup>T</sup> mit der NCBI Reference Sequence NC\_012803.1 (BioProject PRJNA20655) gewählt. Mit 2,5 Mb war das Genom des Typstamms circa 0,5 Mb kleiner im Vergleich zum Genom des Stamms J3 (Abschnitt 3.4.6). Im Durchschnitt betrug die angelagerte Länge 1,6 Mb, womit 55 % des Genoms des Stamms J3 und 62 % von DSM 20030<sup>T</sup> abgedeckt wurde. Der OrthoANIu Wert betrug 97,3% verifizierte somit die Spezieszugehörigkeit des Stamms J3 zu *M. luteus*.

Das *P. glucanolyticus* J12 Genom wurde mit dem Genom des Typstamms DSM 5162<sup>T</sup> mit der NCBI Reference Sequence NZ\_CP015286.1 (BioProject PRJNA309413) verglichen. Die beiden Genomgrößen betragen 6,5 Mb für Stamm J12 und 5,9 Mb für DSM 5162<sup>T</sup>. Im Durchschnitt betrug die angelagerte Größe 4,3 Mb, womit 66 % des Genoms des Stamms J12 und 73 % von DSM 5162<sup>T</sup> abgedeckt wurde. Der OrthoANIu Wert betrug 99,4% und konnte ebenfalls die Zugehörigkeit des Stamm J12 zur Spezies *P. glucanolyticus* bestätigen.

Für *L. monocytogenes* FFH wurde ebenfalls der Typstamm DSM 20600<sup>T</sup>, mit der NCBI Reference Sequence: NZ\_LT906436.1 (BioProject PRJEB6403), zum Vergleich herangezogen. Für beide Genome, mit der Größe von 2,9 Mb, resultierte die durchschnittliche Anlagerungslänge von 1,5 Mb in einer 63%-igen Genomabdeckung. Der OrthoANIu Wert

betrug 95,0 %, und lag somit genau an der unteren Grenze der Spezieszugehörigkeit. Folglich wurden Genome von weiteren *L. monocytogenes* Stämmen und zweier nahverwandter *Listeria* Spezies verglichen. Die nachfolgenden Genome besaßen ebenfalls eine Größe von 2,9 bis 3,0 Mb. Die durchschnittlichen Anlagerungsgrößen waren mit 1,8 bis 2,0 Mb ebenfalls vergleichbar und resultierten in den entsprechenden prozentualen Abdeckungen. Der nächste Vergleich des Genoms von Stamm FFH erfolgte mit dem unter GenBank angeführten Referenzstamm EDG-e, mit der NCBI Reference Sequence: NC\_003210.1 (BioProject PRJNA276) und resultierte in einem OrthoANIu Wert von 94,9 %. Dies lag ebenfalls knapp an der Speziesgrenze. Die ANI-Analyse mit den zwei nächstverwandten *Listeria*-Spezies *L. innocua*, mit dem Genom des Stamms Clip11262 mit der NCBI Reference Sequence NC\_003212.1 (BioProject PRJNA86), und *L. ivanovii*, mit dem Genom des Stamms NCTC11007 mit der NCBI Reference Sequence: NZ\_LT906466.1 (BioProject PRJEB6403), resultierte in einem OrthoANIu Wert von 88,6 % respektive 82,9 %. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Stamm FFH um eine nahverwandte *Listeria*-Spezies handelt. Gleichzeitig wurde anhand der vorherigen Ergebnisse verdeutlicht, dass Genome der Spezies *L. monocytogenes* eine deutliche Varianz aufweisen, die der ANI-Analyse nach eine differente Spezies implizieren könnte. Zuletzt wurde das Genom von FFH mit weiteren *L. monocytogenes* Stämmen des Serovars 4b aus klinischen Quellen untersucht. Darunter befand sich ebenfalls der in dieser Arbeit untersuchte Stamm ATCC 19115 sowie der Stamm F2365, der bei einem Listerioseausbruch im Jahr 1985 isoliert wurde. Hierbei wurden OrthoANIu Werte von 99,5 % für Stamm ATCC 19115 und 99,6 % für den Stamm F2365 bestimmt.

## 4 Diskussion

Die Kälteanpassung von Bakterien stellt einen wichtigen Anpassungsmechanismus dar, der das Wachstum und Überleben der Mikroorganismen in circa 80 % der Biosphäre ermöglicht (RUSSELL, 1990; RODRIGUES & TIEDJE, 2008; MARGESIN & MITEVA, 2011). Weiterhin ist die Kälteadaptation auch von Bedeutung für die angewandte Biotechnologie, Lebensmittelmikrobiologie und Lebensmittelsicherheit (Abschnitt 1). Im Rahmen der Kälteadaptation nimmt die Anpassung der Zellmembran eine entscheidende Rolle ein, denn sie grenzt zum einen die Zelle von der Umgebung ab und zum anderen sind viele Zellfunktionen mit der Membran assoziiert (Abschnitt 1.2).

Dem aktuellen Stand der Forschung nach wird die Membrananpassung an niedrige Temperaturen von der Änderung der Fettsäurezusammensetzung bewerkstelligt (SINENSKY, 1974; ZHANG & ROCK, 2008). Dieses System wurde bereits mehrere Jahrzehnte lang erforscht und bietet eine etablierte Funktionsbeschreibung der Zellmembranadaptation an sich stetig verändernde Umgebungsfaktoren wie zum Beispiel Druck, pH-Wert und auch Temperatur. Bei niedrigen Temperaturen werden Fettsäuren mit geringeren Schmelztemperaturen in die Membran inkorporiert, um somit die Fluidität (Lipidmobilität) und die verbundenen Membran-abhängigen Prozesse aufrechtzuerhalten (Abschnitt 1.2; RUSSELL, 1984; ZHANG & ROCK, 2008). Abhängig von der Art der jeweiligen Fettsäuremodifikation, verlangt die Anpassung eine Modifikation von bereits vorhandenen Fettsäuren (zum Beispiel Einbringung einer Doppelbindung durch Desaturasen; AGUILAR *et al.*, 1998; WEBER *et al.*, 2001) oder in den meisten Fällen (Änderung der Kettenlänge oder des Verzweigungsgrades) eine *de novo* Synthese der entsprechenden Lipide. Der letztere Punkt stellt jedoch einen energieintensiven Prozess dar (ZHANG & ROCK, 2008). In Anbetracht der geringen Generationszeit von Bakterien während der exponentiellen Wachstumsphasen sollte die stetige Neusynthese der Lipide keinen nennenswerten Nachteil darstellen, da Biomasse fortwährend neu aufgebaut wird.

Einen anderen Weg der Membranadaptation wurde für eukaryotische Zellen beschrieben. In diesem Fall wird der Schmelzpunkt nicht nur durch die Verwendung verschiedener Fettsäuren variiert, sondern der Phasenübergang durch den Einbau von Sterolen wie zum Beispiel Cholesterol oder Ergosterol stark verbreitert (HAZEL, 1995; MOURITSEN & ZUCKERMANN, 2004). Dabei sind diese lipophilen Moleküle allgemein in relativ großen Konzentrationen von 20 bis 40 mol% in eukaryotischen Plasmamembranen enthalten, fehlen aber in bakteriellen

Membranen. Dadurch wird virtuell der Schmelzpunkt verringert, womit eine ausreichende Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen vorliegt und zeitgleich eine mechanische Robustheit der Membran gewährleistet wird (Abb. 2; CROCKETT, 1998; ABE & HIRAKI, 2009; LINGWOOD & SIMONS, 2010). Dieser Phasenzustand wird auch  $L_o$  (*liquid ordered*) genannt, wobei durch die Einlagerung der lipophilen Stoffe die Membranordnung verstärkt wird, aber ungleich des  $S_o$  Zustandes trotzdem die laterale Mobilität der Lipide erhalten bleibt und die Membranfunktionen nicht beeinträchtigt werden (Abschnitt 1.2).

In dieser Dissertation wurde untersucht ob eine analoge Fettsäure-unabhängige Membranmodifikation an niedrige Temperaturen in Bakterien vorliegen könnte. Diese Arbeitshypothese wurde von verschiedenen unabhängigen Beobachtungen unterstützt (Abschnitt 1.3). Abseits der Kälteanpassung konnte bereits gezeigt werden, dass von außen zugeführte lipophile Moleküle in die Zellmembran integriert werden können und so eine Änderung der Membranfluidität bewirken. Dabei reagierten die untersuchten Mikroorganismen mit einer stabilisierenden Fettsäuremodifikation. ULTEE *et al.* (2000) konnten diesen Zusammenhang für Carvacrol, einem Bestandteil von Oregano und Thymian, in *Bacillus cereus* zeigen. Nach HUFFER *et al.* (2011) hat der bekannte fluidisierende Effekt von Alkoholen ebenfalls eine stabilisierende Anpassung der Membran über die Fettsäuremodifikation zur Folge.

### **4.1 Auswirkung und Funktionsweise von isoprenoiden Chinonen als Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran**

Für diese Stoffgruppe standen die beiden Spezies *L. monocytogenes* und *P. glucanolyticus* im Fokus. Das deutlich breitere Temperaturfenster für das Wachstum der Listerien (FARBER & PETERKIN, 1991; KO *et al.*, 1994) ermöglichte eine Untersuchung bei extremeren Temperaturen durchzuführen. Für die Untersuchungen mit *L. monocytogenes* wurden insgesamt 10 verschiedene Stämme verwendet. Bei acht Stämmen handelte es sich um Isolate aus verschiedenen gekühlten Lebensmitteln wie geräucherter Lachs und Hackfleisch (Abschnitt 2.1.1). Zusätzlich wurden die Stämme DSM 20600<sup>T</sup> und ATCC 19115 aus Kultursammlungen als Referenz verwendet. Der Stamm ATCC 19115 zeigte dabei in vorherigen Publikationen eine geringere Ausprägung der Fettsäureadaptation bei niedrigen Temperaturen auf (NEUNLIST *et al.*, 2005). Diese hohe Anzahl an Isolaten erlaubte es eine feinere Abstufung der Fettsäure-

unabhängigen Kälteadaptation innerhalb einer Spezies zu untersuchen. Für *P. glucanolyticus* wurde der Stamm J12 gewählt, bei dem bereits in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe ein erhöhter Menachinongehalt bei niedrigen Temperaturen verzeichnet werden konnte. Weitere Untersuchungen bezüglich der Fettsäure-unabhängigen Adaptation wurden nicht betrachtet (DERICHS, 2015). Der Stamm J12 wurde von der Innenverkleidung eines Kühlschranks isoliert (Abschnitt 2.1.1).

#### 4.1.1 Wachstumsverhalten der untersuchten *L. monocytogenes* und *P. glucanolyticus* Stämme

Die mesophile Inkubationstemperatur für die *Listeria* Stämme betrug 37 °C und wurde für den Kältestress auf 6 °C reduziert. Die Bebrütung erfolgte unter aeroben Bedingungen (Abschnitt 2.1.1). Bei 37 °C zeigten alle Stämme bis auf den Typstamm DSM 20600<sup>T</sup> ein fast identisches Wachstumsverhalten bei der keine Lag-Phase vorlag und die maximale OD<sub>625nm</sub> ~ 3 nach etwas mehr als fünf Stunden erreicht wurde (Abb. 9). Die maximale Wachstumsrate betrug circa 1 h<sup>-1</sup> und entsprach einer Verdopplung alle 42 Minuten (Tab. 6). Damit gleichen diese Wachstumsdaten der Publikation von AUGUSTIN & CARLIER (2000), bei der aus einem Probenumfang von n = 805  $\mu_{opt}$ -Werten der Median von 1,016 h<sup>-1</sup> bestimmt wurde. Entsprechend der Wachstumsmodelle von DUH & SCHAFFNER (1993) sollte bei dieser Temperatur keine Lag-Phase vorhanden sein. Der Typstamm DSM 20600<sup>T</sup> wich von diesen Literaturwerten in mehreren Punkten ab. Zum einen wurde eine halbstündige Lag-Phase detektiert und die maximale Wachstumsrate betrug nur 0,75 h<sup>-1</sup>, was einer Verdopplung alle 54 min entsprach.

Die Reduktion der Temperatur hatte eine deutliche Abnahme der Wachstumsraten zur Folge. In diesem Fall konnte keine signifikante Unterscheidung der Stämme detektiert werden, sodass bei allen Stämmen die maximale Wachstumsrate 0,05 h<sup>-1</sup> betrug und eine Verdopplung im Schnitt alle 14 h auftrat (Tab. 6). Diese circa 20-fache Reduktion der Wachstumsrate bei einer Temperaturreduktion auf 6 °C entspricht ebenfalls den Literaturdaten (AUGUSTIN & CARLIER, 2000). Für die Lebensmittelisolate konnte eine 30-%-ige Steigerung des Zellertrages bei Temperaturreduktion beobachtet werden (Abschnitt 3.1.1). Der spät-exponentielle Erntezeitpunkt wurde zu deutlich unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht. Diese Variation begründete sich in stark variierenden Dauern der Lag-Phasen (Abb. 10). Die Stämme Iso 11/13, FFL 1, FFL 11, 1B und 3B zeigten keine Lag-Phase auf und erreichten die maximale OD<sub>625 nm</sub>

nach ~60 h. Dieses Verhalten entsprach nicht den Literaturwerten von DUH & SCHAFFNER (1993), deren Wachstumsmodell bei dieser Temperatur eine circa 30-stündige Lag-Phase prognostizierte. Die beobachteten Lag-Phasen von 20 h (Stamm ATCC 19115), 30 h (Stämme FF 127 und FF 141) und 40 h (DSM 20600<sup>T</sup>) hingegen waren vergleichbar mit den genannten Wachstumsmodellen. Diese Ergebnisse implizierten eine tendenziell bessere Kälteanpassung der Stämme Iso 11/13, FFL 1, FFL 11, 1B und 3B.

Bei dem zweiten Modellorganismus zeigten beide untersuchten Stämme ein identisches Wachstumsverhalten bei den Wachstumstemperaturen von 30 °C und 10 °C auf (Abb. 24). Die Wachstumsrate von 1,1 h<sup>-1</sup> reduzierte sich um das circa 20-fache auf 0,05 h<sup>-1</sup> bei Temperaturabsenkung. Gleichzeitig konnte aber ein 25 % höherer Zellertrag, basierend auf der OD<sub>625 nm</sub>, gemessen werden. Unabhängig der Temperatur trat keine Lag-Phase auf (Anhang 2). Entgegen der publizierten Minimaltemperatur von *P. glucanolyticus* von 17 °C (ALEXANDER & PRIEST, 1989) konnte in dieser Arbeit ein eindeutiges Wachstum bei 10 °C festgestellt werden. Weitere Literaturdaten für die Einordnung der eigenen *P. glucanolyticus* Daten waren nicht vorhanden.

Beide Spezies zeigten deutlich höhere Wachstumsraten bei mesophiler Wachstumstemperatur auf. Da beide gewählten Inkubationstemperaturen über 20 bis 25 °C lagen, handelt es sich bei diesen Stämmen laut Definition (Abschnitt 1) nicht um strikte psychrotolerante Bakterien. Wie bereits beschrieben (MARGESIN, 2009; SEEL *et al.*, 2016), stimmt die Temperatur bei der die maximale Wachstumsrate und der maximale Zellertrag erreicht werden, nicht überein.

### 4.1.2 Serovar-Bestimmung der *L. monocytogenes* Stämme

Die Serovarbestimmung ermöglichte eine weitere Unterteilung der 10 untersuchten *L. monocytogenes* Stämme vorzunehmen. Anhand dessen sollte eine mögliche Serovar-spezifische Differenzierung der Kälteadaptation der Membran untersucht werden, woraus eine mögliche Korrelation von verschiedenen Kälteadaptationsmechanismen mit der Pathogenität bestimmter Serovaren abgeleitet werden könnte. *L. monocytogenes* besitzt verschiedene Zelloberflächen-Antigene, anhand derer eine Subdifferenzierung der Spezies in 13 Serovare beziehungsweise Serotypen erfolgt. Die somatischen (O-Faktor) Antigene leiten sich zum Teil von verschiedenen Teichonsäuren der Mureinschicht ab, wohingegen Flagellenproteine (H-



Faktor) die zweite zu differenzierende Oberflächenstruktur darstellen (MCLAUCHLIN & REES, 2009). Die 13 Serovare werden in mindestens drei evolutionäre Linien (englisch *evolutionary lineages*) zusammengefasst, wobei die Reihenfolge der evolutionären Linien je nach Publikation variieren kann. Nach ORSI *et al.* (2011) weisen dabei Erreger der Linie I die höchste Pathogenität auf und sind somit für 98 % der epidemischen Infektionen verantwortlich. Dazu gehören die Serovare 1/2b, 3b, 3c und 4b, wobei der Serotyp 4b die stärkste Virulenz aufzeigt und für die meisten invasiven Formen der Listeriose verantwortlich ist (FARBER & PETERKIN, 1991; BUCHRIESER *et al.*, 1993; EVANS *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2004). Mit abnehmendem pathogenem Potenzial werden die Serotypen 1/2a, 1/2c, und 3a in Linie II und Serotypen 4a, 4b und 4c in Linie III eingruppiert. Die häufigste Prävalenz im Lebensmittel zeigt die Linie II, dabei insbesondere der Serotyp 1/2a, wohingegen die pathogenste Varianz 4b deutlich seltener detektiert wird (DOUMITH *et al.*, 2004a; ORSI *et al.*, 2011). Fasst man *L. monocytogenes* Isolate aus Lebensmitteln und Patienten zusammen, so wurden zu 95 % die Serovare 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b identifiziert (TAPPERO *et al.*, 1995; GRAVES *et al.*, 1999). Für die Serovarbestimmung mittels PCR wurden die drei Serolinien, basierend auf dem variablen Gengehalt, in fünf phylogenetische Gruppen unterteilt (DOUMITH *et al.*, 2004a, b).

Von den 10 untersuchten Stämmen konnten vier Stämme, FF 127, FF 141, ATCC 19115 und FFH der Gruppe II.1 (4b, 4d und 4e) zugeteilt werden. Die restlichen Stämme DSM 20600<sup>T</sup>, FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13 zeigten eine Genkombination spezifisch für Gruppe I.1 (1/2a, 3a) auf (Abschnitt 3.1.2). Aufgrund der zuvor genannten Prävalenz bestimmter Serovare in Lebensmitteln und Patienten, handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die beiden Serovare 4b und 1/2a. Dies konnte zumindest für die hinterlegten Stämme ATCC 19115 und DSM 20600<sup>T</sup> in den entsprechenden Stammsammlungen bestätigt werden. Dabei zeigte sich eine tendenzielle Korrelation zwischen der Ausprägung der Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation mittels Menachinonen und der zugehörigen Serotypen. Mit Ausnahme des Typstamms DSM 20600<sup>T</sup> zeigten alle vermeintlichen 4b Stämme (FFH, ATCC 19115, FF 127 und FF 141) die höchsten, beziehungsweise höhere Menachinonkonzentrationen, als die restlichen Stämme der vermeintlichen Serogruppe 1/2a (Abschnitt 3.1.4). Da der Serotyp 4b hauptsächlich in Ausbrüchen der invasiven Listeriose detektiert wird (FARBER & PETERKIN, 1991; BUCHRIESER *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 2004), stellt sich die Frage inwieweit der Mechanismus der stärkeren Menachinoninkorporation als Kälteanpassung die intrazelluläre Infektion begünstigen könnte. Eine naheliegende Annahme wäre, dass aufgrund des verbreiterten Phasenüberganges und der höheren Membranrigidität (vergleiche Abschnitt 3.1.5)

die Funktionalität der Membran-assoziierten Prozesse und die Integrität der Zelle über einen großen Temperaturbereich verbessert wird. Somit könnten die Zellen den Temperaturunterschied zwischen gekühlten Lebensmitteln und dem Wirtskörper besser bewältigen. Zudem schützt eine stark geordnete und kondensierte Membran vor der Immunabwehr, wie bereits für Carotinoide in *Staphylococcus aureus* gezeigt (MISHRA *et al.*, 2011; KOSSAKOWSKA-ZWIERUCHO *et al.*, 2016).

### 4.1.3 Stressresistenz gegenüber multiplen Gefrier-Auftau-Schritten

Wie einleitend beschrieben, stellen niedrige Temperaturen eine Herausforderung für die meisten Zellbestandteile und -prozesse dar. Mit dem Ergebnis, dass auf vielen Ebenen eine Kälteadaptation erfolgt. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Anpassung der Membran, dementsprechend konnten nicht alle möglichen Anpassungsmechanismen an die Kälte beurteilt werden. Da die Wachstumsrate und der Zellertrag eine Gesamtheit der Zellprozesse beschreiben, ist dabei nicht gewährleistet, dass die Qualität der Membranadaptation hierdurch unbedingt abgeleitet werden könnte. So könnten zum Beispiel bestimmte Enzymkinetiken den limitierenden Faktor für die maximale Wachstumsrate darstellen. Folglich wurde zusätzlich ein Kältestresstest durchgeführt, der einen weiteren Beurteilungsparameter erlauben sollte. So konnte WOUTERS *et al.* (1999) mit Hilfe eines mehr-zykligen Gefrier-Auftau-Stresstestes Unterschiede in der Kälteadaptation von *Streptococcus thermophilus* feststellen.

Die Ergebnisse für die 10 untersuchten *L. monocytogenes* Stämme des Gefrier-Auftau-Stresstests sind in der Abbildung 21 zusammengefasst dargestellt. Das unterschiedliche Ausmaß der Fettsäureprofilanpassung der verschiedenen Isolate war nicht mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Stressfaktoren der Gefrier-Auftau-Zyklen korreliert. Es zeigte sich, dass alle Lebensmittelisolate eine vergleichbar hohe Resistenz, unabhängig von ihrer Adaptationsfähigkeit über die Fettsäureverschiebung oder der Menachinonkonzentration, gegenüber Gefrier-Auftau-Zyklen besaßen. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Stämme aus Kultursammlungen DSM 20600<sup>T</sup> und ATCC 19115 eine deutlich höhere logarithmische Reduktion der Lebendzellzahl. Beide Stämme erreichten nach drei Zyklen eine Reduktion von etwa 3 Log-Stufen (Abb. 21). Beide Referenzstämme wurden vor Jahrzehnten aus Säugetieren isoliert (MURRAY *et al.*, 1926; SEELIGER, 1961). Die unterschiedlichen Isolationsquellen sowie eine lange Depositionszeit in Kultursammlungen können diese erhöhte Anfälligkeit

verursachen. Weiterhin konnte mit Hilfe der ANI-Analyse des Isolat-Stamms FFH eine Zugehörigkeit zur Spezies *L. monocytogenes* bestätigt werden, sodass der gezeigte abweichende Phänotyp nicht durch unterschiedliche Spezies bedingt wurde.

Genauso wie für die *Listeria* Isolate konnte auch für beide *P. glucanolyticus* Stämme keine Korrelation zwischen der Ausprägung der Kälteadaptation der Membran und der Resistenz gegenüber Gefrier-Auftau-Zyklen beobachtet werden (Abb. 30). In diesem Fall wurde der Stresstest mit Kulturen bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur durchgeführt. Wie bei WOUTERS *et al.* (1999) konnte man erkennen, dass die Anzucht bei niedrigen Temperaturen das Überleben der Zellen nach den mehrfachen Gefrier-Auftau-Schritten verbessert. Am deutlichsten zeigte sich das anhand des Typstammes DSM 5162<sup>T</sup>, dessen logarithmische Reduktion nach drei Zyklen von 7 Log-Stufen nach der Inkubation bei 30 °C auf 4 Log-Stufen nach der Inkubation bei 10 °C reduzierte. Damit lag die Verbesserung der Überlebensrate in derselben Größenordnung wie sie von WOUTERS *et al.* (1999) für *Streptococcus thermophilus*, ebenfalls mit einer Differenz von drei Zehnerpotenzen, beschrieben wurde. Der Unterschied der Inkubationstemperatur zeigte sich in dem Lebensmittel-assoziierten Isolat J12 deutlich geringer. In diesem Fall betrug der Unterschied zwischen den Temperaturen nur eine Zehnerpotenz, sodass sich die Reduktionsraten von circa 5 Log-Stufen nach einer Inkubation bei 30 °C auf 4 Log-Stufen nach der Inkubation bei 10 °C reduzierten. Die stationären 10 °C Ansätze des Stammes J12, die sich durch eine Verdopplung des Menachinongehaltes auszeichneten, zeigten keine Verbesserung der Überlebensfähigkeit gegenüber dem Gefrier-Auftau-Stress im Vergleich zu den exponentiell-geernteten Zellen (Abschnitt 3.2.3; Abschnitt 3.2.6).

Mit den Daten der beiden Modellorganismen, hinsichtlich der Stressresistenz bei Gefrier-Auftau-Zyklen, konnten wiederum zwei übereinstimmende Erkenntnisse gezogen werden. Zum einen scheint die Verbesserung der Membraneigenschaften, die durch den erhöhten Menachinongehalt bei niedrigen Temperaturen auftritt (Abschnitt 3.1.4, 3.2.4), nicht mit dem Gefrier-Auftau-Stresstest zu korrelieren. Das könnte darin begründet sein, dass andere Gefrierschäden, abseits der Schädigung der Membran als Permeabilitätsbarriere, in diesem Zusammenhang eine größere Auswirkung auf die Überlebensrate haben (RAY & SPECK, 1973; JAY *et al.*, 2005). Zum anderen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine lange Aufbewahrung in Stammsammlungen zum Verlust bestimmter Mechanismen führt, die in einer schlechteren Anpassung an spezifische Umweltfaktoren resultiert. In beiden Fällen zeigten die Stämme aus

Kultursammlungen deutliche Nachteile gegenüber den jüngeren Lebensmittel-assoziierten Isolaten.

### 4.1.4 Unterschiede in der Anpassung der Fettsäureprofile an niedrige Temperaturen

Der erste Schritt zu der Beurteilung einer potentiellen Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation bestand darin die etablierte Adaptation der Zellmembran mittels Fettsäuremodifikation zu detektieren und möglichst objektiv zu quantifizieren. Die Zusammensetzung der verschiedenen Fettsäuren prägen die biophysikalischen Parameter der Membran und ihre Änderung an verschiedene Umweltbedingungen wird als homeoviskose Adaptation zusammengefasst (SINENSKY, 1974; ZHANG & ROCK, 2008). Wie einleitend beschrieben, kann die Inkorporation von kürzeren, verzweigten und ungesättigten Fettsäuren die Schmelztemperatur der Membran verringern und somit die Fluidität und Funktionalität gewährleisten (Abschnitt 1.2). Die Bestimmung der Fettsäure-getriebenen Modifikation stellte die Grundlage für die Bewertung weiterer potentieller Fettsäure-unabhängiger Mechanismen dar.

Die Fettsäure vermittelte Kälteanpassung in *L. monocytogenes* ist ein gut untersuchter Mechanismus und wurde bereits in mehreren Publikationen umfassend beschrieben (ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998; TATITURI *et al.*, 2015). Dabei wurde das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation als Ratio der beiden Hauptfettsäuren Fettsäuren 15:0 anteiso zu 17:0 anteiso ausgedrückt (MASTRONICOLIS *et al.*, 1998). Erste Auswertungen zeigten, dass diese Art zur Bestimmung des Ausmaßes der Fettsäureanpassung unzureichend war. Zum einen wurden nicht alle detektierten Fettsäuren in Betracht gezogen und somit circa 20 % der Fettsäuren ausgegrenzt. Zum anderen ergaben insbesondere die Quotienten-Werte der einzelnen Stämme bei 6 °C extrem hohe und stark gespreizte Werte, anhand derer das Ausmaß der Adaptation nur schwer zu vergleichen war.

Innerhalb der analysierten Stämme konnten signifikante Unterschiede in der Anpassung der Fettsäureprofile an die niedrige Wachstumstemperatur festgestellt werden. Das Ausmaß der Fettsäureadaptation ( $\Delta$ WAMT-Werte) korrelierte mit den gemessenen Menachinongehältern und den Parametern der Membranordnung und -fluidität (Abb. 17 und 20). Die analysierten *L. monocytogenes* Stämme zeigten eine temperaturabhängige Reaktion ihrer Fettsäureprofile (Abschnitt 3.1.3), die mit Angaben früherer Publikationen übereinstimmen (ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998; MASTRONICOLIS *et al.*, 2006). Bemerkenswerterweise

konnte bereits bei der 37 °C Inkubation eine Varianz der Fettsäureverteilung unter den 10 untersuchten Stämmen festgestellt werden (Abb. 13). Bei allen Stämmen konnten die beiden verzweigten Fettsäuren 15:0 anteiso und 17:0 anteiso als Hauptfettsäuren identifiziert werden. Deren Verhältnis betrug bei den Gruppe A Stämmen (Abb. 13, grau dargestellt) ungefähr 1:1, wohingegen drei Gruppe B Stämme (Abb. 13, orange dargestellt) tendenziell das Verhältnis zu der Fettsäure 15:0 anteiso verlagerten, sodass annähernd ein Verhältnis von 2:1 vorlag. Das entspricht in einem geringeren Ausmaß der bekannten Fettsäureverschiebung in *L. monocytogenes* zur Kompensation von niedrigen Temperaturen, wobei hauptsächlich die Fettsäure 15:0 anteiso synthetisiert wird (ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998). Diese besitzt die niedrigste Schmelztemperatur der detektierten Fettsäuren (Tab. 2). Bei der Annahme, dass alle untersuchten *Listeria* Stämme die Membranfluidität auf ein vergleichbares Niveau regulieren und dieselben polaren Kopfgruppen vorliegen (VERHEUL *et al.*, 1997), müssen sich andere Membranfaktoren unterscheiden, sodass diese von den unterschiedlichen Fettsäuremustern kompensiert werden können. Folglich geben allein die gewonnenen Fettsäuredaten der 37 °C inkubierten Kulturen einen kleinen Hinweis auf potentielle weitere Membranmodifikatoren abseits der Fettsäuren.

Die Reduktion der Wachstumstemperatur auf 6 °C äußerte sich in zwei Merkmalen der Fettsäureadaptation an niedrige Temperaturen. Die schwächere Anpassung zeigte sich in der Reduktion der Kettenlänge der geringen Fettsäuren, wobei die Fettsäuren 16:0 iso, 16:0 und 17:0 iso von 14:0 iso und 14:0 Fettsäuren ersetzt worden sind (Abb. 13 und 14). Aber aufgrund der geringen prozentualen Anteile haben diese Änderungen kaum eine Auswirkung auf die Schmelztemperatur der Membran. Die grundlegende Anpassung konnte anhand der beiden Hauptfettsäuren beobachtet werden. Hierbei zeigten alle Stämme eine charakteristische Verkürzung der Fettsäure 17:0 anteiso zu 15:0 anteiso, deren Anteil je nach Stamm nun 80 bis 95 % betrug (Abb. 14; ANNOUS *et al.*, 1997; MASTRONICOLIS *et al.*, 1998). Auch in diesem Fall waren Stamm-spezifische Unterschiede bei den Fettsäureprofilen zu beobachten, wobei dieselben Stämme wie bei 37 °C zusammengruppiert werden konnten. Bei niedrigen sowie mesophilen Temperaturen zeigten die Gruppe A Stämme (Abb. 14, grau dargestellt) die stärkste und die Stämme der Gruppe B (Abb. 14, orange dargestellt) die niedrigste Ausprägung der Fettsäuremodifikation innerhalb der entsprechenden Wachstumstemperatur.

In vorherigen Publikationen wurde die Stärke der Kälteanpassung mittels der Fettsäuremodifikation anhand des Verhältnisses zwischen den beiden Hauptfettsäuren

abgeleitet (MASTRONICOLIS *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich jedoch die limitierende Anwendungsmöglichkeit dieser Methodik, da der Quotient zum einen die weiteren Fettsäuren außer Acht lässt und zum anderen die Schmelztemperaturen der einzelnen Fettsäuren nicht berücksichtigt. Darin begründet wurde die Quantifizierung der adaptiven Fettsäureantwort anhand einer virtuellen Schmelztemperatur des Fettsäureprofils unter Berücksichtigung der jeweiligen Schmelztemperaturen und dem Anteil aller detektierten Fettsäuren berechnet (WAMT-Wert; Formel 3). Mit Hilfe dieses Indikators können die zuvor genannten Anpassungsmechanismen der Listerien, Verhältnis von Iso/Anteiso-Verbindungen und Reduktion der Kettenlänge in die Bewertung aufgenommen werden (NEUNLIST *et al.*, 2005; MASTRONICOLIS *et al.*, 2006; MILADI & BAKHROUF, 2013). Anhand der WAMT-Werte für beide Wachstumstemperaturen konnte der jeweilige  $\Delta$ WAMT-Wert einen objektiveren Maßstab für das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation liefern (Tab. 7). Hierdurch verdeutlichte sich der bereits vermutete Unterschied in der Stamm-spezifischen Ausprägung der Fettsäuremodifikation. Anhand der  $\Delta$ WAMT-Werte konnten zwei distinkte Gruppen gebildet werden. Vor allem die drei Stämme DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH (Gruppe B; rot markiert) zeigten bei niedrigen Temperaturen eine deutlich weniger stark ausgeprägte Fettsäureadaptation als die Stämme FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13 (Gruppe A; schwarz markiert). Die Stämme FF 127 und FF 141 (grün markiert) zeigten eine intermediäre Anpassung auf. Hiermit zeigte sich ein weiterer Punkt, der auf zusätzliche Mechanismen zur Regulation der Membranfluidität abseits der Fettsäuremodifikation hindeutet.

Für die Analyse der Fettsäureadaptation wurden die polaren Kopfgruppen der Membranlipide nicht untersucht, da ihr Einfluss auf die thermischen Membraneigenschaften als gering betrachtet wird (RUSSELL, 1989; ZHANG & ROCK, 2008). Weiterhin zeigten frühere Publikationen, dass sich die Lipidzusammensetzung in *L. monocytogenes* bei Reduktion der Wachstumstemperatur nicht verändert (VERHEUL *et al.*, 1997). Die primäre Funktion der polaren Kopfgruppen liegt in der Stabilisation von Membran-assoziierten Proteinen (TSATSKIS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2006). Folglich wurde bei den weiteren Modellorganismen auf die Untersuchung der polaren Kopfgruppen zur Bewertung der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung ebenfalls verzichtet.

Bei der zweiten Spezies *P. glucanolyticus* waren keine publizierten Daten für die Fettsäureverschiebung bei niedrigen Temperaturen vorhanden. Die Hauptfettsäure für die Gattung *Paenibacillus* ist 15:0 anteiso und besitzt je nach Spezies einen Anteil von 34 bis 80 %

und resultiert in einem durchschnittlichen Anteil von 55 %. Weitere nennenswerte Fettsäurefraktionen enthalten 15:0 iso, 16:0, 17:0 anteiso (PRIEST, 2009). Die bestmögliche Referenz für die Fettsäureverteilung in *P. glucanolyticus* liefert die Veröffentlichung von SHIDA *et al.* (1997), wobei im Gegensatz zu dieser Arbeit die Inkubation einzig bei 37 °C erfolgte. Auch in diesem Fall wurde als Hauptfettsäure 15:0 anteiso identifiziert. Im nahverwandten Bakterium *Bacillus subtilis* wurde unter aeroben Bedingungen eine Fettsäure-Desaturase identifiziert, die bei einer Temperaturabsenkung durch die Bildung von ungesättigten Fettsäuren die Membran zu refluidisieren vermochte (WEBER *et al.*, 2001; BERANOVÁ *et al.*, 2010).

Die detektierten Fettsäureprofile für die beiden verwendeten Stämme DSM 5162<sup>T</sup> und J12 zeigten eine nahezu identische Fettsäure-Distribution bei beiden Wachstumstemperaturen (Abb. 25). Entsprechend der Literaturangaben handelte es sich bei den 30 °C inkubierten Kulturen bei der Hauptfettsäure um 15:0 anteiso, welche unabhängig von der Temperatur zu circa 60 % vertreten war. Die weiteren Minorkomponenten waren die Fettsäuren 16:0 (20 %) und 16:0 iso (5 %). In Spuren (circa 1 bis 2 %) waren die Fettsäuren 15:0 iso, 16:1 *cis* 5 und 17:0 anteiso vorhanden (PRIEST, 2009; SHIDA *et al.*, 1997). Ähnlich zu der beschriebenen Kälteadaptation in *B. subtilis* zeigte sich die ausgeprägteste Kälteanpassung der Membran in der Zunahme der ungesättigten Fettsäure 16:1 *cis* 5 auf 20 %, wobei sich die gradkettige Fettsäure 16:0 um einen ähnlichen Betrag reduzierte. Interessanterweise änderte sich der Gehalt der Hauptfettsäure nicht signifikant bei der Temperaturreduktion. Die Verlagerung der Minorkomponenten zu kürzeren Fettsäuren 14:0 iso und 14:0 komplettierte die Kälteadaptation (Abb. 25). Diese Temperatur-bedingte Anpassung resultierte in einem  $\Delta$ WAMT-Wert von 11 °C für Stamm DSM 5162<sup>T</sup> und 10 °C für Stamm J12 (Tab. 10). Damit lag bei den beiden *Paenibacillus* Stämmen, verglichen mit den *Listeria*-WAMT-Werten, eine starke Ausprägung der Fettsäureadaptation vor (Tab. 7). Aufgrund fehlender Literaturwerte für die Schmelztemperatur der detektierten Fettsäure 16:1 *cis* 5 wurde die Schmelztemperatur von 16:1 *cis* 9 als Näherungswert verwendet. Analog zu den gezeigten Schmelzpunkten der einfach ungesättigten C18-Fettsäuren in der Publikation von KNOTHE & DUNN (2009), dürfte sich die tatsächliche Schmelztemperatur von 16:1 *cis* 5 zwischen den Schmelzpunkten für 16:1 *cis* 9 und 16:1 *trans* 9 befinden (Tab. 2). Folglich sind in diesem Fall die  $\Delta$ WAMT-Werte als Richtwerte zu verstehen. Wie sich im späteren Verlauf der Untersuchungen zeigte, konnte unter den gewählten Parametern, bei denen die Zellernte und alle nachfolgenden Versuche im spät-exponentiellen Wachstumsbereich erfolgten, keine Erhöhung des isoprenoiden Chinongehaltes bei niedrigen Temperaturen gezeigt werden (Abschnitt 3.2.3). Nach den Ergebnissen von

DERICHS (2015) wurde eine deutliche Steigerung der Menachinonkonzentration erwartet. Die Reproduktion der erwarteten Menachinonsteigerung wurde für den Stamm J12 bei einer zusätzlichen Versuchsreihe, bei der die Zellernte in der stationären Phase erfolgte, erreicht. Hierbei zeigte sich eine interessante Änderung der Fettsäurezusammensetzung (Abb. 25, Tab. 10). Im Vergleich zu den Proben der exponentiellen Phase zeigten sich die größten Differenzen bei der verzweigten Hauptfettsäure 15:0 anteiso und den Minor Komponenten 14:0, 16:0 sowie 16:1 *cis* 5, welche sich in einer geringen Reduktion des WAMT-Wertes für die 30 °C inkubierten Kulturen und einem starken WAMT-Anstieg für die 10 °C inkubierten Ansätze äußerten. Insgesamt resultierte dies in einem sehr geringen  $\Delta$ WAMT-Wert von 1 °C und deutete, im Vergleich zu den Ansätzen der exponentiellen Wachstumsphase, auf eine deutlich geringere Ausprägung der Fettsäureadaptation hin.

### **4.1.5 Anpassung des Menachinongehaltes und der -zusammensetzung bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu mesophilen Bedingungen**

Bei den Modellorganismen *L. monocytogenes* und *P. glucanolyticus* standen die isoprenoiden Chinone im Fokus eine Fettsäure-unabhängige Kälteanpassung der Zellmembran zu ermöglichen (Abschnitt 1.3.1). In dieser Hinsicht gibt es keine publizierten Arbeiten, die isoprenoide Chinone in der Funktion der Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation vermuten oder untersuchen. Wie einleitend beschrieben, besteht die Funktion von isoprenoiden Chinonen in Bakterien im Elektronentransport innerhalb der Atmungskette. Sie fungieren dort als Reduktionsäquivalent (NOWICKA & KRUK, 2010; Abschnitt 1.3.1). Im Allgemeinen übertragen isoprenoide Chinone Elektronen von den Komplexen I und II der Atmungskette auf ein Cytochrom über den Atmungskomplex III. Bereits im Jahr 1970 stellten HAMMOND & WHITE zwei Punkte fest, die sie zu der Annahme brachten, dass die untersuchten Menachinone, neben dem Elektronentransport, noch weitere Funktionen in der Zellmembran wahrnehmen könnten. Es wurde deutlich mehr Menachinon, im Vergleich zum korrespondierendem Cytochrom, gemessen. Für den untersuchten *Staphylococcus aureus* zeigten sie ein 50:1 Verhältnis von Menachinon zu Cytochrom und ein 15:1 Verhältnis für *Haemophilus parainfluenzae*. Zum anderen wurde eine hohe Konzentration an Menachinon auch bei anaerobem Wachstum detektiert, wobei keine funktionalen Cytochrome gebildet wurden (HAMMOND & WHITE, 1970). Neben den qualitativen Chinonanalysen sollte die Identifikation der detektierten Chinone Hinweise zur Beurteilung geben. Anzeichen für einen Zusammenhang zwischen der



Kälteadaptation und isoprenoiden Chinonen wurden in der Dissertation von DERICHS (2015) gefunden. In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Bakterien aus gekühlten Lebensmitteln isoliert, wobei einige Stämme einen Anstieg des Chinongehaltes bei niedrigen Temperaturen, bei gleichzeitiger geringer Änderung des Fettsäureprofils, zeigten. Hierbei wurde ebenfalls eine mögliche Verknüpfung mit der Kälteadaptation impliziert.

Für alle *Listeria* Stämme wurde die qualitative sowie quantitative Analyse der vorhandenen Menachinone bei 37 °C und 6 °C Wachstumstemperatur durchgeführt (Abschnitt 3.1.4). Bei diesen Temperaturen wurde als einziges Menachinon MK-7 detektiert (Abb. 15, Abschnitt 3.1.4). Das stimmt mit dem beschriebenen Hauptchinon für *L. monocytogenes* überein, wobei in diesem Fall die beschriebenen Minorkomponenten MK-6 und MK-5 nicht detektiert wurden (COLLINS *et al.*, 1979), möglicherweise durch die Verwendung geringer Zellmassen begründet. Im Verlauf der Arbeit wurde die qualitative Analyse der isoprenoiden Chinone an mehreren Stufen der Extraktion und Aufreinigung optimiert. Hierzu zählte auch die Verwendung einer maximalen Extraktionsmasse von 100 mg, wobei in der Regel Massen um 50 mg verwendet wurden. Höhere Zellaßgewichte resultierten in unvollständigen Extraktionen, sodass die quantitativen Untersuchungen sehr starken Varianzen unterlagen. Es war dadurch nicht auszuschließen, dass weitere gering vorhandene Komponenten somit unterhalb des Detektionslimits lagen.

In Übereinstimmung zur Eingruppierung der *Listeria* Stämme in Gruppe A und B, anhand der Ausprägung ihrer Fettsäureadaptation als Antwort auf die Kälte, konnten die Stämme bezüglich des Chinongehaltes in dieselben Gruppen differenziert werden (Abb. 16). Die Isolat-Stämme FFL 1, FFL 11, 1B, 3B und Iso 11/13 zeigten die niedrigsten Menachinon-Konzentrationen bei beiden Wachstumstemperaturen. Die drei Stämme DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH zeigten einen zwei bis dreifachen Anstieg des Menachinongehaltes bei 6 °C im Vergleich zum Wachstum bei 37 °C. Dies war insofern bemerkenswert, da aufgrund der stark reduzierten Wachstumsraten, die im Vergleich zu 37 °C eine Reduktion von 85 % aufwiesen (Tab. 6), eine Abnahme des MK-Gehaltes erwartet wurde. Die geringe Wachstumsrate geht mit einer geringeren Stoffwechselrate und somit einer geringeren Atmungsrate einher (HAMMOND & WHITE, 1970). Folglich sollte eine Abnahme der beteiligten Moleküle an ein angepasstes Niveau zu erwarten sein, sodass die energieintensive Synthese überschüssiger Verbindungen erspart bleibt. Die entgegengesetzte Reaktion dieser drei Stämme deutete auf eine weitere Funktion des Menachinons, abgesehen von der Funktion als Elektronenüberträger, hin, bei der

diese möglicherweise eine weitere Form der Membranfluiditäts-Adaptation darstellt. Hierzu würde auch die Feststellung passen, dass der Menachinonpool für den Elektronentransport im Übermaß vorhanden ist (HAMMOND & WHITE, 1970). Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass Stämme mit erhöhtem Menachinongehalt bei 6 °C auch eine reduzierte Fettsäureverschiebung aufzeigten und umgekehrt. Dies wird bei der Verwendung der theoretischen Schmelztemperaturen der verschiedenen Fettsäurezusammensetzungen besonders deutlich (WAMT; Tab. 7).

In den Stämmen DSM 20600<sup>T</sup>, ATCC 19115 und FFH betrug die Differenz zwischen den beiden Wachstumstemperaturen 2 bis 3 °C und resultierte in einer Fettsäureanpassung, deren Ausprägung nur 30 bis 50 % der anderen Stämme entsprach. Dieser Zusammenhang konnte durch eine Korrelationsanalyse bestätigt werden. Wurde die Menachinonkonzentration bei 6 °C gegen das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation in Form von  $\Delta$ WAMT aufgetragen, wurde eine hochsignifikante negative Korrelation festgestellt (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass die Membranfluidität durch höhere Menachinonkonzentrationen abgesenkt werden kann, sodass die geringere Anpassung über die Fettsäureadaptation kompensiert werden kann.

Der hier gezeigte Zusammenhang der Kälte-abhängigen Steigerung der Menachinonkonzentration als Teil der Kälteadaptation in *L. monocytogenes* kann durch weitere Publikationen bestärkt werden. MASTRONICOLIS *et al.* (1998) zeigten, dass Kälte-geschockte stationäre *L. monocytogenes* Kulturen in den ersten drei Tagen keine Fettsäureanpassung zeigten. Hingegen erhöhten diese Kulturen ihren Anteil an neutralen Lipiden um etwa 30 %. Isoprenoide Chinone sind Teil der neutralen Lipidfraktion, die von MASTRONICOLIS *et al.* (1998) jedoch nicht näher charakterisiert wurde. Diese Fettsäure-unabhängige adaptive Reaktion kann einen Wachstumsvorteil in nährstoffarmen Umgebungen darstellen. Die Synthese von Lipiden ist energieintensiv, insbesondere die Synthese der Acylketten (ZHANG & ROCK, 2008). Bei *L. monocytogenes* erfolgt die Fettsäureprofiländerung nur durch eine *de novo*-Synthese der verzweigten Fettsäuren und nicht durch Modifikation der vorhandenen Lipide (ANNOUS *et al.*, 1997).

Für *P. glucanolyticus* erfolgte die Chinonanalyse bei 30 °C und 10 °C Wachstumstemperatur. Ähnlich zu den Listeria-Stämmen konnte, unabhängig von der Wachstumstemperatur, bei beiden Stämmen nur ein Peak detektiert werden. Anhand der Absorptionsspektren und der relativen Retentionszeit wurde der Peak als MK-7 identifiziert (Abb. 26A, Abschnitt 3.2.3). In der Literatur wurde MK-7 ebenfalls als Hauptchinon beschrieben (SHIDA *et al.*, 1997; PRIEST,

2009). Wie bei den vorherigen Messparametern zeigten die Ergebnisse der Menachinonanalyse fast identische Werte für das Isolat und den Typstamm. Die niedrigen Temperaturen resultierten in einer 30-%-igen Reduktion des MK-Gehaltes (Abb. 26B). Verglichen mit der zuvor gezeigten  $\Delta$ WAMT-MK-Korrelation bei den *Listeria*-Stämmen war dieses Verhalten zu erwarten. Der berechnete  $\Delta$ WAMT-Wert von 11 °C (Stamm DSM 5162<sup>T</sup>) und 10 °C (Stamm J12) deutete sogar auf eine leicht stärkere Fettsäure-vermittelte Kälteadaptation, als bei den entsprechenden *L. monocytogenes* Gruppe A Stämmen, hin. Dies könnte damit begründet werden, dass die Fettsäure-abhängige Anpassung in dieser Ausprägung ausreichend ist und nicht durch eine erhöhte Menachinonkonzentration ausgeglichen werden muss. Allerdings wurde eine deutliche Zunahme des MK-Levels bei niedrigen Temperaturen nach DERICHS (2015) erwartet. Um die Reproduktion der Menachinonerhöhung zu erreichen, wurden verschiedene Wachstumsparameter verifiziert. Nachdem der Erntezeitpunkt in die stationäre Phase verlagert wurde, konnte bei niedrigen Temperaturen ein Anstieg des MK-Gehaltes reproduziert werden (Abb. 26B). Die Verdopplung der Menachinonkonzentration resultierte in 240 nmol/gZellnaßgewicht, einem Wert vergleichbar mit den Gruppe B *Listeria*-Stämmen, die sich durch hohe Menachinongehälter und geringere Fettsäureadaptation auszeichnen haben (Abb. 17). Dieser Zusammenhang, der niedrigen  $\Delta$ WAMT-Werte und der Zunahme des MK-Gehaltes bei kalten Bedingungen, stellte sich auch bei Stamm J12 ein. Denn für die Zellen des stationären Wachstumsbereichs änderte sich die Fettsäure-Distribution (Abschnitt 3.2.2), die in einem deutlich geringeren  $\Delta$ WAMT-Wert von 1,3 °C resultierte (Tab. 10).

Somit konnte für beide Modellorganismen gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Menachinongehaltes bei niedrigen Temperaturen in der Tat auftritt und somit eine Grundvoraussetzung für eine Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation gegeben war. Die Korrelation zwischen dem  $\Delta$ WAMT-Wert und der MK-Konzentration konnte unabhängig der Spezies bei mehreren Stämmen gezeigt werden und bestärkt die aufgestellte Hypothese der Fettsäure-unabhängigen Adaptation. Eine zweite interessante Entdeckung konnte bei dem Stamm J12 registriert werden. Hierbei zeigten Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase keine Erhöhung des MK-Gehaltes. Erst die Extraktion aus Zellen der stationären Phase brachte die erwartete Zunahme des Menachinongehaltes unter niedrigen Temperaturbedingungen. Dies könnte auf eine weitere Facette der Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation hindeuten.

### 4.1.6 Auswirkung der unterschiedlichen Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation auf die biophysikalischen Parameter der Zellmembran

Nach Beurteilung der homeoviskosen Adaptation mittels Fettsäureverschiebung (Abschnitt 4.1.4) und der Analyse der isoprenoiden Chinone (4.1.5) sollte die unmittelbare Auswirkung der verschiedenen Anpassungsvarianten auf die Zellmembraneigenschaften, der Fluidität und der Ordnung, untersucht werden. Für die beiden Parameter wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (Abschnitt 1.4). Beide Sonden wurden mit verschiedenen Messmethoden kombiniert, sodass eine dedizierte Aussage über die Membranordnung und der Mobilität der einzelnen Lipide, auch Membranfluidität genannt, getätigt werden konnte. Aufgrund der variierenden Konzentrationen der verdächtigen lipophilen Verbindungen unter den untersuchten Stämmen, war die Bestimmung der beiden Parameter unabdingbar zur Feststellung ihrer genauen Wirkweise. In einem idealen/artifiziellen, nur aus Phospholipiden bestehenden Membransystem, korreliert die Membranordnung mit der Fluidität. Bei geringer Fluidität befindet sich die Membran unterhalb der Schmelztemperatur, sodass die Membran eine eng geordnete Struktur aufweist ( $S_o$  Phase der Membran; Abschnitt 1.2). Mit zunehmender Temperatur steigt im selben Maße der Grad der Ordnung wie auch die Fluidität zunimmt ( $L_d$  Phase; HARRIS *et al.*, 2002). Wie von anderen lipophilen Verbindungen bekannt ist (zum Beispiel Cholesterol), induziert die Inkorporation dieser Substanzen eine flüssige geordnete Phase ( $L_o$ , CROCKETT, 1998; MOURITSEN & ZUCKERMANN, 2004). Hierbei wird die Ordnung der Membran durch die Interaktion mit den lipophilen Substanzen erhöht, aber gleichzeitig wird die laterale Diffusion gewährleistet, sodass trotz einer hohen Membranordnung eine hohe Membranfluidität vorliegen kann. Weiterhin ermöglichte diese Methode an ganzen Zellen zu messen und den Zustand über einen breiten Temperaturbereich zu bestimmen.

Die in der Abbildung 19A, B dargestellten Daten veranschaulichen den Anisotropieverlauf der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme in einem Temperaturbereich von 6 °C bis 50 °C. Kein Stamm zeigte den typischen sigmoidalen Verlauf der Membranfluidität, bei dem die endständigen Plateaus die Endzustände der Biomembranen anzeigen: den gelartigen Festzustand ( $S_o$ , hohe Anisotropie) oder den flüssigkristallinen flüssigen Zustand ( $L_d$ , niedrige Anisotropie). Dieser Effekt ist insbesondere bei Messungen artifizieller Lipidvesikel sichtbar (Abb. 50). In den meisten Fällen war ein linearer Zusammenhang zwischen Anisotropie und Temperatur über den gesamten Messbereich beobachtbar. Dieser lineare Bereich beschreibt in der Regel den Phasenübergang der Membran (HARRIS *et al.*, 2002). Dies deutete darauf hin,

dass der Phasenübergang in allen getesteten *L. monocytogenes* Stämmen stark verbreitert war und somit ein flüssiger Membranzustand über einen größeren Temperaturbereich bereitgestellt wird. Die Anisotropie-Daten zeigten weiterhin, dass ein höherer Menachinon-Gehalt eine abflachende Wirkung auf die Anisotropie-Temperaturbeziehung hatte, sodass der Phasenübergang kontinuierlich verbreitert wurde. Das Verhältnis zwischen Menachinonkonzentration und dem Anisotropieverlauf korrelierte für alle analysierten Stämme stark. Als Folge dieser Abflachung hatten Stämme mit hohem Menachinongehalt auch bei niedrigen Temperaturen eine deutlich höhere Membranfluidität (niedrigere Anisotropie). Dieser Effekt war in der Abb. 19A und B für die Stämme DSM 20600<sup>T</sup> und FFH offensichtlich. Stämme mit geringerem Chinongehalt wie zum Beispiel FFL 1 zeigten einen nahezu linearen Kurvenverlauf und die Fluidität nahm mit der Temperatur stetig zu. Bei den Stämmen FFH und DSM 20600<sup>T</sup> hat sich die Anisotropie über den Temperaturbereich nicht wesentlich verändert. Ab 10 °C war die Membranfluidität über den gesamten Temperaturbereich nahezu konstant. Infolgedessen konnte für den Stamm DSM 20600<sup>T</sup> (Gruppe B) bei niedrigen Temperaturen eine höhere Fluidität als für den Stamm FFL 1 (Gruppe A) gemessen werden. Bei höheren Temperaturen führte diese Stabilisation der Membranfluidität beim Stamm DSM 20600<sup>T</sup> zu einer niedrigeren Fluidität im Vergleich zum Stamm FFL 1. Dieser Zusammenhang zeigte sich für alle Vertreter der beiden Gruppen A und B. Übereinstimmend mit den vorherigen Versuchen zeigten die beiden Stämme FF 127 und FF 141 einen intermediären Verlauf der Membranordnung und -fluidität. Für keinen der Stämme konnte der vollständige Phasenübergang in den Gelzustand ( $S_o$ ) innerhalb des analysierten Temperaturbereichs dargestellt werden. Bei den Stämmen Iso 11/13, 1B und 3B konnte eine gleichbleibende Anisotropie ab einer Temperatur von 30 °C beziehungsweise 40 °C von circa 0,2 gemessen werden. Dies deutet auf einen vollständigen Phasenübergang der Membran ( $L_d$ ) bei den entsprechenden Temperaturen hin.

Ein weiteres Detail der Membraneigenschaften wurde durch die Laurdan-GP-Messung ermittelt (Abb. 18). Hiermit sollte die Änderung der Membranordnung mit der Änderung der Membranfluidität über den Messbereich verglichen werden und anschließend die Auswirkung der verschiedenen Membranadaptationsmechanismen analysiert werden (HARRIS *et al.*, 2002). Alle drei Stämme der Gruppe B zeigten niedrigere Anisotropiewerte und somit eine höhere Membranfluidität bei 6 °C und 10 °C als die Stämme der Gruppe A (Abb. 19A, B). Im Gegensatz dazu war die Membranordnung im Vergleich zu den Isolaten der Gruppe A, über den gesamten Messbereich gesehen, für die Gruppe B Stämme höher. Unabhängig vom

Menachinongehalt zeigten alle Stämme die höchsten GP-Werte bei der niedrigsten Messtemperatur von 6 °C. Die Unterscheidung trat mit der Temperaturerhöhung auf, wobei sich die Zunahme der Membranunordnung für Stämme mit geringerer Menachinonkonzentration deutlich stärker zeigte (Abb. 18). Die minimalen GP-Werte für Gruppe B (hoher Menachinongehalt) Stämme betrug 0,3, wohingegen sich bei Stämmen der Gruppe A der GP-Wert bis auf 0 reduzierte. Wie erwartet positionierte sich der GP-Verlauf der beiden intermediären Stämme FF 127 und FF 141 zwischen den Ergebnissen für die beiden Gruppen. Die hier aufgezeichneten GP-Verläufe und die damit abgeleiteten Membranordnungen stimmen mit früheren Berichten von HARRIS *et al.* (2002), SÁENZ *et al.* (2012) und SÁENZ *et al.* (2015) überein. In diesen Publikationen wurde ebenfalls festgestellt, dass die Membran durch die Speicherung lipophiler Substanzen, wie zum Beispiel Cholesterol und Hopanoide, unter Beibehaltung der lateralen Mobilität stark geordnet und kondensiert wird. Die hier vorgestellte Arbeit deutet auf einen ähnlichen Effekt auch für Menachinone hin.

Die absehbare Korrelation zwischen dem Menachinongehalt und dessen Auswirkung auf die Membraneigenschaften wurde nochmals mit Hilfe einer Korrelationsanalyse (Abschnitt 2.5) bestätigt. Zur Darstellung des verbreiterten Phasenübergangs, dargestellt anhand der Fluidität, wurde der Menachinongehalt gegen die Differenz der Anisotropie zwischen 10 °C und 50 °C aufgetragen (Abb. 20B). Zur Darstellung der Stabilisation und Kondensation der Membran, dargestellt anhand der Membranordnung, wurde der Menachinongehalt gegen die Differenz der GP-Werte zwischen 6 °C und 60 °C geplottet (Abb. 20A). Für beide Analysen zeigte sich eine starke negative Korrelation mit einer hohen Signifikanz.

Für beide *P. glucanolyticus* Stämme konnte zuerst keine Erhöhung des Menachinongehaltes unter kalten Temperaturbedingungen festgestellt werden. Trotzdem wurden Anisotropie- und GP-Messungen für beide Wachstumstemperaturen erstellt, um die ausgeprägte Änderung in der Membrandistribution (hohe  $\Delta W_{AMT}$ -Werte; Abschnitt 3.2.2) anhand der Membranmessungen abbilden zu können. Diese Ansätze bei denen die Zellernte im exponentiellen Wachstumsbereich erfolgte, zeigten vergleichbare Membraneigenschaften mit den zuvor besprochenen Ergebnissen für die *L. monocytogenes* Stämme der Gruppe A (niedriger Menachinongehalt). Für beide Messmethoden zeigten sich deutliche Änderungen der Messwerte in Abhängigkeit der Messtemperaturen. Weiterhin konnten die Übergänge zu konstanten GP- und Anisotropiewerten an beiden Enden der Messskala beobachtet werden. Dies bedeutet, dass anhand der GP-Werte der 30 °C inkubierten Kulturen ein beinahe vollständiger Übergang der Membran zum Gel-artigen ( $S_o$ ) Phasenzustand beobachtet werden

konnte, wohingegen die 10 °C inkubierten Kulturen die maximale Membranunordnung, und somit die fluide Membranphase, bei Temperaturen über 50 °C erreichten (Abb. 27). Diese starke Abhängigkeit der Fluoreszenzwerte von der Messtemperatur, sowie die daraus resultierenden vergleichsweise schmalen Phasenübergänge, waren aufgrund der starken Fettsäureverschiebung und der Verringerung des Menachinongehaltes bei Temperaturreduktion zu erwarten (HARRIS *et al.*, 2002; SEEL *et al.*, 2018). Die Ergebnisse verdeutlichten die Auswirkung der homeoviskosen Adaptation und der resultierenden Anpassung der Membranfluidität an entsprechende Umweltbedingungen (Abb. 27). Diese strikte Fettsäureabhängige Anpassung wurde jedoch nur während der exponentiellen Wachstumsphase festgestellt. Die Zellernte in der stationären Phase offenbarte eine Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation, die in ihrer Wirkung mit der Menachinon-abhängigen Anpassung der *L. monocytogenes* Gruppe B Stämme zu vergleichen war. In den Abschnitten 3.2.2 und 3.2.3 konnte bereits gezeigt werden, dass sich in der stationären Phase zum einen der Menachinongehalt verdoppelte und zum anderen die Ausprägung der Fettsäureverschiebung, gemessen anhand des  $\Delta$ WAMT-Wertes, sich stark verringerte. Entsprechend der aufgestellten Hypothese zeigten sich die entsprechenden Änderungen der Membranparameter (Abb. 28 und 29). Die 10 °C inkubierten stationären Ansätze des Stamms J12 besaßen eine höhere durchschnittliche Membranordnung analog zu den entsprechenden *Listeria*-Stämmen der Gruppe B. Weiterhin konnte mit Hilfe der TMA-DPH Anisotropiemessung auch ein stark verbreiteter Phasenübergang sichtbar gemacht werden. Wie zuvor bei den *Listerien* wurde hierdurch, trotz der geringen Fettsäure-abhängigen Anpassung im Vergleich zu den Ansätzen der exponentiellen Wachstumsphase, eine leicht bessere Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen erreicht. Wie erwartet, zeigten die 30 °C inkubierten stationären Kulturen keine Unterschiede zu den exponentiellen Ansätzen. Hierdurch wurde verdeutlicht, dass dieser Fettsäure-unabhängige Mechanismus nur bei niedrigen Temperaturen auftrat und somit eine gezielte Kälteanpassung darstellt.

Für die *Listeria*-Stämme zeigte sich ein deutlicher Einfluss der beobachteten Kombination der Kälteadaptation mittels Fettsäureverschiebung und der höheren Inkorporation von Menachinonen. Es konnte kein eindeutiger Phasenübergang zwischen dem festen, gelartigen ( $S_0$ ) Zustand und dem flüssig-ungeordneten Zustand ( $L_d$ ) beobachtet werden. So scheint bei *L. monocytogenes* ein sekundärer Membranmodifikationsmechanismus vorhanden zu sein, der durch die Verbreiterung des Phasenübergangs zu einer optimierten Membranfluidität führte. Dies könnte auch erklären, warum *Listeria monocytogenes* in der Lage ist, über einen

außergewöhnlich großen Temperaturbereich von -2 bis 50°C zu wachsen (FARBER & PETERKIN, 1991, KO *et al.*, 1994). Der erhöhte Menachinongehalt bei niedrigen Temperaturen deutet darauf hin, dass dieser Effekt durch dieses Lipid verursacht wird. Auch die Korrelation der Fettsäuredistribution unterstützen diese Hypothese. Die WAMT-Werte zeigten eine weniger ausgeprägte Anpassung der Fettsäuren an niedrige Wachstumstemperaturen bei hohen Menachinonkonzentrationen (Tab. 7). Im Gegensatz zu den *Listerien* konnte die Zunahme des Menachinongehaltes in *P. glucanolyticus* erst in der stationären Phase detektiert werden. Hierbei fiel die prozentuale Änderung größer als bei den *L. monocytogenes* Stämmen der Gruppe B aus. Der erhöhte Menachinongehalt zeigte dabei die gleichen Auswirkungen auf die Membranfluiditäten sowie der Rigidität wie zuvor bei den Gruppe B *Listeria*-Stämmen beobachtet.

### 4.1.7 Auswertung der differentiellen Transkriptomanalyse

Die differentielle Transkriptomanalyse sollte einen Einblick in die Regulation der potentiellen Fettsäure-unabhängigen Anpassungsmechanismen auf Genomebene ermöglichen. Zu Beginn der Arbeit sollten zuerst einzelne Gene von Interesse identifiziert und deren Expressionsänderungen gemessen werden. Aufgrund der zunehmenden Verbreitung von *Next-Generation* Sequenzierungsmethoden und einer einhergehenden Kostenreduktion wurde die ganzheitliche Transkriptomanalyse durchgeführt. Für die Beurteilung einer signifikanten Änderung der Expressionsrate wurde mindestens eine 2-fache Änderung (engl.: *fold change*) vorausgesetzt (VERMASSEN *et al.* 2016).

Das erstellte Genom des *L. monocytogenes* Stamms FFH besaß eine Gesamtgröße von circa 2,8 Mb wobei der GC-Gehalt bei 37,9 mol% lag und diente als Kartierungsgrundlage für das Transkriptom. Die Genomdaten stimmen mit bereits sequenzierten *L. monocytogenes* Stämmen überein. GLASER *et al.* (2001) sequenzierte den Stamm EGD-e dessen Genom eine Gesamtgröße von 2,9 Mb besaß und dessen GC-Gehalt 39 mol% entsprach, wobei innerhalb der Spezies der GC-Gehalt zwischen 37-39 mol% schwanken kann (MCLAUCHLIN & REES, 2009). Nach der Transkriptomanalyse wurden 2821 einmalige Reads/Gene identifiziert, wovon 13 % der Gene hochreguliert und ein etwa doppelt so hoher Anteil von 22 % herunterreguliert wurde. Folglich wurde circa ein Drittel der Genexpression bei der Reduktion der



Wachstumstemperatur von 37 °C auf 6 °C angepasst. Das erstellte Genom erlaubte es eine ANI-Analyse, zur Bestätigung der Spezieszugehörigkeit, durchzuführen (Abschnitt 2.4.5). Für den Genom-Sequenzvergleich wurden als Referenz zuerst der Typstamm DSM 20600<sup>T</sup> und in der Forschung häufig genutzte Stamm EDG-e (beide Serovar 1/2a) verwendet (BÉCAVIN et al., 2014). Die berechneten OrthoANIu Werte waren mit 95 % an der untersten Grenze der Spezieszugehörigkeit gelegen. Genomvergleiche mit den zwei am nächsten Verwandten Spezies *L. innocua* und *L. ivanovii* konnte eine Zugehörigkeit des Stammes zu diesen Arten ausschließen (Abschnitt 3.5). Weitere Genomvergleiche mit den Serovar 4b Stämmen ATCC 19115 und F2365 resultierten in einer eindeutigen Verifikation des Stamms FFH als *L. monocytogenes* mit OrthoANIu Werten über 99,5 %. Die relativ großen Unterschiede der OrthoANIu Werte in Abhängigkeit der Serovare der Vergleichsgenome ist sehr wahrscheinlich in der genetischen Diversität dieser Spezies begründet. Dabei zeichnen sich die Serovar 1/2a Stämme durch ihre große genetische Variabilität und einer Vielzahl von Stammsubtypen aus (Kathariou, 2002). Wohingegen 4b Serovare die geringste Diversität unter den Linien aufweisen (ORSI et al., 2011).

Verantwortlich für die Menachinonsynthese wurde das entsprechende *men*-Operon (Gen-ID 6-11) und das einzeln vorliegende *menX*-Gen (Gen-ID 2583) identifiziert. Es konnte im Schnitt eine leichte Expressionszunahme der entsprechenden Gene beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war (Tab. 8). Die geringe Änderung der Expressionsrate, könnte zum einen durch die geringe Änderung des Menachinongehaltes zwischen den beiden Temperaturen erklärt werden (Abb. 16). Zum anderen wurde gezeigt, dass die Induktion bei Kälte durch eine erhöhte Stabilität der mRNA und somit der Halbwertszeit, unabhängig von deren Anzahl, erfolgen kann (MORITA et al., 1999; CHOWDHURY, 2003). Die spezifischen Reaktionsschritte für die Menachinonbiosynthese sind ausführlich beschrieben und bestehen aus sieben Stufen (BENTLEY & MEGANATHAN, 1982; BOERSCH et al., 2018). Die Ausgangsverbindung stellt Chorismat dar und wird durch den Shikimatweg zur Verfügung gestellt (NOWICKA & KRUK, 2010). Im ersten Schritt erfolgt die Isomerisierung zu Isochorismat durch MenF, welches im Anschluss von MenD zu 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylat konvertiert wird. Das aromatische Intermediat *O*-Succinylbenzyl (OSB) wird über zwei Schritte hinweg mit Hilfe der Enzyme MenH und MenC gebildet und anschließend die Carboxylgruppe durch MenE unter ATP-Verbrauch aktiviert. Das erlaubt nun MenB die Ringschließung von OSB-CoA durch eine Kondensationsreaktion zu katalysieren und nach einem Hydrolyseschritt das naphthalenoide Grundgerüst 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA) zu produzieren. Im

nächsten Schritt wird DHNA mit der entsprechenden Isoprenoidkette durch MenA prenyliert und DMK gebildet. Abgeschlossen wird die Menachinon-Synthese mit der Methylierung des Naphthalinoidrings an Position 3 durch MenG (KUROSU *et al.*, 2007).

Der vorliegende Kältestress konnte durch die erhöhten Expressionen der Flagellenbiosynthese (im Durchschnitt 10-facher Anstieg) und des Kälteschockproteins A (CspA; 3,7-fache Änderung) bestätigt werden (JOHANSSON *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2009). Obwohl bekannt ist, dass vermehrte Aufnahme und Bildung von Betain sowie Carnitin in *L. monocytogenes* Teil der Kälteresistenz darstellen (KO *et al.*, 1994; Ko & Smith, 1999), konnte keine signifikante Expressionszunahme der entsprechenden *opu*-Gene bei kalten Bedingungen detektiert werden. Einzig ein automatisch annotierter L-Prolin/Glycinbetain-Transporter zeigte eine 2,7-fache Expressionssteigerung bei Kälte. Diese Annotation ist jedoch kritisch zu betrachten, da eine Proteinblastanalyse nur einen nicht näher spezifizierten *major facility superfamily* Transporter ergab. Ob in diesem Fall die fehlende Induktion durch eine mögliche Erhöhung der entsprechenden mRNA Halbwertszeit erfolgt, könnte durch eine quantitative Bestimmung des cytoplasmatischen Betaingehaltes überprüft werden. Dies stellte für die Fragestellung dieser Arbeit keine Notwendigkeit dar. Eine weitere Bestätigung der unterschiedlichen Temperaturbedingungen erfolgte anhand der starken Expressionsreduktion (-90-fache Änderung) des kodierenden Gens für das Aktin-induzierende Protein ActA, denn Virulenzgene sind in *L. monocytogenes* bei 37 °C maximal exprimiert und werden unterhalb von 30 °C stark herunterreguliert (JOHANSSON *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte keine signifikante Änderung verschiedener Hitzeschockprotein-kodierender Gene festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Als Referenzgene, ohne zu erwartende Veränderung des Expressionslevels, wurden drei *housekeeping*-Gene (ROCHA *et al.*, 2015) aufgeführt, die keine temperaturabhängige Veränderung des Expressionsspiegels zeigten.

Das Genom von *P. glucanolyticus* J12 besaß eine Größe von 6,5 Mb sowie einen GC-Gehalt von 48,9 %. Zum Vergleich diente das Genom des Typstamms 5162<sup>T</sup> (MATHEWS *et al.*, 2016). Hierbei wurde eine Größe von 6,2 Mb sowie ein GC-Gehalt von 43,5 % publiziert wobei der entsprechende Eintrag in dem Nukleotidarchiv GenBank einen GC-Gehalt von 49,2 % ausweist. Einer weiteren Quelle nach besitzt der Typstamm einen GC-Gehalt von 48,1 % (PRIEST, 2009). Anhand der Genomsequenz des Typstamms DSM 5162<sup>T</sup> konnte die Spezieszugehörigkeit des Stamms J12 zu *P. glucanolyticus* mit 99,4 % verifiziert werden (Abschnitt 3.5).

Von den 6098 vorhergesagten kodierenden Sequenzen zeigten 10 % eine Hochregulation, wobei nur 5 % der Gene eine Verringerung ihrer Expressionsrate bei niedrigen Temperaturen erfahren haben (Abschnitt 3.2.5). Im Vergleich zum vorher diskutierten Stamm FFH fiel der prozentuale Anteil der signifikant geänderten Gene in diesem Fall deutlich geringer aus. Das könnte damit begründet werden, dass von den 6098 vorhergesagten kodierenden Sequenzen 3339 Gene für hypothetische Proteine kodierten und bei der Transkriptomanalyse keine mRNA dieser Sequenzen detektiert wurde. Bedingt durch die späte Zunahme des Menachinongehaltes zur stationären Phase, wurde der Zeitpunkt der RNA-Extraktion zum Übergang beziehungsweise Beginn der stationären Wachstumsphase verlagert. Dadurch sollten Wachstumsphasen-bedingte Änderungen des Transkriptoms bedacht werden.

Für *P. glucanolyticus* wurden keine *men*-Gene des klassischen Menachinonsyntheseweges vorgefunden. Stattdessen wurden *mqnABCD*-Gene (Gen-ID: 1054, 5032, 3319, 5031) des alternativen Futalosinweges identifiziert (Tab. 11). HIRATSUKA *et al.* (2008) fanden heraus, dass einige Bakterien keine *men*-Homologe besitzen und konnten anschließend den alternativen Futalosin Weg zuerst in einem *Streptomyces*-Stamm beschreiben. Dieser neue Syntheseweg besteht aus den vier Enzymen MqnABCD und einigen unbekanntenen Enzymen (DAIRI, 2009, DAIRI, 2012; ZHI *et al.*, 2014). Durch die Enzyme MqnABCD wird in vier Schritten Chorismat zu 1,4-Dihydroxy-6-naphthoat katalysiert und anschließend nach der Decarboxylierung (Gen-ID 1053), Prenylierung (MenA Homolog, Gen-ID 1052) und Methylierung (MenG Homolog, Gen-ID 1051) die MK-Synthese abgeschlossen. Für die Synthese der Heptaprenylkette wurden die beiden Gene (Gen-ID 1050, 1055), kodierend für die beiden Komponenten des Enzyms, entdeckt. Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, konnte für die beteiligten Gene eine signifikante 2-fache Expressionssteigerung bei niedrigen Temperaturen am Anfang der stationären Wachstumsphase gezeigt werden. Hiermit wurde verdeutlicht, dass die detektierte Zunahme des Menachinongehaltes bereits auf genomischer Ebene reguliert wird. Der vorliegende Kältestress konnte durch die erhöhten Expressionsraten der Kälteschockprotein-kodierenden Gene *cspA* (6,1-fache Änderung) und *cspD* (2,2-fache Änderung) und der Reduktion des Gens kodierend für das generelle Stressprotein (-3,2-fache Änderung) gezeigt werden (GRAUMANN & MARAHIEL, 1999).

Analog zu dem untersuchten *Listeria*-Stamm FFH konnte kein signifikanter Anstieg der Gene für die Aufnahme oder Synthese von Kryoprotektoren, wie zum Beispiel Betain, sowie Gene kodierend für diverse Hitzeschutzproteine gezeigt werden (nicht aufgeführt). Die Gene *ftsZ* und *gyrB* wurden in diesem Fall als Referenzgene verwendet und zeigten keinen relevanten

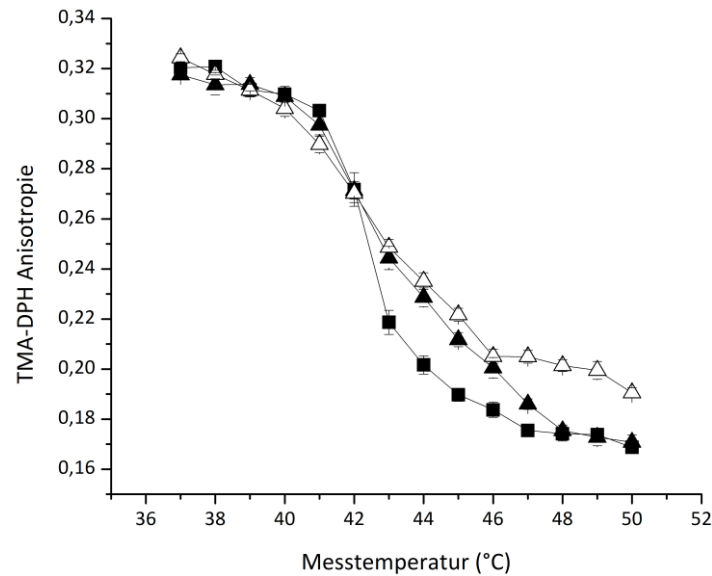
Expressionsunterschied zwischen den beiden Temperaturen auf (ROCHA *et al.*, 2015). Weiterhin konnte die Reduktion des Anteils an der ungesättigten Fettsäure 16:1 *cis* 5 in der stationären Phase bei 10 °C (Abschnitt 3.2.2; Abb. 25) ebenfalls durch die Abnahme der Expression des Gens 3999 (-2,8-fache Änderung), kodierend für eine Fettsäure-spezifische Desaturase, beobachtet werden. Dies stimmt mit der Literatur überein, wobei die Desaturase nur eine kurzfristige Anpassung bei auftretendem Kälteschock darstellt (Beranová *et al.*, 2008). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass in dem Fall von *P. glucanolyticus* J12 die Zelle aktiv das Ausmaß der Fettsäure-abhängige Adaptation herunterreguliert und die Membranfluidität durch die erhöhte Einlagerung von Menachinon kompensiert (Abschnitt 3.2.3, Abb. 26B). Dadurch wird nicht nur eine leicht fluidere Membran bei niedrigen Temperaturen gewährleistet, sondern die Membran über einen sehr breiten Temperaturbereich stabilisiert.

### **4.1.8 Verifikation der Menachinon-induzierten Verbesserung der Membranfluidität mittels Supplementationstests**

Für beide Modellorganismen *L. monocytogenes* und *P. glucanolyticus* konnte eine Erhöhung des Menachinongehaltes bei niedrigen Temperaturen unter bestimmten Bedingungen gezeigt werden (Abschnitt 4.1.7). Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Kälteanpassung der Membran und dem Menachinongehalt. Dieser resultierte in einer, gemessen anhand des  $\Delta$ WAMT-Wertes, abnehmenden Fettsäureverschiebung, die wahrscheinlich durch den erhöhten Menachinongehalt kompensiert wird. Die Funktion ist dabei vergleichbar mit der Membranmodifikation in Eukaryoten, bei denen ebenfalls durch die Einlagerung von Cholesterol die Membranfluidität über einen breiten Temperaturbereich gewährleistet wird (MOURITSEN & ZUCKERMANN, 2004; ABE & HIRAKI, 2009; LINGWOOD & SIMONS, 2010). Die Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen zeigten eine vergleichbare Auswirkung der untersuchten Membranparameter bei Stämmen mit erhöhtem Menachinongehalt (Abschnitt 3.1.5, 3.2.5). Dabei handelte es sich jedoch immer nur um Korrelationen, womit eine belastbare Kausalität nicht vorlag. Um den Einfluss des Menachinon-Gehalts auf die Regulierung der Membranfluidität zu bestätigen, sollte der Chinongehalt in beiden Spezies geändert werden. Die ersten Ansätze zur artifiziellen Erhöhung des isoprenoiden Chinongehaltes sollten durch die Supplementierung der Kulturen mit dem Menachinon ähnlichen Phyllochinon Vitamin K<sub>1</sub> erfolgen (Abschnitt 3.2.7). Diese Ansätze

waren jedoch nicht erfolgreich, da verschiedene Emulgatoren, die zur Solubilisierung von Vitamin K<sub>1</sub> verwendet wurden, verschiedene Nachteile mit sich brachten. So hatten schon geringe Volumina der verwendeten Emulgatoren Ethanol oder DMSO einen deutlichen Effekt auf die Membranfluidität oder auf den Gefrier-Auftau-Stresstest, sodass diese Ergebnisse unbrauchbar wurden. Auch Emulgatoren auf nicht organischer Lösemittelbasis, wie zum Beispiel niedrig konzentriertes Agar-Agar waren nicht zielführend (Abb. 32).

Ein alternativer Ansatz wurde für die *L. monocytogenes* Stämme gewählt. Hierbei sollte eine Inhibierung der Menachinonbiosynthese durch Supplementierung mit drei aromatischen Aminosäuren erfolgen. TSUKAMOTO *et al.* (2001) wählten diesen Ansatz zur Reduktion des Menachinongehaltes in einem *Bacillus subtilis* Stamm, der zur Fermentation von Lebensmitteln verwendet wird. Die aromatischen Aminosäuren verursachen eine Produkthemmung der 3-Desoxyarabinoheptulosanat-7-phosphatsynthase im Shikimatweg. Wie einleitend beschrieben (Abschnitt 1.3.1), findet die Synthese des aromatischen Grundgerüsts der Menachinone, sowie die Synthese der aromatischen Aminosäuren, teilweise gemeinsam im Shikimatweg statt (BENTLEY & HASLAM, 1990; NOWICKA & KRUK, 2010). Durch die Zugabe der drei aromatischen Aminosäuren wird eine Feedback-Inhibition des Shikimatweges erreicht, der auch zur Verringerung der Menachinonsynthese führt. Basierend auf diesem Zusammenhang konnte der Menachinongehalt in zwei *L. monocytogenes* Stämmen der Gruppe B reduziert werden (Abb. 22). Diese Reduktion führte zu einem steileren Phasenübergang (Abb. 23) und reduzierte damit den Bereich einer optimalen Membranfluidität auf einen kleineren Temperaturbereich. Die Anisotropiekurven der Menachinon-reduzierten Isolate entsprachen annähernd den Kurven der Isolate der Gruppe A. Zur Kontrolle wurde die Fettsäuredistribution der Aminosäuren-supplementierten Kulturen, die keine Änderungen aufzeigten, bestimmt. Weiterhin wurde ein Aminosäuren-Kontrollansatz mit drei vergleichbaren, nicht aromatischen Aminosäuren durchgeführt und somit ein Einfluss durch die AS-Supplementation selbst ausgeschlossen (Abb. 23). Hiermit wurde die Beteiligung des Menachinonpools an der Membranfluiditätsmodulation in der Bakterienzelle bestätigt. Eine AS-Supplementation zur Reduktion des MK-Gehaltes in *P. glucanolyticus* war nicht möglich. Wahrscheinlich ist dies darin begründet, dass die supplementierten Aminosäuren bis zur stationären Phase von den Zellen verstoffwechselt werden und somit keine Produkthemmung mehr auf den Shikimatweg vorherrscht.



**Abbildung 50: Auswirkung von Vitamin K<sub>1</sub> auf die Temperaturabhängigkeit der TMA-DPH Anisotropie in DPPC-MLVs.** Entnommen der Masterarbeit von FLEGLER (2017). Geschlossenes Quadrat, 100 % DPPC. Geschlossenes Dreieck, 99 % DPPC+ 1 % Vitamin K<sub>1</sub>. Offenes Dreieck, 90 % DPPC + 10 % Vitamin K<sub>1</sub>. Daten stellen Mittelwerte dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

FLEGLER (2017) führte, als zusätzliche Bestätigung der Auswirkung von isoprenoide Chinonen auf die Membranfluidität, Fluiditätsmessungen an einem definierten artifiziellen System durch. Hierbei wurde der Effekt von Naphtochinon auf die Membranfluidität in DPPC-Vesikeln mit verschiedenen Konzentrationen an Vitamin K<sub>1</sub> untersucht (Abb. 50). Im Gegensatz zu natürlichen Membranen, die aus mehreren Lipiden und weiteren enthaltenen Verbindungen (Proteine, isoprenoide Chinone, Cytochrome, und andere) bestehen, sind diese artifiziellen Lipidvesikel aus einem Lipid mit der gleichen Schmelztemperatur aufgebaut. Folglich konnte ein sehr steiler Phasenübergang beobachtet werden. Ein kompletter Phasenübergang fand innerhalb von ungefähr 4 °C statt. Die Supplementierung mit geringen Mengen an Vitamin K<sub>1</sub> (1 %) führte zu einer verminderten Membranfluidität oberhalb der Schmelztemperatur der DPPC-Vesikel. In diesem System konnte jedoch nur ein geringer Einfluss von Vitamin K<sub>1</sub> auf die Membranfluidität unterhalb der Schmelztemperatur nachgewiesen werden. Insgesamt war aber der Effekt der Phasenübergangsverbreiterung deutlich zu erkennen. Ähnliche Effekte wurden zuvor für verschiedene Lipidvesikel gezeigt, die mit Ubiquinon-3 (ASAI & WATANABE, 1999), Vitamin K<sub>1</sub> (ORTIZ & ARANDA, 1999; ASAI, 2000) und Cholesterin (HARRIS *et al.*, 2002) gemischt wurden.

## 4.2 Auswirkung und Funktionsweise von Carotinoiden als Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran

Für diese umfangreiche Klasse der lipophilen Pigmente standen die beiden Spezies *S. xylosus* und *M. luteus* im Vordergrund. Die Auswahl der beiden Spezies begründete sich mit der Zunahme des Pigmentationsgrades bei Temperaturreduktion. Insbesondere die *S. xylosus* Stämme zeigten eine starke orange-gelbe Pigmentierung der Kolonien nach einer Inkubation bei 10 °C, wohingegen die 30 °C inkubierten Kolonien keine sichtbare Pigmentierung aufwiesen.

Die erhöhte Produktion von Carotinoiden unter kalten Wachstumsbedingungen wurde in der Vergangenheit für mehrere Bakterienarten, einschließlich *Staphylococcus xylosus*, beobachtet (SCHLEIFER & KLOOS, 1975; CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997; FONG *et al.*, 2001). Einige Autoren assoziierten dieses Phänomen mit einem potentiellen Kälteadaptationsmechanismus. Bis heute jedoch gab es keinen experimentellen Nachweis für die Beteiligung von Carotinoiden an der Modifikation der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturbedingungen und damit an der Kälteadaptation. Somit eignete sich insbesondere *S. xylosus* als Modellorganismus zur Bestimmung der Auswirkung der Carotinoide auf die Fettsäure-abhängige Kälteanpassung, sowie deren Einfluss auf die Membraneigenschaften, der Ordnung und Fluidität, wie dies zuvor für isoprenoide Chinone in *Listeria monocytogenes* (SEEL *et al.*, 2018) gezeigt, und für *Paenibacillus glucanolyticus* (Abschnitt 4.1) zuvor diskutiert wurde. In *M. luteus* nahm die Intensität der Pigmentierung ebenfalls bei kalten Inkubationsbedingungen zu, jedoch war die Differenz hierbei aufgrund der doch schwach bis mittelstark pigmentierten Zellen bei 30 °C Inkubationstemperatur geringer. Weiterhin ist von *M. luteus* bekannt, dass das gebildete Carotinoid Sarcinaxanthin underivatisiert oder mono- beziehungsweise di-glucosyliert vorliegen kann. Mit jedem zusätzlichen Glucoserest steigt dabei die Polarität des Carotinoids. Das ermöglichte die Untersuchung der Fragestellung, ob die Polarität der Carotinoide einen Einfluss auf die Stärke der gemessenen Membraneigenschaften besitzt und ob dies einen möglichen Stellmechanismus darstellt. Generell zeigen Literaturdaten anhand von Versuchen mit artifiziellen Vesikeln, dass apolare Carotine, wie zum Beispiel  $\beta$ -Carotin, einen geringeren Einfluss auf die Rigidität und Fluidität besaßen als polare Xanthophylle (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996).

### 4.2.1 Wachstumsverhalten der untersuchten *S. xylosus* und *M. luteus* Stämme

Bei der mesophilen Inkubationstemperatur zeigte sich für beide *S. xylosus* Stämme ein fast identisches Wachstumsverhalten (Abb. 33). Die Temperaturreduktion äußerte sich in einer Reduktion der Wachstumsrate um den Faktor 5 bis 6 (Tab. 12) und zeigte die geringste Auswirkung unter allen getesteten Spezies auf. Entsprechende publizierte Vergleichswerte in ähnlichen Nährmedien sind nicht vorhanden. Die gemessenen Werte lagen in derselben Größenordnung der anderen 30 °C inkubierten Spezies *P. glucanolyticus* und *M. luteus*. Bei der niedrigen Temperatur zeigte sich schließlich eine stärkere Differenzierung zwischen den Stämmen DSM 20266<sup>T</sup> (0,12 h<sup>-1</sup>) und J70 (0,16 h<sup>-1</sup>), woraus auf eine bessere allgemeine Kälteadaptation des Wildtyps geschlossen werden kann. Dies äußerte sich auch in der Zunahme der Zelldichte im Vergleich zur Inkubation bei 30 °C, die in einer 70-%-igen Steigerung für den Stamm DSM 20266<sup>T</sup> und einer Verdopplung für den Stamm J70 resultierte.

Bei den *M. luteus* Stämmen zeigte sich insbesondere beim Zellertrag ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten der beiden Stämme (Abb. 42). Der Mehrertrag des Stamms J3 gegenüber dem Typstamm DSM 20030<sup>T</sup>, gemessen anhand der optischen Dichte, betrug bei 30 °C circa 23 % und erhöhte sich bei 10 °C auf etwa 37 %. Die maximalen Wachstumsraten waren bei 30 °C vergleichbar und bei 10 °C sogar identisch (Tab. 17). Die beiden *M. luteus* Stämme zeigten das langsamste Wachstum aller Modellorganismen bei 30 °C auf und besaßen ebenfalls als Einzige bei der mesophilen Wachstumstemperatur eine Lag-Phase. Die Temperaturreduktion hatte bei beiden Stämmen eine 10-fache Reduktion der Wachstumsrate zur Folge und war vergleichbar mit den anderen Modellorganismen. Publizierte Daten hinsichtlich der Wachstumsparameter bei entsprechenden Wachstumsbedingungen waren ebenfalls nicht vorzufinden.

Wie bei den ersten zwei Spezies zuvor, zeigten auch die Carotinoid-relevanten Spezies *S. xylosus* und *M. luteus* sichtbar höhere Wachstumsraten bei mesophilen Temperaturbedingungen. Aufgrund der gegebenen Definition (Abschnitt 1) sind die untersuchten Stämme nicht in die Gruppe der psychrophilen Bakterien einzuordnen. Die optimalen Wachstumstemperaturen werden für *M. luteus* bei 37 °C (LIU *et al.*, 2000) und für *S. xylosus* zwischen 25 °C bis 35 °C angegeben (SCHLEIFER & BELL, 2009), womit die beiden untersuchten Spezies als Kälte-tolerante Mesophile beziehungsweise psychrotolerante Mikroorganismen eingestuft werden. Auch in diesem Fall war abzusehen, dass die Temperatur



bei der die maximale Wachstumsrate und der maximale Zellertrag auftritt nicht identisch sind. Insbesondere der Stamm J70 zeigte eine Verdopplung des Zellertrages unter kalten Wachstumsbedingungen (MARGESIN, 2009; SEEL *et al.*, 2016).

#### 4.2.2 Stressresistenz gegenüber multiplen Gefrier-Auftau-Schritten

Der Gefrier-Auftau-Stresstest der beiden *S. xylosus* Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70 wurde zusätzlich um die NaCl-supplementierten Ansätze des Stamms J70 ergänzt (Abb. 41). Es wurden nur geringe logarithmische Reduktionen der Lebendzellzahl für Kulturen festgestellt, die bei 10 °C inkubiert wurden und eine hohe Carotinoidkonzentration aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Kulturen beider Stämme bei 30 °C eine deutliche logarithmische Reduktion der Lebendzellzahl nach drei Gefrier-Auftau-Zyklen, was zu einem Zellverlust von > 99 % beim Stamm J70 und > 90 % beim Typstamm DSM 20266<sup>T</sup> führte. Um den Einfluss des Carotinoidgehaltes auf die Regulation der Membranfluidität und die Kälteresistenz zu bestätigen, wurde die Carotinoidsynthese in *S. xylosus* J70 bei niedrigen Temperaturen inhibiert. Dies konnte erfolgreich mit Hilfe einer moderaten NaCl-Supplementation des verwendeten TSB-Mediums erreicht werden (Abschnitt 3.3.7; FONG *et al.*, 2001). Hierdurch konnten auch bei 10 °C zum Erntezeitpunkt unpigmentierte Zellen gewonnen werden. Für diese NaCl-supplementierten Zellen der 10 °C Kulturen konnte eine vergleichbare Reduktion der Lebendzellzahl erreicht werden wie dies zuvor für die unsupplementierten 30 °C inkubierten Kulturen gemessen wurde (Abb. 41). Diese Ergebnisse indizierten eine verbesserte Kälteresistenz in Abhängigkeit von der Carotinoidinkorporation und nicht von der allgemeinen Kälteadaptation der Zellen während des Wachstums bei kalten Bedingungen. Eine unspezifische Korrelation zwischen der NaCl-Supplementation und der Reduktion des Kältestresses konnte anhand der supplementierten 30 °C inkubierten Kulturen kontrolliert werden. Bei dieser Kontrolle zeigte sich, dass keine signifikante Änderung der Lebendzellzahl-Reduktion im Vergleich zum unsupplementierten 30 °C Ansatz zu erkennen war. Als weitere Kontrolle diente die Fettsäureanalyse der NaCl-supplementierten Ansätze, wobei ein nur sehr geringer Unterschied zu den unsupplementierten Ansätzen bei beiden Wachstumstemperaturen beobachtet werden konnte (Abschnitt 3.3.2). Hiermit konnte auch eine Fettsäure-bedingte Änderung der Resistenz gegenüber dem Gefrier-Auftau-Stresstest ausgeschlossen werden. Zwar könnte die NaCl-Zugabe eine Reihe von zusätzlichen Zellreaktionen auslösen, die eine

Resistenzschwächung bedingen könnten. Jedoch wird die aufgeführte Hypothese sowohl durch die genutzten Kontrollen als auch von der Tatsache bestärkt, dass die Spezies *S. xylosus* eine hohe Salzresistenz besitzt, die sich noch bei 10 % NaCl in einem starken Wachstum und zwischen 14 % und 15 % NaCl in einem eingeschränkten Wachstum äußert (SCHLEIFER & KLOOS, 1974; SCHLEIFER & BELL, 2009). Dies bestätigte sich auch bei diesem Versuch, wobei durch die NaCl-Supplementation keine Reduktion der Wachstumsrate bei 30 °C und 10 °C Inkubationstemperatur beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse bezüglich des Gefrier-Auftau-Stresstest der *M. luteus* Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 bekräftigen die zuvor gestellte Annahme der verbesserten Kälteresistenz bedingt durch die Carotinoidinkorporation (Abb. 49). Aufgrund der ebenfalls pigmentierten Zellen bei 30 °C konnte bei allen Ansätzen eine Reduktion der Lebendzellzahl geringer als eine Log-Stufe detektiert werden. Dabei zeichneten sich zwei weitere Zusammenhänge ab. Zum einen zeigten die stärker pigmentierten 10 °C inkubierten Kulturen bei beiden Stämmen (Abschnitt 3.4.7) eine leicht bessere Resistenz gegenüber den 30 °C Kulturen auf. Zum anderen konnte auch eine leicht bessere Kälteresistenz in dem Wildtypstamm J3, im Vergleich zum Typstamm aus einer Stammsammlung, beobachtet werden. Die Änderung mit 0,5 Log-Stufen zwischen den beiden Temperaturen fiel dabei deutlich geringer aus, als die publizierten Werte von 3 Log-Stufen von WOUTERS *et al.* (1999) oder die Ergebnisse für die hier untersuchten *P. glucanolyticus* Stämme, bei denen die Reduktion zwischen 3 bis 4 Log-Stufen lag. Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass die verbesserte Kälteresistenz durch die Einlagerung von Carotinoiden vermittelt wird, und nicht nur durch die „allgemeine“ Kälteanpassung bedingt wird.

Mit diesen Daten der beiden Carotinoid-spezifischen Mikroorganismen konnte ein starker Zusammenhang zwischen dem Carotinoidgehalt und der Resistenz gegenüber dem Gefrier-Auftau-Stress aufgestellt werden. Die deutliche Verbesserung der Überlebensfähigkeit der pigmentierten Kulturen könnte mit Hilfe der Membranmessungen erklärt werden. Wie anhand der GP- und TMA-DPH-Messungen erörtert (Abschnitt 3.3.5, 3.4.5), konnte durch die Einlagerung der Carotinoide die Zellmembran stark kondensiert und geordnet werden, ohne Einbußen in der Membranfluidität hinnehmen zu müssen. Hierdurch dürften insbesondere Schäden der Membran als Permeabilitätsbarriere verringert werden, wodurch es sonst zu einer unkontrollierten Aufnahme von Toxinen und dem Verlust von Nährstoffen kommen würde (RAY & SPECK, 1973; JAY *et al.*, 2005). Aber der genaue Mechanismus, der zur besseren Überlebensrate führt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Eine mögliche

Erklärung könnte der stark verbreiterte Phasenübergang sein, der eine ausreichende Membranfluidität über einen großen Temperaturbereich gewährleistet, sodass Zellprozesse auch bei Gefriertemperaturen ablaufen können. Für verschiedene Mikroorganismen wurden funktionierende Zellprozesse bis  $-18\text{ °C}$  bereits gezeigt (GEIGES, 1996; MARGESIN & MITEVA, 2011).

#### 4.2.3 Unterschiede in der Anpassung der Fettsäureprofile an niedrige Temperaturen

Zwangsläufig erfolgte auch für die Carotinoid-haltigen Bakterien eine Analyse der enthaltenen Fettsäuren zur Bestimmung der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation der Zellmembran. Dies diente als Grundlage anhand derer später die Beurteilung der Fettsäure-unabhängigen Modifikation erfolgte (Abschnitt 1.2; RUSSELL, 1984, ZHANG & ROCK, 2008).

Für beide untersuchten *S. xylosus* Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70 konnte eine Temperatur-abhängige Reaktion ihrer Fettsäureprofile beobachtet werden (Abb. 34). Es zeigte sich keine Stamm-spezifische Unterscheidung der Fettsäure-Distribution bei der jeweiligen Temperatur. Bei  $30\text{ °C}$  dominierten die verzweigten Fettsäuren 15:0 anteiso mit einem Anteil von 50 % und 15:0 iso mit einem Anteil von 20 %. Bei den restlichen Fettsäuren handelte es sich um gesättigte, gradkettige sowie verzweigte Fettsäuren. Diese Fettsäureprofile waren übereinstimmend mit bereits publizierten Daten der Spezies *S. xylosus* (O'DONNELL *et al.*, 1985; BECK *et al.*, 2004). Bei Temperaturreduktion äußerten sich die größten Änderungen in der Zunahme der Hauptfettsäure 15:0 anteiso auf circa 70 % Anteil und der Verschiebung der Anteile von der Fettsäure 15:0 iso hin zu 17:0 anteiso. Bei den gering vorhandenen Fettsäuren zeigte sich ein fast komplettes Verschwinden von gradkettigen Fettsäuren (Abb. 34). In Anbetracht der jeweiligen Schmelztemperaturen wird dabei deutlich, dass die Zellen durch diese Fettsäureverschiebung eine Verringerung der durchschnittlichen Schmelztemperatur der Zellmembran erreichen. Dies stimmt mit bekannten Anpassungsmechanismen an kalte Bedingungen überein (SUUTARI & LAAKSO, 1994). Dieser Zusammenhang wird durch die Reduktion der WAMT-Werte von  $37\text{-}39\text{ °C}$  bei mesophilen Temperaturen auf  $31\text{-}32\text{ °C}$  bei kalten Bedingungen (Tab. 13) ersichtlich. Die Fettsäure-abhängige Kälteadaptation war bei beiden getesteten Stämmen vergleichbar. Das Ausmaß der Fettsäuremodifikation, berechnet mit Hilfe der WAMT-Werte, war nahezu identisch mit einem  $\Delta\text{WAMT}$ -Wert von circa  $6,2\text{ °C}$

für den Stamm DSM 20266<sup>T</sup> und 6,5 °C für den Stamm J70. Im Rahmen der Carotinoid-inhibitionsversuche, mittels einer NaCl-Supplementation, wurden zur Kontrolle die Fettsäuredistributionen unter dem zusätzlichen Salzgehalt analysiert. Bei den beiden Hauptsäuren zeigten sich vergleichbare Werte zu den un-supplementierten Ansätzen. Geringe Unterschiede waren in den weiteren Nebenfettsäuren zu erkennen (Abb. 34). Betrachtet man die WAMT-Werte zeigte sich nur ein minimaler Unterschied der durchschnittlichen Anpassung der Membran bei einer Reduktion der Temperatur. Hierbei verringerte sich der  $\Delta$ WAMT-Wert auf 5,2 °C (Tab. 13).

Für *M. luteus* zeigte sich eine ähnliche Ausgangslage wie bei den Staphylokokken, wobei Fettsäureprofile für mesophile Temperaturen (30 °C bis 37 °C) beschrieben sind (WIESER *et al.*, 2002), aber keine Daten zu der Verschiebung bei Temperaturreduktion vorhanden waren. Bei beiden Stämmen setzten sich die Fettsäureprofile mindestens zu 80 % aus verzweigten Fettsäuren zusammen. Bei den restlichen Fettsäuren handelte es sich um gesättigte, gradkettige Fettsäuren und ungesättigten Fettsäuren (Abb. 43). Bei 30 °C Inkubationstemperatur zeigten die beiden untersuchten Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 deutlich unterschiedliche Fettsäuredistributionen auf. Für den Typstamm konnte, entsprechend vorheriger Publikationen, eine beinahe 1:1-Verteilung der beiden verzweigten Hauptfettsäuren 15:0 anteiso und 15:0 iso beobachtet werden. Bei Temperaturreduktion zeigte sich eine Verschiebung von 15:0 iso hin zu 15:0 anteiso, dessen Anteil auf circa 80 % anstieg. Weitere Zunahmen zeigten sich bei kürzeren Fettsäuren (14:0 iso) und den ungesättigten Fettsäuren 16:1 iso und 16:1 *cis* 9. Interessanterweise stieg bei kalten Bedingungen der Anteil der ungesättigten Fettsäuren nur minimal an, so erhöhte sich der Anteil von 16:1 *cis* 9 von 1,4 % auf 2,8 %. Anhand der geringen Beteiligung der ungesättigten Fettsäuren, konnte abgeleitet werden, dass die Kälteanpassung analog zu den Staphylokokken durch die Reduktion von gradkettigen Fettsäuren zu Gunsten von verzweigten Fettsäuren, insbesondere der anteiso-Verzweigung, erfolgt. Wie vorhin erwähnt, stellt dies einen bekannten Mechanismus der Kälteadaptation dar (SUUTARI & LAAKSO, 1994). Im Fall des Typstamm DSM 20030<sup>T</sup> resultierte der Fettsäureshift in deutlich unterschiedlichen WAMT-Werten für die entsprechenden Wachstumstemperaturen (Tab. 18). Dabei konnte eine stark ausgeprägte Fettsäureadaptation aus dem hohem  $\Delta$ WAMT-Wert von 12,1 °C abgeleitet werden. Der Stamm J3 zeigte ein interessantes Verhalten bezüglich seiner Fettsäureadaptation hinsichtlich der Temperaturbedingungen (Abb. 43). Das Profil bei 10 °C war dem Typstamm noch recht ähnlich und die Hauptfettsäure 15:0 anteiso war zu mehr als 70 % vertreten. Der Unterschied belief sich auf die Minorkomponenten, wobei im Vergleich

zum Typstamm eine höhere Betonung auf kurzen verzweigten Fettsäuren vorlag (Tab. 18). Dies resultierte in einem vergleichbaren WAMT-Wert von 28,0 °C. Die bei 30 °C inkubierten Kulturen des Stamms J3 zeigten jedoch nur eine sehr geringe temperaturabhängige Fettsäureverschiebung auf. Sodass die Fettsäure 15:0 anteiso mit 67 % noch immer stark dominant war und eher den Kälte-adaptierten Fettsäuredistributionen entsprach. Die mesophile Inkubationstemperatur konnte anhand der im Vergleich zu 10 °C erhöhten Fettsäuren 15:0 iso und 16:0 iso erkannt werden. Aufgrund der beschriebenen Fettsäureänderung des Stamms J3 betrug der  $\Delta$ WAMT-Wert nur 3,1 °C und indizierte eine deutlich geringe Fettsäure-abhängige Adaptation. Die deutlichen Unterschiede in der Fettsäureanpassung können zum einen aus der Herkunft der Stämme begründet sein. Der Stamm J3 wird mit gekühlten Lebensmitteln assoziiert und könnte dadurch eine Anpassung an niedrige Temperaturen erfahren haben. Zum anderen wurde der Typstamm bereits im Jahr 1973 in die entsprechende Stammsammlung (DSMZ) aufgenommen. Hierbei könnte eine Anpassung an höhere Temperaturen erfolgt sein. Weiterhin bildet die Spezies eine heterogene Gruppe ab, bei der eine weitere Unterscheidung in drei Biovare erfolgt (WIESER *et al.*, 2002; BUSSE, 2012). Diese unterscheiden sich in der Verwendung verschiedener Substrate, dem Hauptmenachinon und der Peptidoglycanvariation, was auch einen Grund für die unterschiedlichen Fettsäureprofile darstellen könnte.

Für beide Spezies zeigte sich eine hauptsächliche Anpassung, die durch die Reduktion gesättigter, unverzweigter Fettsäuren, iso-verzweigter Fettsäuren und langer Fettsäuren (> 15 C-Atomen) geprägt war. Dafür wurden kurze Fettsäuren (< 15 C-Atomen) und insbesondere anteiso-verzweigte Fettsäuren inkorporiert (SUUTARI & LAAKSO, 1994). Bis auf den Stamm DSM 20030<sup>T</sup> zeigten alle Stämme eine moderate bis geringe Ausprägung der Fettsäureadaptation an kalte Bedingungen, womit ein Hinweis auf weitere Fettsäureunabhängige Mechanismen gegeben war. Dies wurde insbesondere durch die Spezies *M. luteus* bestärkt. Denn diese Mikroorganismen sind in der Lage, wie es anhand der Fettsäuredistribution zu erkennen war, ungesättigte Fettsäuren zu bilden (Tab. 18). Diese zeichnen sich im Vergleich zu gleichlangen verzweigten Fettsäuren mit noch geringeren Schmelztemperaturen aus (Tab. 2; KNOTHE & DUNN, 2009). Im Fall von Stamm J3 nahm der Anteil der beiden detektierten ungesättigten Fettsäuren 16:1 iso und 16:1 *cis* 9 von 0,2 % bei 30 °C auf 1,7 % bei 10 °C zu und war somit bei der Adaptation der Membran zu vernachlässigen (Tab. 18).

### 4.2.4 Anpassung des Menachinongehaltes und der -zusammensetzung bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu mesophilen Bedingungen

Mit Hilfe der Modellorganismen *L. monocytogenes* und *P. glucanolyticus* konnte eine Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation gezeigt werden (Abschnitt 4.1; SEEL *et al.*, 2018). Dabei konnte festgestellt werden, dass eine geringere Ausprägung der Fettsäureadaptation durch eine Erhöhung des Menachinongehaltes bei niedrigen Temperaturen nicht nur kompensiert, sondern sogar die Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen verbessert werden kann. Anhand der Membran-Fluoreszenzmessungen konnte verdeutlicht werden, dass dieser Mechanismus analog zu der eukaryotischen Einlagerung von Sterolen funktioniert, bei dem der Phasenübergang der Membran verbreitert wird und somit eine Erhöhung der Membranfluidität unter kalten Bedingungen erreicht wird (Abschnitt 4.1). Für die beiden Carotinoid-haltigen Spezies sollte ein Einfluss dieser lipophilen Stoffe untersucht werden. Hierfür wurde zusätzlich zu der Carotinoidanalyse die Chinonanalyse (Abschnitt 4.1.5) durchgeführt, um zusammen mit der Fettsäurebestimmung einen Basiswert bestimmen zu können und folglich eine potentielle Carotinoid-abhängige Kälteadaptation besser beurteilen zu können.

Die Chinonanalyse in *S. xylosus* erfolgte bei 30 °C und 10 °C. Für beide Stämme und bei beiden Temperaturen konnten jeweils drei Chinon-spezifische Peaks registriert werden. Alle Peaks wiesen das identische Menachinon-spezifische Absorptionsspektrum mit den Peaks bei 248 nm, 261 nm, 270 nm und einem breiten Peak bei circa 325 nm auf (Abb. 35A). Die Identifikation erfolgte anhand der relativen Retentionszeit zum verwendeten Vitamin K<sub>1</sub>-Standard und der erstellten Datenbank bekannter isoprenoider Chinone. In allen Fällen handelt es sich hierbei um das Hauptchinon MK-7, das zu circa 90 % vertreten war. Die beiden geringen Chinone MK-6 sowie MK-8 waren ungefähr zu gleichen Teilen repräsentiert (Tab. 14). Eine minimale Änderung der Menachinonzusammensetzung bei Temperaturreduktion konnte in einer 1 bis 2-%-igen Verschiebung von MK-6 zu MK-8 beobachtet werden. Diese geringe Änderung sollte im Zusammenhang mit der Kälteadaptation keine nennenswerte Auswirkung zeigen. Bei den untersuchten Stämmen DSM 20266<sup>T</sup> und J70 zeigte sich jeweils eine circa 15 bis 20-%-ige Reduktion des Gesamtmenachinongehaltes bei Temperaturabsenkung, womit eine hauptsächliche Beteiligung einer Menachinon-abhängigen Kälteadaptation unwahrscheinlich erschien (Abb. 35B). In der Literatur wird MK-7 ebenfalls als das Hauptchinon in *S. xylosus* beschrieben (NAHAIE *et al.*, 1984, SCHLEIFER & BELL, 2009). Dabei detektierte NAHAIE *et al.*

(1984) für alle vier untersuchten *S. xylosus* Stämme MK-7 als Hauptchinon und konnte nur in einem Fall die Minorkomponente MK-8 nachweisen.

Wie bei der zuvor analysierten Fettsäurezusammensetzung, zeigte sich auch bei der isoprenoiden Chinonanalyse der beiden untersuchten Stämme DSM 20030<sup>T</sup> und J3 ein unterschiedliches Ergebnis (Tab. 19). Für den Typstamm wurden insgesamt acht verschiedene Peaks detektiert, wobei sieben Peaks bei 30 °C und vier Peaks bei 10 °C sichtbar waren. Alle Peaks zeigten dasselbe Absorptionsspektrum auf und konnten anhand dessen als Menachinone identifiziert werden (Abb. 44A). Bei beiden Temperaturen stellten MK-8 und MK-8(H<sub>2</sub>), mit einem kombinierten Anteil von mindestens 80 %, die Hauptmenachinone dar. Damit konnte, wie erwartet, der Typstamm dem Biovar I zugeordnet werden (WIESER *et al.*, 2002; BUSSE, 2012). Die weiteren Menachinone besaßen einen Anteil zwischen 2 bis 7 % (Tab. 19). Mit der Temperaturreduktion stieg der kombinierte Anteil der Hauptchinone auf circa 90 % und die Anzahl der Minorkomponenten reduzierte sich auf 4 %, dabei fielen die jeweils zwei lang- sowie kurzkettigsten Menachinone weg. Auch änderte sich das Verhältnis der Hauptchinone deutlich zu Gunsten von MK-8(H<sub>2</sub>). Für den Stamm J3 wurden über beide Temperaturen hinweg fünf verschiedene Peaks detektiert, die auch anhand des Absorptionsspektrums als Menachinon identifiziert werden konnten (Abb. 44A). Hierbei lag nur ein Hauptchinon (MK-8(H<sub>2</sub>)) mit einem Anteil von 80 % bei 30 °C und 87 % bei 10 °C, vor (Tab. 19). Dies deutete darauf hin, dass der Stamm J3 im Gegensatz zum Typstamm dem Biovar II oder III zugehörig ist. Dies könnte auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Fettsäure-Distributionen der beiden Stämme darstellen (Abschnitt 4.2.3). Die Minorkomponenten waren als zwei-beziehungsweise vierfach hydrierte Menachinone mit einer Seitenkettenlänge von 6 bis 9 C-Atomen charakterisiert und besaßen einen Anteil von jeweils 2 bis 8 %. Auch hier konnte anhand der qualitativen Änderung keine Kälteanpassung abgeleitet werden. Der Gesamtmenachinongehalt reduzierte sich bei niedrigen Inkubationstemperaturen im Vergleich zu 30 °C um ein Drittel (Abb. 44B). Daraus konnte geschlossen werden, dass isoprenoide Chinone auch in diesem Fall nicht hauptsächlich an der Fettsäure-unabhängigen Kälteanpassung beteiligt waren.

Bei beiden betrachteten Spezies konnten keine Hinweise auf eine hauptsächliche Beteiligung der Menachinone an einer potentiellen Fettsäure-unabhängigen Kälteanpassung ausgemacht werden. Für die untersuchten Stämme konnten die beschriebenen dominanten Menachinonspezies gezeigt werden. Aufgrund der Reduktion der Wachstumsrate (Abschnitt

4.2.1) und der einhergehenden abnehmenden Zellprozesse und Zellatmung bei niedrigen Temperaturen, konnte für alle Stämme die erwartete Reduktion des Menachinongehaltes bestätigt werden.

### **4.2.5 Anpassung des Carotinoidgehaltes und dessen Zusammensetzung bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu mesophilen Bedingungen**

Bei den Modellorganismen *S. xylosus* und *M. luteus* standen Carotinoide im Verdacht eine Fettsäure-unabhängige Kälteanpassung der Zellmembran zu ermöglichen. Nach der Extraktion der Carotinoide, die mit der verwendeten Methode vollständig erfolgte, wurde die chromatographische Auftrennung mittels HPLC erreicht. Es zeigte sich, dass eine C18-RP-Säule nicht in der Lage war die untersuchten Carotinoide bis zur Basislinie aufzutrennen, sodass keine verlässliche Quantifizierung erfolgen konnte. Als Detektor wurde in diesem Fall ein Dioden-Array Detektor verwendet, dessen gemessene Absorptionskurven auch keine eindeutige Identifizierung erlaubten. Diese Problematik konnte mit dem externen (U)HPLC System samt C30-RP-Säule und einem anschließenden Massenspektrometer (LC-MS) gelöst werden. Die höhere Auflösung gelang zum einen durch den höheren Druck (200 bar anstatt 100 bar) und der stärkeren Interaktion zwischen der stationären Phase und den Analyten. Dies wurde durch die längere Kohlenwasserstoff-Seitenkette der Säule erreicht. Wobei der höhere hydrophobe Charakter der C30-Säule eine stärkere Bindung der relativ unpolaren Carotinoide (das isoprenoide Grundgerüst) erlaubte, womit auch zwischen Isomeren unterschieden werden konnte (SHARPLESS *et al.*, 1996; BELL *et al.*, 1997). Extern wurde ein zweites HPLC-System, gekoppelt mit einem Dioden-Array-Detektor für die Quantifizierung verwendet.

Carotinoide bilden eine sehr umfangreiche und komplexe Gruppe von Verbindungen, deren Synthese, Strukturen und Lokalisation gut erforscht sind. Ihre Lokalisation und Ausrichtung innerhalb der Zellmembran hängt von ihrer Polarität sowie Konformation ab (MILON *et al.*, 1986; GRUSZECKI, 2004; Gruszecki & Strzałka, 2005). Carotinoiden werden mehrere Funktionen zugeschrieben. Hierzu gehören die Lichternte als Antennenpigmente in Photosynthesystemen (SIEFERMANN-HARMS, 1985; CROCE & AMERONGEN, 2014), die Reduktion von oxidativem Stress (DAHL *et al.*, 1989; ANWAR *et al.*, 1977) und sie können sogar als Virulenzfaktor fungieren, wie für *Staphylococcus aureus* gezeigt. (MISHRA *et al.*, 2011; KOSSAKOWSKA-ZWIERUCHO *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnte den Carotinoiden eine



weitere Funktion hinzugefügt werden. Die gewonnenen Daten deuten auf eine Funktion als ein weiterer Fettsäure-unabhängiger Kälteadaptationsmechanismus von Zellmembranen hin, ähnlich zu Sterolen in Eukaryonten.

Sowohl das Lebensmittel-Isolat Stamm J70 als auch der Typ DSM 20266<sup>T</sup> zeigten eine Pigmentierung erst bei 10 °C Wachstumstemperatur. Die Carotinoid-Quantifizierung zusammen mit der Transkriptomanalyse bestätigte, dass Carotinoide nur bei niedrigen Temperaturen gebildet wurden. Bei 30 °C Wachstumstemperatur lag die Carotinoidkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 µg/g<sub>Zelltrockengewicht</sub> für beide *S. xylosus*-Stämme. Kalte Inkubationsbedingungen führten zu einer starken Induktion der Carotinoidsynthese, was zu einem Gesamt-Carotinoidgehalt von 169 µg/g<sub>Zelltrockengewicht</sub> für Stamm J70 und einer 2,5-fach höheren Konzentration von 451 µg/g<sub>Zelltrockengewicht</sub> für Stamm DSM 20266<sup>T</sup> führte (Tab. 15). Höhere Erträge von Carotinoiden bei niedrigen Temperaturen wurden auch für Bakterien-Taxa, wie zum Beispiel *Micrococcus roseus* beschrieben (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997). Bei mindestens 85 % der nachgewiesenen Carotinoide handelte es sich um Staphyloxanthin oder um Staphyloxanthin-ähnliche Derivate. MS-Daten zeigten, dass sich die Staphyloxanthin-artigen Verbindungen zum Teil in der veresterten Fettsäure am Kohlenhydratrest unterscheiden haben. Die Staphyloxanthin-assoziierte Fettsäure wurde als 15:0 anteiso Fettsäure in *S. aureus* (PELZ *et al.*, 2005) beschrieben. Die Extraktionen der Zellen zeigten nur ein identifiziertes Vorläufermolekül des Staphyloxanthins. All-*trans*-4,4'-Diaponeurosporeat wurde als erste Verbindung eluiert. Danach folgte die Elution des ersten Staphyloxanthin-ähnlichen Moleküls\_1 mit einem identischen UV/Vis-Spektrum zum Staphyloxanthin. Aufgrund des geringen Anteils konnte nur eine enthaltene Fragment-Masse *m/z* 433 detektiert werden. Wegen der geringeren Retentionszeit könnte eine Staphyloxanthin-Verbindung mit einer kürzeren Fettsäure vermutet werden. An nächster Stelle folgte Staphyloxanthin mit einer Masse von *m/z* 819, was mit publizierten Werten übereinstimmt (KIM & LEE, 2012). Für das Staphyloxanthin-ähnliche Molekül\_2 konnte die Masse *m/z* 847 detektiert werden. Die Differenz zum Staphyloxanthin entspricht zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen. Das würde der zweithäufigsten Fettsäure 17:0 anteiso entsprechen. Die Variation der Acylkette wurde ebenfalls von KIM & LEE (2012) nachgewiesen. Das Staphyloxanthin-ähnliche Molekül\_3 zeigte ein Staphyloxanthin-spezifisches Absorptionsspektrum und enthielt das Fragment 443 *m/z*, welches 4,4'-Diaponeurosporeat entspricht. Die Gesamtmasse von *m/z* 949 lässt einen weitreichenderen Umbau vermuten, wobei der Masseunterschied zum Staphyloxanthin auf eine zweite Glycosylierung hindeutet. Das letzte Staphyloxanthin-ähnliche

Molekül\_4 zeigte ebenfalls ein UV/Vis-Spektrum wie Staphyloxanthin und besaß ebenfalls das Fragment  $m/z$  433, die Eluation erfolgte aber deutlich später und indizierte eine geringere Polarität. Aufgrund der geringeren Konzentrationen dieser Carotinoide konnte keine weitere Identifikation dieser Minorkomponenten erfolgen. Die detektierten *cis*-Isomere waren nur zu einem geringen Anteil vertreten und eluierten unmittelbar vor den entsprechenden *all-trans*-Verbindungen. Für diese Arbeit war die weiterreichende Identifizierung der Minorcarotinoide nicht notwendig.

Die drei Hauptcarotinoide in den beiden *M. luteus* Stämmen konnten eindeutig identifiziert werden. Wie erwartet, handelte es sich dabei um Sarcinaxanthin und die mono-beziehungsweise di-glucosylierten Derivate (NETZER *et al.*, 2010). Aufgrund der höheren Polarität der glucosylierten Verbindungen wurden diese zuerst eluiert (KAISER *et al.*, 2007). Nur für die 30 °C angezogenen Zellen konnten zwei unbekannte Carotinoide (Peak 4, 6) detektiert werden, deren Anteil zwischen 2 % und 6 % lag (Tab. 20). Hierbei lagen nur UV/Vis-Spektren vor, die keine Identifizierung zuließen. Aufgrund des Vorkommens bei höheren Temperaturen, waren diese nicht relevant für die Arbeit. Für den Stamm DSM 20030<sup>T</sup> wurde ein weiteres Carotinoid, dessen Anteil sich bei Temperaturreduktion von 3 % auf 10 % erhöhte, entdeckt. Der Vergleich des Absorptionsspektrums (Anhang 5) mit Literaturwerten legt den Schluss nahe, dass es sich hierbei um Sarcinen handelt (MATHEWS & SISTROM, 1960; KAISER *et al.*, 2007). Trotz der vorhandenen Pigmentierung bei 30 °C konnte eine weitere Zunahme bei Temperaturreduktion, welche leicht (+ 33 %) für den Typstamm und moderat-stark (+ 128 %) für Stamm J3 ausfiel, festgestellt werden. Bei beiden Stämmen zeigte sich eine Präferenz von stärker polaren Carotinoiden bei niedrigen Temperaturen. Insbesondere im Stamm J3 verdoppelte sich der Anteil des Sarcinaxanthin-di-Glycosids von circa 40 % auf 80 %. Die stärkere Auswirkung von polaren Carotinoiden auf die Membraneigenschaften wurde bereits in artifiziellen Vesikeln beobachtet (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996).

Für beide Modellorganismen konnte eine Zunahme des Carotinoidgehaltes bei niedrigen Temperaturen, welcher insbesondere für die *S. xylosus* Stämme prägnant ausfiel, nachgewiesen werden. Anhand der *M. luteus* Stämme konnte auch gezeigt werden, dass nicht nur der Gehalt erhöht wird, sondern auch die polarerer Verbindungen bevorzugt gebildet werden. Im Zusammenhang mit den bereits bekannten Erkenntnissen der Carotinoide und deren Einfluss auf artifizielle Membranvesikel wurde die Hypothese der Fettsäure-unabhängigen Membranadaptation durch Carotinoide weiterhin bekräftigt. Gewonnene Extrakte der beiden

*S. xylosus* Stämme aus der stationären Wachstumsphase zeigten eine höhere Konzentration an Carotinoiden im Vergleich zu der exponentiellen Phase auf (Daten nicht gezeigt). Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für Menachinone in *P. glucanolyticus* J12 beobachtet.

#### **4.2.6 Auswirkung der unterschiedlichen Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation auf die bio-physikalischen Parameter der Zellmembran**

Mit der Charakterisierung der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation (Abschnitt 4.2.3) und der Analyse der isoprenoiden Chinone (Abschnitt 4.2.4) war die Grundlage zur Bewertung der potentiellen Carotinoid-abhängigen Kälteadaptation gegeben. Wie zuvor wurde durch den Einsatz zweier Fluoreszenzfarbstoffe die Eigenschaften der Membranordnung und -fluidität untersucht (Abschnitt 3.3.5, 3.4.5). Hinsichtlich der Carotinoide vermutete bereits NES (1974), dass diese Stoffgruppe an der Kälteanpassung beteiligt sein könnte. So rückten in diesem Zeitraum insbesondere Carotinoid-produzierende antarktische Bakterien in den Fokus (JAGANNADHAM *et al.*, 1991; CHAUHAN & SHIVAJI, 1994; STRAND *et al.*, 1997). Später wurde diese Annahme spezifiziert und es wurde vermutet, dass Carotinoide in der Zellmembran lokalisiert sind, ähnlich zu eukaryotischen Sterolen, und dort die Eigenschaften der Membran beeinflussen (ROHMER *et al.*, 1978; MILON *et al.*, 1986, SUBCZYNSKI *et al.*, 1992; SOCACIU *et al.*, 2000). Im nächsten Schritt wurden Carotinoide extrahiert und ihr Verhalten *in vitro* in artifiziellen Lipidvesikeln untersucht. SUBCZYNSKI *et al.* (1992) zeigten, dass die Carotinoide die Membranfluidität oberhalb der Übergangstemperatur reduzierten und gleichzeitig eine fluidisierende Wirkung auf die Membran unterhalb der Schmelztemperatur hatten (Gruszecki & Strzałka, 2005). Ein Mechanismus der auch von Cholesterol bekannt ist (HAZEL, 1995; MOURITSEN & ZUCKERMANN, 2004). Der größte Einfluss auf die Membranfluidität wurde hauptsächlich durch polare Carotinoide beobachtet (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996).

Die *S. xylosus* Stämme DSM 20266<sup>T</sup> und J70 ermöglichten es aufgrund der einsetzenden Carotinoidsynthese bei kalten Bedingungen, den Zusammenhang von Carotinoiden (Abschnitt 3.3.4) und ihrer Auswirkung auf die Membranordnung sowie -fluidität an ganzen, intakten Zellen zu untersuchen. Verglichen mit den Daten der Menachinon-abhängigen Kälteadaptation, konnte bei der moderaten bis niedrigen Ausprägung der Fettsäureverschiebung (Abschnitt 3.3.2) von einer tatsächlich vorliegenden Carotinoid-induzierten Membranmodifikation

ausgegangen werden. Zur Bestimmung der Änderung der Membranordnung über ein definiertes Temperaturfenster wurde der Laurdan-GP-Verlauf bestimmt. Beide Stämme zeigten bei der Laurdan-GP-Messung ein vergleichbares Verhalten, obwohl die Graphen der jeweiligen Bedingungen in der y-Achse verschoben sind. Bei der Betrachtung der GP-Differenz ergibt sich ein identisches Bild (Abb. 38). Die 30 °C inkubierten Zellen ohne detektierbare Carotinoide zeigten eine deutliche Temperatur-abhängigkeit des GP-Wertes von der Messtemperatur. Die hohe Membranordnung bei niedrigen Messtemperaturen nahm stetig, fast linear mit zunehmender Messtemperatur ab. Die Carotinoide der 10 °C inkubierten Ansätze zeigten eine rigidisierende Wirkung auf die Zellmembran. Ausgehend von niedrigen Messtemperaturen konnten konstant hohe GP-Werte, bei Stamm J70 bis zu einer Temperatur von 30 °C und bei DSM 20266<sup>T</sup> bis zu 40 °C, gemessen werden. Der höhere Carotinoidgehalt des Typstamms korrelierte mit einem stärkeren Ordnungseffekt. Höhere Messtemperaturen führten zu einem langsamen Abfall der GP-Werte und damit zu einer Verringerung der Membranordnung. Die verfestigende Wirkung von Carotinoiden wurde zuvor auch für Zeaxanthin in künstlichen Lipidvesikeln beschrieben (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996). Dieses Verhalten stimmt auch mit früheren Berichten von HARRIS *et al.* (2002), SAENZ *et al.* (2012, 2015) und SEEL *et al.* (2018) überein. Hierbei wurde gezeigt, dass die Zellmembran durch die Einlagerung anderer membranassoziierter lipophiler Substanzen wie Cholesterol, Hopanoide und isoprenoide Chinone, unter Beibehaltung der lateralen Mobilität, stark geordnet und kondensiert wurden. Aufgrund der Struktur der Carotinoide und ihrer Lokalisation und Interaktion mit der Zellmembran, fiel dieser Effekt bei Carotinoiden deutlich stärker aus. Dabei können insbesondere polare Carotinoide die Membran wie eine Niete durchspannen und von den polaren Kopfgruppen über den hydrophoben Kern mit der gesamten Zellmembran interagieren. Dadurch erfolgt der stark ordnende Effekt auf die membranbildenden (Phospho-)Lipide (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996; Gruszecki & Strzałka, 2005).

Mit Hilfe der TMA-DPH-abhängigen Anisotropiemessungen konnte der Einfluss polarer Carotinoide auf die Membranfluidität in ganzen lebenden Zellen mit einer komplexeren Lipidzusammensetzung bestätigt werden (Abb. 39). Die Inkubation bei 30 °C inhibierte die Carotinoidsynthese und resultierte in einem vollständigen Phasenübergang beider Stämme, erkennbar an dem sigmoidalen Kurvenverlauf der gemessenen Anisotropie in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 40 °C. Dabei zeigten sich die charakteristischen konstanten Anisotropiewerte an den Grenzen des Messbereichs, die den vollständigen Phasenübergang der Biomembranen in den festen, geordneten Zustand (hohe Anisotropie) beziehungsweise in den

flüssigkristallinen, fluiden Zustand (niedrige Anisotropie), indizieren. Die bei 10 °C gewachsenen Kulturen mit hohem Carotinoidgehalt wiesen in beiden Stämmen einen stark verbreiterten Phasenübergang auf, erkennbar an dem flachen, nahezu linearen Verhältnis von TMA-DPH-Anisotropie und der Messtemperatur. Diese Carotinoid-spezifische Adaptation resultierte in deutlich fluideren Zellmembranen unterhalb von 20 °C und stabilisierte die Membranen oberhalb von 30 °C, sodass in diesem Fall die Membranfluidität geringer ausfiel. Die Änderung der Anisotropie mit einem Wert von 0,02 war für beide Stämme ungefähr gleich. Der Stamm DSM 20266<sup>T</sup> unterschied sich zum Stamm J70 durch seine durchschnittlich höheren Anisotropiewerte, welche durch den signifikant höheren Carotinoidgehalt begründet werden könnte. Dennoch war die Membranfluidität über den gesamten Temperaturbereich nahezu konstant (Abb. 39).

Die Messungen der Membraneigenschaften zeigten für die *M. luteus* Stämme Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zu den Ergebnissen der *S. xylosus* Stämme auf. Der größte Unterschied dürfte auf die vergleichsweise hohen Carotinoidkonzentrationen der *M. luteus* Stämme bei 30 °C Wachstumstemperatur zurückzuführen sein. Im Schnitt zeigten sich bei allen Ansätzen hohe GP-Werte. Diese indizierten eine durchschnittlich hohe Membranordnung, die auch aufgrund der hohen Carotinoidgehalte erwartet wurde (Abb. 47). Für den Stamm DSM 20030<sup>T</sup> zeigten sich für die 30 °C und 10 °C inkubierten Ansätze fast identische Verläufe der Membranordnung bis zu einer Messtemperatur von 30 °C. Darüber hinaus nahm die Membranordnung bei den 30 °C inkubierten Kulturen stärker zu als bei den 10 °C inkubierten Ansätzen. Dieser Unterschied bildete, wie erwartet, die Differenzen in der Fettsäurezusammensetzung und dem Carotinoidgehalt bei den jeweiligen Temperaturbedingungen ab. Der niedrigere Carotinoidgehalt bei 30 °C Wachstumstemperatur (Abschnitt 3.4.4) und die entsprechende Fettsäure-Distribution sollten in einer vergleichsweise geringeren Membranordnung resultieren. Der GP-Verlauf des Stamms J3, inkubiert bei 30 °C, zeigte die größte Änderung des GP-Wertes über den Messbereich auf und besaß demnach im Schnitt die geringste Membranrigidität der untersuchten *M. luteus* Ansätze. Auch hier begründet sich das Verhalten durch den niedrigsten detektierten Carotinoidgehalt (Tab. 20) und der geringen Adaptation mittels Fettsäureanpassung (Abb. 43).

Wie unter Abschnitt 4.2.5 gezeigt, zeichnete sich der Stamm J3 bei niedrigen Temperaturen durch den 80-%-igen Anteil des di-glucosylierten Sarcinaxanthins aus. Somit war in diesem Ansatz der Anteil des polarsten Carotinoid-Derivats, im Vergleich zu den anderen drei Ansätzen, doppelt so stark vertreten. Dadurch konnte die höchste ordnende Wirkung auf die

Membran unter den *M. luteus* Ansätzen erreicht werden. Dieses Verhalten steht im Einklang mit den zuvor publizierten Daten in artifiziellen Vesikeln. Hierbei wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Carotinoideauswirkung deutlich von der Polarität und somit mit von Interaktion mit den polaren Kopfgruppen der Zellmembran abhängt (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996). Die niedrigen absoluten GP-Werte dieses Ansatzes, als auch die deutlich stärkeren Abnahmen der GP-Werte über den Messbereich, im Vergleich zu den Carotinoid-haltigen *S. xylosus* Ansätzen, kann durch die Absorptionsspektren der jeweiligen Carotinoide begründet werden. Das Staphyloxanthin und die weiteren detektierten Carotinoide der *S. xylosus* Ansätze besitzen keine distinkten Absorptionsmaxima, sondern einen breiten Peak, wobei die Absorptionsintensitäten bei den relevanten Wellenlängen der GP-Wertberechnung in etwa gleich stark auftritt (Anhang 4). Falls das emittierte Licht der Fluoreszenzsonden von den Carotinoiden absorbiert wird, wird dadurch die Berechnung der GP-Werte nicht beeinflusst, da die Reduktion der Emission in den relevanten Wellenlängen zu gleichen Teilen auftreten. Die detektierten *M. luteus* spezifischen Carotinoide weisen hingegen einen distinkten Peak bei 420 nm und 438 nm auf und zeigen nahezu keine Absorption bei 500 nm. Dadurch wird der blaue Anteil der Laurdan-Emission reduziert und resultiert in geringen GP-Werten. Die deutliche Reduktion der absoluten GP-Werte vom J3 Ansatz bei niedrigen Temperaturen könnte darauf hinweisen, dass die Interaktion zwischen Fluoreszenzemission und der -absorption durch Carotinoide mit höherer Polarität begünstigt wird. Dabei könnten die endständigen Glucose-Reste aufgrund ihrer Polarität näher an der Sonde lokalisiert sein und somit die Abfangrate erhöhen. Die Carotinoid-bedingte Fluoreszenzabsorption wird durch die geringen Emissionsintensitäten der Carotinoid-haltigen Ansätze bekräftigt (Abschnitt 2.3).

Auf die Berechnung der Anisotropie wirkte sich dieser Zusammenhang deutlich geringer aus, da die Emissionsmessung nur bei einer Wellenlänge erfolgt (Abschnitt 2.3). Analog zu den *S. xylosus* Ansätzen, konnte auch für die *M. luteus* Ansätze eine starke Verbreiterung des Phasenüberganges gemessen werden. Das resultierte in hohen Membranfluiditäten für alle *M. luteus* Stämme bei niedrigen Temperaturen. Die Änderung der Anisotropie fiel für beide untersuchten Stämme sehr gering aus (Abb. 48), wobei die geringste Änderung für den Stamm J3, der bei niedrigen Temperaturen inkubiert wurde, zu verzeichnen war. Auch in diesem Fall zeigte sich der stärkere Einfluss von Carotinoiden mit höheren Polaritäten. Anhand der Anisotropieverläufe konnte auch die unterschiedliche Ausprägung der Fettsäureadaptation bestätigt werden. Der Typstamm zeigte im Vergleich zum Stamm J3 eine deutlich stärkere Ausprägung der Fettsäure-abhängigen Kältemodifikation (Tab. 18). Dies war in der größeren

Differenz der Anisotropiewerte (Verschiebung entlang der y-Achse) der jeweiligen Stämme mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur sichtbar.

Sowohl die Membranfluidität als auch die Membranordnung wurden durch hohe Carotinoidkonzentrationen stark verändert (Abschnitt 3.3.5, 3.4.5) und besaßen einen positiven Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zelle nach Frost-Tau-Belastung (Abschnitt 4.2.2). Dabei konnte eine deutliche Korrelation zwischen dem Carotinoidgehalt und der Membranordnung sowie -fluidität gezeigt werden. Beide untersuchten Mikroorganismen produzierten polare Carotinoide, die eine stark ordnende Wirkung auf die Membran besaßen, aber gleichzeitig den Phasenübergang sehr stark verbreiterten. Dadurch erlangten die Zellmembranen dieser Stämme eine stark fluide Membran bei niedrigen Temperaturen, obwohl zum Teil nur geringe bis moderate Adaptationen mittels der Fettsäureverschiebung stattgefunden haben.

#### 4.2.7 Auswertung der differentiellen Transkriptomanalyse

Entsprechend Abschnitt 2.4.4 wurde auch für die Carotinoid-produzierenden Mikroorganismen eine differentielle Transkriptomanalyse durchgeführt. In diesem Fall sollte eine kontrollierte Regulierung der Carotinoidsynthese bei Temperaturreduktion in den untersuchten Bakterien analysiert werden. Hier wurde für eine signifikante Änderung der Expression eine 2-fache Änderung der jeweiligen Gene vorausgesetzt.

Das zur Genkartierung assemblierte Genom von *S. xylosus* J70 hatte eine Gesamtgröße von 2,8 Mb und einen GC-Gehalt von 32,7 %. Diese Genomparameter sind vergleichbar mit anderen bereits veröffentlichten *S. xylosus* Stämmen. Dabei wurde festgestellt, dass das Genom von untersuchten *S. xylosus* Stämmen signifikant variiert und Größen zwischen 2,8 bis 3,2 Mb vorliegen können (DORDET-FRISONI *et al.*, 2007a). Diese genomische Varianz wird auch in der großen vermuteten Spanne des GC-Gehalts von 30 bis 36 % für *S. xylosus* sichtbar (DORDET-FRISONI *et al.*, 2007b). Anhand der Genomsequenz des Typstamms DSM 20266<sup>T</sup> konnte die Spezieszugehörigkeit des Stamms J70 zu *S. xylosus* mit 98,0 % verifiziert werden (Abschnitt 3.5). Nach der Transkriptomanalyse wurden 2584 einmalige Gene identifiziert, wovon jeweils circa 20 % der Gene hochreguliert beziehungsweise herunterreguliert wurden. Der kombinierte

Anteil von 40 % ist vergleichbar mit der Änderung der Expression von *S. xylosus* in einem Fleischmodell bei dem ein osmotischer Stress vorlag (VERMASSEN *et al.*, 2016). Im Vergleich dazu wurde für *S. xylosus* bei einem nitrosativem Stress, verursacht durch reaktive Stickstoffspezies, nur eine Änderung von 24 % die Gene beobachtet (VERMASSEN *et al.*, 2014).

Es konnte eine Kälteinduktion der Carotinoidsynthese mit Hilfe der differentiellen Transkriptomanalyse, bei der eine Hochregulation der Carotinoidsynthese-beteiligten Gene gemessen werden konnte, bestätigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Carotinoidkonzentration ein Teil der kontrollierten Reaktion auf niedrige Wachstumstemperaturen ist (Tab. 16). Im Durchschnitt wurde eine Vervierfachung der Transkription der entsprechenden *crtOPQMN*-Gene beobachtet. Diese Gene sind an der Carotinoidsynthese beteiligt und waren in einem zusammenhängenden Operon organisiert, der auch für andere *Staphylococcus* Spezies, wie zum Beispiel in *S. aureus*, vorzufinden ist und somit einen konservierten Bereich darstellt (PELZ *et al.*, 2005). Die spezifischen Reaktionsschritte für die jeweiligen Enzyme sind für *S. aureus* ausführlich beschrieben. Zunächst katalysieren die Enzyme CrtM und CrtN die Bildung des ersten gelb gefärbten Pigments 4,4'-Diaponeurosporeat Kondensation von zwei Farnesyldiphosphatmolekülen und nachfolgende Dehydrierungsschritte (Wieland *et al.*, 1994). Die Enzyme CrtP, CrtQ und CrtO sind an den nachfolgenden Oxidations-, Glykosylierungs- und Veresterungsschritten zur Bildung des endgültigen Pigments Staphyloxanthin beteiligt (PELZ *et al.*, 2005). Das postulierte sechste Gen *aldH*, das an der Carotinoidsynthese beteiligt sein soll, konnte in der erhaltenen Genomsequenz dieser Arbeit nicht eindeutig identifiziert werden (KIM & LEE, 2012). Der Kältestress der Zellen wurde zusätzlich durch erhöhte Expressionen der Betain-Synthesegene und des Kälteschockproteins A (CspA, Tab. 16) sowie durch die reduzierte Expression von Hitzeschockproteinen veranschaulicht. Der relativ geringe Anstieg der Expressionsrate von *cspA* könnte durch eine mögliche Erhöhung der Proteinstabilisierung bei niedrigen Temperaturen und damit der Induktion basierend auf einer erhöhten mRNA-Halbwertszeit erklärt werden (TANABE *et al.*, 1992; GUALERZI *et al.*, 2003). Die einzelnen Gene der Betain-Synthese wurden bei niedrigen Temperaturen 4 bis 21-fach stärker induziert. Verschiedene Publikationen bestätigen eine wichtige Rolle kompatibler gelöster Stoffe im Rahmen der Kälteadaptation bei mesophilen Bakterien (KANDROR *et al.*, 2002; WEMEKAMP-KAMPHUIS *et al.*, 2004; Özcan *et al.*, 2007). Hitzeschockproteine sind oft Chaperone, die eine korrekte Faltung von Hitze-geschädigten Proteinen erleichtern. Zwei dieser wichtigsten Proteinfaltungsmechanismen (GroEL/ES und DnaK/J) zeigten eine mittlere bis starke



Reduktion der entsprechenden Gene (Tab. 16; FEDER & HOFMANN, 1999). Dies verdeutlicht auch ein mögliches Energieeinsparpotenzial bei der Instandhaltung der Zellprozesse durch effizientere Biosynthese, das auch bei niedrigen Temperaturen zu besseren Zellausbeuten führen könnte (MARGESIN, 2009; SEEL *et al.*, 2016). Das Phänomen des erhöhten Zellertrages bei niedrigen Temperaturen wurde auch für einige der in dieser Arbeit verwendeten Stämme gezeigt (Abschnitt 4.1.1, 4.2.1). Insgesamt konnten wir keine signifikanten Veränderungen der Expressionsrate von Genen, die an der Menachinonsynthese beteiligt sind, beobachten (BOERSCH *et al.*, 2018). Dies entsprach den geringfügigen Änderungen des Menachinongehaltes bei verschiedenen Wachstumstemperaturen (Abb. 35B).

Das erstellte Genom des *M. luteus* Stamms J3 besaß eine Länge von 3,0 Mb und einen GC-Gehalt von 72,7 %. Für die Spezies selbst wird ein hoher GC-Gehalt im Bereich von 69 % bis 76 % postuliert (BUSSE, 2012). Einen besseren Vergleich bot die Publikation von ROKEM *et al.* (2011) bei der das Genom des *M. luteus* („Fleming“) Stamms NCTC 2665 untersucht wurde. In diesem Fall konnte ein identischer GC-Gehalt von 73 % bestimmt werden, wobei die Genomgröße, im Vergleich zum Genom des Stamms J3, mit 2,5 Mb circa 17 % kleiner ausfiel. Anhand der Genomsequenz des Typstamms DSM 20030<sup>T</sup> konnte die Spezieszugehörigkeit des Stamms J3 zu *M. luteus* mit 97,3 % verifiziert werden (Abschnitt 3.5). Von den 2823 vorhergesagten Genen für Stamm J3 wurden 9 % der Gene hochreguliert und 4 % der Gene herunterreguliert. Der kombinierte Anteil von 13 % zeigte unter allen untersuchten Stämmen und den zuvor genannten Publikationen mit Abstand den niedrigsten Anteil (VERMASSEN *et al.*, 2014; VERMASSEN *et al.*, 2016). Das könnte ein Indiz für eine stärkere Anpassung dieses Stammes an niedrige Temperaturen darstellen.

Trotz der Verdopplung des Carotinoidgehaltes des Stamms J3 unter kalten Bedingungen konnte keine signifikante Expressionszunahme der entsprechenden Gene der Sarcinaxanthinbiosynthese festgestellt werden. Wie zuvor bei den Staphylokokken waren die einzelnen Gene in einem Operon organisiert (Tab. 21). Eine signifikante Expressionssteigerung für das *crtX*-Gen (Gen-ID 1820), kodierend für eine C50-Carotinoid Glucosyltransferase, bestätigte die Verdopplung des di-glucosylierten Sarcinaxanthins des Stamms J3 bei niedrigen Temperaturen (Tab. 20). Direkt anschließend an das letzte Gen des Carotinoid-Operons wurde eine putative Nukleosid-di-Phosphat-Zucker Epimerase mit einer deutlichen Expressionssteigerung identifiziert. Es ist anzunehmen, dass diese Epimerase die Umwandlung der spezifischen Carotinoid-Zucker gewährleistet. Somit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des Anteils an polaren Carotinoiden ein Teil der kontrollierten Reaktion an niedrige

Wachstumstemperaturen darstellt. Der Biosyntheseweg für das  $\gamma$ -zyklische Sarcinaxanthin in *M. luteus* wurde von NETZER *et al.* (2010) beschrieben. Das Vorläufer-Molekül Farnesylpyrophosphat (C15-Körper) wird mit Hilfe von CrtE um eine Isopreneinheit erweitert, sodass Geranylgeranylpyrophosphat entsteht (C20-Körper). Anschließend werden zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat durch CrtB zu Phytoen (C40-Körper) verbunden. Durch die Phytoen-Desaturase CrtI wird aus Phytoen Lycopin gebildet, das erste farbige Zwischenprodukt. Anschließend erfolgt ein zweiter Elongationsschritt, wobei durch CrtE2 über Nonaflavuxanthin (C45-Körper) Flavuxanthin (C50-Körper) gebildet wird. Die Gene *crtYg* und *crtYh* kodieren für Proteine, die nur gemeinsam die Zyklisierung von Flavuxanthin zu Sarcinaxanthin katalysieren. Im letzten Schritt erfolgt die Glucosylierung zum mono-beziehungsweise di-glucosyliertem Sarcinaxanthin. Der Kältestress der Zellen konnte in diesem Fall nicht anhand von signifikanten Expressionsänderungen bestätigt werden. Es konnte eine leichte Expressionssteigerung für das Kälteschockprotein kodierende Gen *cspA* und eine leichte Reduktion von Genen kodierend für verschiedene Hitzeschutzproteine detektiert werden (Tab. 21). Die nicht signifikante Expressionszunahme könnte auch in diesem Fall durch die Stabilitätszunahme unter kalten Bedingungen zusammenhängen (TANABE *et al.*, 1992; GUALERZI *et al.*, 2003). Die Biosynthese der Menachinone erfolgte in *M. luteus* nach dem *men*-Syntheseweg (BOERSCH *et al.*, 2018). Für einzelne Gene der Menachinonsynthese konnte eine signifikante Reduktion der Expressionsrate beobachtet werden, was mit der moderaten 30-%-igen Abnahme des Menachinongehaltes unter kalten Bedingungen übereinstimmt.

#### 4.2.8 Verifikation der Carotinoid-induzierten Verbesserung der Membranfluidität mittels Supplementationstests

Um den Einfluss des Carotinoidgehaltes auf die Regulation der Membranfluidität und die Kälteresistenz zu bestätigen, wurde die Carotinoidsynthese in *S. xylosus* J70 bei niedrigen Temperaturen inhibiert. In einem ersten Ansatz wurde eine Inhibition der Carotinoidsynthese durch Diphenylamin (DPA)-Supplementierung nach HAMMOND & WHITE (1970) vorgenommen. Hiermit konnten erfolgreich nicht-pigmentierte Zellen mit einer DPA-Konzentration von 74  $\mu\text{M}$  produziert werden. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als ungeeignet, da sich DPA in der Zellmembran akkumulierte und somit die Membraneigenschaften erheblich veränderte (Daten nicht gezeigt). Alternativ wurde von der Arbeitsgruppe CHEN *et al.* (2017) ein *S. aureus* spezifischer CRISPR/CAS-Vektor angefragt. Hiermit sollte, entweder mit einer Deletion oder einem Gens-*silencing* der Carotinoidsynthese, eine Reduktion des Carotinoidgehaltes erfolgen. Nach dessen Erhalt wurden Anpassungen des Vektors an die Spezies *S. xylosus* und dem zu unterdrückenden *crtM*-Gen der Carotinoidsynthese vorgenommen. Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Masterarbeit vorgenommen (SONS, 2018). Dabei konnte erfolgreich der Deletions- und *Silencing*-Vektor erstellt werden. Jedoch konnte keine zielführende Elektroporation vorgenommen werden. Dabei wurden publizierte Elektroporationsprotokolle und eigene Protokolle verwendet.

Parallel dazu wurde eine Unterdrückung der Carotinoidsynthese durch NaCl-Supplementierung getestet, wie sie für die Spezies *Arthrobacter agilis* MB813 von FONG *et al.* (2001) beschrieben wurde. Mit einer 5-%-igen NaCl Supplementierung konnte im Stamm J70 eine vollständige Inhibition der Carotinoidsynthese erreicht werden, sodass unpigmentierte Zellen geerntet werden konnten. Die Carotinoidkonzentration hierfür befand sich unterhalb des Detektionslimits. Für den Stamm DSM 20266<sup>T</sup> konnte eine vollständige Hemmung nur oberhalb von 10 % NaCl beobachtet werden. Diese Konzentration hatte jedoch einen negativen Einfluss auf die Wachstumsraten, sodass für die Verifikation die Supplementierung des Stammes J70 mit 5 % NaCl gewählt wurde. Dieser Stamm zeigte keine Abnahme der Wachstumsraten bei einer 5 % NaCl-Zugabe und einen vollständigen Verlust der Pigmentierung. Der Mechanismus hinter der NaCl-abhängigen Inhibition der Carotinoidsynthese ist zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Trotz der näheren Verwandtschaft von *Arthrobacter agilis* zu *M. luteus* konnte in diesem Fall keine Reduktion der Carotinoidbildung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von NaCl hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Fettsäureprofil, das sich aus den WAMT-Werten ableiten lässt (Tab. 13). Die Sonden-

abhängigen Messdaten zeigten, dass die Membranfluidität sowie die Membranordnung der bei 10 °C gewachsenen unpigmentierten Kulturen nahezu identisch mit den bei 30 °C gewachsenen Kulturen waren (Abb. 40). Kulturen, die bei 30 °C mit und ohne NaCl-Ergänzung inkubiert wurden, zeigten keinen Einfluss des Salzstresses auf die Membranparameter. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die beobachteten Auswirkungen auf die Membraneigenschaften tatsächlich durch den Carotinoidgehalt der Zellen verursacht wurden.

### **4.3 Gegenüberstellung und Zusammenfassung der beiden untersuchten lipophilen Stoffgruppen als Fettsäure-unabhängige Modifikatoren der Zellmembran**

In dieser Arbeit wurde untersucht ob Bakterien kontrolliert den Gehalt an zelleigenen lipophilen Verbindungen erhöhen können, um somit eine Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran zu induzieren. Aufgrund verschiedener Hinweise früherer Publikationen standen die Stoffgruppen der isoprenoiden Chinone und Carotinoide im Fokus (Abschnitt 1.3). Zwar zeigte SÁENZ *et al.* (2012, 2015), dass bakterielle Hopanoide ein funktionelles Cholesterol-Analogon in bakteriellen Membranen darstellen können, jedoch wurde nur der ordnende Effekt und die Bildung des L<sub>o</sub> Phasenzustandes gezeigt. Eine Beteiligung der Hopanoide an der Membrananpassung an niedrige Temperaturen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Weiterhin konnten in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Lipski keine Hopanoide, unabhängig von der Wachstumstemperatur, bei den genannten Modellorganismen detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den vorhandenen Daten aus der Literatur (KUCHTA *et al.*, 1998). Weiterhin wurden Hopanoide bei einem *Bacillus cereus* und *Rhodococcus erythropolis* Isolat bei 30 °C Wachstumstemperatur detektiert, deren Konzentration sich bei 10 °C stark reduzierte beziehungsweise nicht mehr detektierbar war (MEYER, 2011). Als Referenzorganismus für die Hopanoidbestimmung wurde *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446 untersucht (BRINGER *et al.*, 1985; ŘEZANKA *et al.*, 2010). Bei diesem thermophilen Organismus konnten Hopanoide bei 70 °C Wachstumstemperatur aber nicht bei 50 °C detektiert werden. Die Auswirkung der Hopanoide auf die Membran wurde *in vitro* und in *Methylobacterium extorquens* bereits gezeigt (SÁENZ *et al.*, 2012; SÁENZ *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit der Reduktion der Temperaturen eine starke bis vollständige Reduktion des Hopanoidgehaltes erfolgte. Folglich könnte eine verstärkte Hopanoideinlagerung eine Fettsäure-unabhängige Membranadaptation bei thermophilen

Mikroorganismen beziehungsweise bei Temperaturen über 30 °C darstellen. Gleichzeitig bedeutet dies, dass im Zusammenhang mit der hier untersuchten Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation der Kälte-toleranten mesophilen Bakterien, Hopanoide keine Relevanz für diese Arbeit besitzen.

#### 4.3.1 Isoprenoide Chinone

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand zeigt diese Arbeit zum ersten Mal die Beteiligung von isoprenoiden Chinonen an der Anpassung der Membranfluidität in ganzen lebenden Zellen (Abschnitt 4.1). Innerhalb der *L. monocytogenes* Stämme konnten Stamm-spezifische Unterschiede in der Menachinonkonzentration bei niedrigen Temperaturen gezeigt werden. Diese korrelierten stark mit den unterschiedlichen Ausprägungen der Fettsäureanpassung (Abb. 17). Ein anderer Zusammenhang zeigte sich bei *P. glucanolyticus* J12. Die Verdopplung des Menachinongehaltes trat erst in der stationären Phase, die mit einer starken Reduktion der Fettsäuremodifikation einherging, auf (Abb. 26B, Tab. 10). Folglich korrelierten in beiden Fällen auch die beiden Mechanismen der Membrananpassung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die höhere Einlagerung der isoprenoiden Chinone die geringe Fettsäure-abhängige Modifikation kompensieren kann. Anhand der Wachstumsraten und des Gefrier-Auftau-Stresstestes konnten keine Unterschiede in der Qualität der verschiedenen Kombinationen der Fettsäure-abhängigen sowie Menachinon-abhängigen Modifikation ausgemacht werden (Abschnitt 4.1.1, 4.1.3).

Mit Hilfe der Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen konnten deutliche Vorteile der Membraneigenschaften durch die höhere Einlagerung von Menachinonen bei niedrigen Temperaturen gemessen werden (Abschnitt 4.1.6). Weiterhin konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Verbesserung der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen durch die Induktion der Fluid-geordneten Membranphase ( $L_o$ ) erfolgte. Dieser Vorgang war analog zu der bekannten Induktion der  $L_o$ -Phase durch Inkorporation von Cholesterol in eukaryotischen Zellen (1.2). Dies äußerte sich in der hohen Membranordnung und der gleichzeitigen Gewährleistung einer hohen Membranfluidität (Abschnitt 1.2, 4.1.6). Anhand einzelner FAME-Quantifizierungen konnten abgeleitet werden, dass isoprenoide Chinone 1-2-%-ig in der Membran vorliegen. Damit erfolgte eine stärkere Ausprägung der Induktion der  $L_o$ -Phase in ganzen Zellen im Vergleich zu artifiziellen Lipidvesikeln (Abb. 50; ASAI, 2000). Eine

Erklärung wäre durch den komplexeren Aufbau der Zellmembran samt Proteinen und anderen lipophilen Verbindungen, die den ordnenden Effekt verstärken könnten, gegeben. Hierdurch wird aber auch verdeutlicht, dass Messungen an artifiziellen Vesikeln einen Anhaltspunkt darstellen, aber nicht die Messungen an dem originalen System ersetzen können. Der Zusammenhang zwischen Menachinongehalt und der Cholesterol-ähnlichen Auswirkung auf die Membraneigenschaften konnte mit Hilfe eines Inhibitionsversuches verifiziert werden (Abschnitt 4.1.8).

Für beide Spezies konnte eine Transkriptomanalyse durchgeführt werden, bei der anhand verschiedener Gene der Kälte-Stress detektiert werden konnte. Eine relevante Steigerung der Expressionsrate der Gene, kodierend für die Menachinonbiosynthese, konnte nur für *P. glucanolyticus* J12 festgestellt werden. Die geringe Expressionssteigerung von *L. monocytogenes* FFH könnte durch die geringere Differenz der Menachinonkonzentration zu den mesophil-temperierten Ansätzen bedingt werden. Hier zeigte sich im Gegensatz zum Stamm J12 nur eine halb so hohe Änderung der Menachinonkonzentration (Abschnitt 4.1.5). Die Reduktion der ungesättigten Fettsäure 16:1 *cis* 5 in *P. glucanolyticus* J12 von der exponentiellen zur stationären Phase bei kalten Bedingungen konnte auch anhand der Transkriptomdaten gesehen werden (Tab. 10). Die Fettsäure-spezifische Desaturase wies eine 2,8-fache Reduktion, sogar im Vergleich zu den 30 °C Ansätzen, bei denen diese ungesättigte Fettsäure nur einen Anteil von 1 % besaß, auf (WEBER *et al.*, 2001; BERANOVÁ *et al.*, 2010). Es kann angenommen werden, dass zur stationären Phase eine kontrollierte Regulation der beiden Membrananpassungsmechanismen erfolgt, bei der die Fettsäure-abhängige Anpassung reduziert und vermehrt Menachinon inkorporiert wird. Für eine endgültige Beurteilung müsste zusätzlich die Expression bei 10 °C in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt werden.

Auch wenn anhand der Wachstumsraten und des Gefrier-Auftau-Stresstest kein Unterschied festgestellt werden konnte, so verdeutlicht diese kontrollierte Regulation, dass ein Nutzen in der Menachinon-abhängigen Membranadaptation vorliegen dürfte. Für Organismen mit einer Anpassungsfähigkeit an einen breiten Wachstumstemperaturbereich wie in *L. monocytogenes*, kann darin eine Begründung vorgefunden werden. Weiterhin liefert die Zunahme des Menachinongehaltes zur stationären Phase einen Hinweis auf eine Verbesserung der Zellfitness der bereits aufgebauten Zellbiomasse, bei der die optimale Membranfluidität durch die Induktion des L<sub>o</sub>-Membranzustandes von Temperaturschwankungen weniger beeinträchtigt ist. Ebenfalls entfällt die Energie-intensive *de novo* Synthese der verzweigten Fettsäuren und der

entsprechenden Lipide, die insbesondere in der stationären Phase und der einhergehenden stark reduzierten Teilungsrate einen negativen Einfluss hätte.

Es wurde bereits erwähnt (Abschnitt 1), dass Psychrotolerante und Kälte-tolerante Mesophile hauptsächlich terrestrische Habitate bewohnen (BÖLTER, 2004; HELMKE & WEYLAND, 2004) und diese ständigen Temperaturschwankungen unterworfen sind. Diese könnten aufgrund der großen Temperaturbereiche, in denen eine optimale Membranfluidität vorliegt, kompensiert werden. Entsprechendes gilt für gekühlte Lebensmittel, die bis zu ihrem Verzehr ebenfalls ständigen Temperaturschwankungen unterzogen sind. Für die Listerien könnte sich dieser Zusammenhang auch auf ihre Virulenz auswirken. Die genannten Vorteile der L<sub>o</sub>-Phase könnte die Abwehr gegen das Immunsystem verbessern und somit die Infektion begünstigen (LIU *et al.*, 2005). Weiterhin zeigte Chen *et al.* (2017), dass für das cytosolische Überleben von *L. monocytogenes* das MK-Intermediat DHNA und nicht das vollständige Menachinon essentiell war. Dadurch wurde gezeigt, dass die respiratorische Funktion hierfür nicht gebraucht wurde. Dies stellt nur eine abgeleitete Vermutung dar, die separat untersucht werden müsste. In diesem Zusammenhang zeigte sich eine interessante Verbindung: Den Typstamm DSM 20600<sup>T</sup> ausgeschlossen, besaßen die präsumtiven Stämme des Serovars 4b die durchschnittlich höchsten Menachinonkonzentrationen. Gleichzeitig wurde in mehreren Studien gezeigt, dass in humanen Listeriose-Ausbrüchen hauptsächlich Stämme des Serovars 4b isoliert worden sind (FARBER & PETERKIN, 1991; BUCHRIESER *et al.*, 1993; DOUMITH *et al.*, 2004a; EVANS *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2004). Und dass Lebensmittel-prävalente *L. monocytogenes* Stämme meistens das Serovar 1/2a beinhalten, aber deutlich seltener bei humanen Listerioseausbrüchen detektiert werden, obwohl der häufigste Infektionsweg über kontaminierte Lebensmittel erfolgt.

#### 4.3.2 Carotinoide

Nach dem jetzigen Kenntnisstand zeigt diese Arbeit zum ersten Mal die Veränderung der Membranfluidität und Membranordnung in lebenden Zellen durch Erhöhung des Carotinoidgehaltes der Zelle (Abschnitt 4.2). Hierdurch wurde die Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen verbessert und steht im Einklang mit früheren Erkenntnissen in künstlichen Liposomen (Abschnitt 1.3.2). Zwar wurde die Auswirkung von Carotinoiden auf

Biomembranen mit Hilfe artifizieller Vesikel untersucht, aber eine vermutete Verbindung mit der Kälteadaptation (NES, 1974) wurde nicht *in vivo* untersucht. Für beide untersuchten pigmentierten Spezies *S. xylosus* und *M. luteus* konnte eine deutliche Zunahme der Carotinoid-Inkorporation beobachtet werden. Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Hypothese, ob hierdurch nun eine Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran erfolgen könnte, wie sie zuvor für Menachinone gezeigt worden ist (Seel *et al.*, 2018).

Um die Carotinoid-abhängige Membranmodifikation korrekt zu deuten, wurde auch in diesem Fall eine Chinonanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in beiden Spezies der Menachinongehalt sich leicht bis moderat reduzierte und somit keine kontrollierte Menachinon-abhängige Kälteadaptation zu erwarten war (Abschnitt 4.2.4). Das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Anpassung konnte auf Basis der vorherigen  $\Delta$ WAMT-Ergebnisse als stark (*M. luteus* DSM 20030<sup>T</sup>) moderat (beide *S. xylosus* Stämme) und gering (Stamm J3) eingeordnet werden (Abschnitt 4.2.3). Insbesondere für die Staphylokokken konnte aufgrund der fehlenden Pigmentierung bei 30 °C eine starke Zunahme der Carotinoidsynthese beobachtet werden (Abschnitt 4.2.5). Der Stamm J3 zeichnete sich durch einen hohen Anteil an glucosylierten Carotinoiden aus, wobei die Temperaturreduktion eine Zunahme des polarsten Carotinoids Sarcinaxanthin-Diglucosid auf 80 % zur Folge hatte (Abschnitt 4.2.5). Die Priorisierung von polaren Carotinoiden könnte mit der stärkeren Auswirkung von polaren Carotinoiden auf die Membraneigenschaften (GABRIELSKA & GRUSZECKI, 1996) zusammenhängen. So zeigte ZAKAR *et al.* (2017), dass der Anteil von Xanthophyll im Vergleich zu  $\beta$ -Carotin in einem Cyanobakterien-Stamm, der keine mehrfach ungesättigten Lipide bilden konnte, mit Temperaturreduktion zunahm. Dieser Zusammenhang wurde durch die geringe Ausprägung der Fettsäure-abhängigen Adaptation in Stamm J3 sichtbar. Bei den gebildeten Hauptcarotinoiden der beiden untersuchten Spezies handelt es sich um polare Xanthophylle, bei denen eine starke Auswirkung auf die Membraneigenschaften erwartet wird. Dies begründet sich durch die Orientierung und Interaktion von Xanthophyllen und der Zellmembran im Vergleich zu Carotinen (MILON *et al.*, 1986, GRUSZECKI, 2004).

Mit den Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen und der daraus resultierenden Bestimmung der Membranparameter-Ordnung sowie Fluidität konnte eine deutliche Veränderung der Membraneigenschaften festgestellt werden. Es wurde wiederum eine Cholesterol ähnliche Membranmodifikation festgestellt, bei der die L<sub>o</sub>-Phase induziert wurde. Aufgrund der stärkeren Interaktion der hier untersuchten Carotinoide konnte im Vergleich zu der



Menachinon-abhängigen Membranmodifikation eine stärkere Rigidisierung und Kondensierung der Membran beobachtet werden (Abb. 38 und 47). Gleichzeitig konnte bei niedrigen Temperaturen eine hohe Membranfluidität gemessen werden. Die verstärkte Inkorporation der Carotinoide hatte eine starke Verbreiterung des Phasenüberganges zur Folge, der sich durch eine gleichbleibende Membranfluidität über einen Temperaturbereich von 55 °C auszeichnete (Abschnitt 4.2.6).

Mit Hilfe der Transkriptomanalyse konnte auch für *S. xylosus* J70 eine starke Expressionszunahme der entsprechenden Gene für die Carotinoidbiosynthese gemessen werden. Aufgrund der geringen Konzentrationsänderung der Carotinoide bei den gemessenen Temperaturen konnte für *M. luteus* J3 keine relevante Expressionssteigerung der entsprechenden Gene beobachtet werden. Jedoch konnten signifikante Zunahmen der Gen-Expressionen, verantwortlich für die Bildung der glycosylierten Carotinoide, festgestellt werden. Folglich war eine kontrollierte Regulation nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Zusammensetzung der Carotinoide vorhanden. Das zeigt, dass diese Zellen kontrolliert Carotinoide (genauer Xanthophylle) regulieren, um nachteilige Effekte durch kalte Bedingungen zu kompensieren. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Carotinoidanreicherung der Zellen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Gefrier-Auftau-Stress führte und damit eine schützende Wirkung auf die Zelle bei niedrigen Temperaturen besaß. Inhibitionstests wurden auch in diesem Fall, um die zuvor gemachten positiven Eigenschaften durch die erhöhte Carotinoidinkorporation zu verifizieren (Abschnitt 4.2.8), durchgeführt. Damit konnte bestätigt werden, dass die Änderung der Membraneigenschaften als die Verbesserung der Überlebensrate bei Gefrier-Auftau-Stress auf den Carotinoidgehalt der Zellen zurückzuführen war. Auch in diesem Fall sollten sich weitere positive Eigenschaften durch die stark geordnete Membran ergeben. So wurde bereits eine stärkere Resistenz von pigmentierten *S. aureus* Stämmen im Vergleich zu unpigmentierten Deletionsmutanten gegenüber Immunabwehrzellen gezeigt (MISHRA *et al.*, 2011; KOSSAKOWSKA-ZWIERUCHO *et al.*, 2016). Zum anderen wird der Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Membranfluidität durch die Verbreiterung des Phasenüberganges deutlich reduziert. Auch zeigt sich die Relevanz von Kälte-toleranten mesophilen Bakterien, die terrestrische Habitate bewohnen und somit auch mit Lebensmitteln assoziiert sind. Für beide *S. xylosus* Stämme wurde auch während der Optimierung der Carotinoid-Identifikation festgestellt, dass sich die Konzentration zum stationären Bereich noch weiter erhöht. Es könnte analog zum Stamm J12 eine Fitnessverbesserung alter Zellen erfolgen, wodurch sich die Erhaltung bereits produzierter

Biomasse erhöht. Die Relevanz ist insbesondere in der natürlichen Umgebung, bei der die Nährstoffe nicht im Überfluss vorhanden sind, gegeben.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in den untersuchten Kälte-toleranten mesophilen Bakterien eine Fettsäure-unabhängige Kälteadaptation der Zellmembran durch die lipophilen Verbindungen der isoprenoiden Chinone und Carotinoide vorlag. Anhand der Transkriptomdaten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Fettsäure-unabhängige Anpassung eine kontrollierte Regulation der Zellen bei niedrigen Temperaturen darstellt. Insbesondere anhand der Vielzahl der *L. monocytogenes* Stämme konnte beobachtet werden, dass eine schwächere Ausprägung der Fettsäureadaptation durch eine höhere Inkorporation von isoprenoiden Chinonen kompensiert wurde. Mit der erhöhten Einlagerung der untersuchten Verbindungen wurde dabei die L<sub>o</sub> Membranphase induziert, welche die Vorteile einer rigiden Membran mit der Funktionalität einer hohen Membranfluidität kombiniert (Abb. 2). Hierdurch konnte das Verständnis der Temperaturanpassung der Membran an niedrige Temperaturen präzisiert und erweitert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation der bakteriellen Zellmembran, die ein weitgehend unbearbeitetes Gebiet darstellt. Die Zellmembran ist ein kritisches Zellbestandteil, das die Zelle von der Umgebung abtrennt und den Ort wichtiger Funktionen wie zum Beispiel der Energiegenerierung, Nährstoffaufnahme und Sensorik bildet. Nach dem bisherigen Kenntnisstand der Forschung erfolgt die Adaptation der bakteriellen Zellmembran durch die Änderung der Fettsäurezusammensetzung. Wobei zwei biologisch relevante Membranphasen, die feste geordnete ( $S_o$ ) Gelphase und die fluide ungeordnete ( $L_d$ ) Flüssigphase, vorliegen.

In dieser Arbeit wurden Lebensmittel-assoziierte Isolate, deren Fettsäure-abhängige Kälteadaptation keine oder eine unzureichende Anpassung indizierten, verwendet. Um die Hypothese der Fettsäure-unabhängigen Kälteadaptation nachzuweisen, wurden verschiedene Verfahren zur Analyse der Lipide verwendet und mit Sonden-abhängigen Fluoreszenzmessungen zur direkten Bestimmung der Membraneigenschaften, bei mesophilen und niedrigen Wachstums-temperaturen, kombiniert. Nach dieser Beurteilung wurden die Zusammenhänge mittels Inhibitionsversuchen und einer Transkriptomanalyse verifiziert.

Das Ausmaß der Fettsäure-abhängigen Adaptation wurde mit Hilfe der Fettsäureprofile bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde der  $\Delta WAMT$ -Wert etabliert, womit alle detektierten Fettsäuren anhand ihrer Schmelztemperatur und ihrem Anteil gewichtet wurden. Hierdurch konnten Unterschiede in der Fettsäure-abhängigen Kälteadaptation bei den untersuchten Stämmen festgestellt werden. Insbesondere für die *Listeria*-Stämme konnten, bei beiden Wachstumstemperaturen, Unterschiede in der Ausprägung der Fettsäureadaptation beobachtet werden, die bereits auf eine potentielle Fettsäure-unabhängige Anpassung hindeuteten.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Analyse der verdächtigsten lipophilen Verbindungen, die eine Fettsäure-unabhängige Anpassung in bakteriellen Membranen ermöglichen sollten. Dabei standen die beiden Stoffgruppen der isoprenoiden Chinone und Carotinoide im Fokus. Für die Analyse der beiden Stoffgruppen wurden Extraktionsverfahren etabliert, die eine vollständige und konsistente Extraktion, Quantifikation und Identifikation ermöglichten. Anhand der Modellorganismen *L. monocytogenes* und *P. glucanolyticus* konnte eine Erhöhung des Menachinongehaltes bei niedrigen Temperaturen detektiert werden. Durch die hohe Anzahl der

*L. monocytogenes* Isolate konnte auch eine strenge signifikante Korrelation zwischen dem Menachinongehalt und der Ausprägung der Fettsäureanpassung gezeigt werden. Das implizierte ein Zusammenspiel zweier Adaptationsmechanismen. Die Zunahme des Carotinoidgehaltes konnten ebenfalls bei beiden Modellorganismen *S. xylosus* und *M. luteus* gezeigt werden.

Sonden-abhängige Fluoreszenzmessungen erlaubten im nächsten Schritt die direkte Beurteilung der Membranordnung und -fluidität an ganzen lebenden Zellen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Fettsäure-unabhängige Anpassung mittels erhöhten Konzentrationen an isoprenoiden Chinonen und Carotinoiden zu einer Verbesserung der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen führte, wobei gleichzeitig die Rigidität der Membran erhöht wurde. Dies implizierte die Induktion des flüssig-geordneten ( $L_o$ ) Zustandes, der die positiven Eigenschaften einer geordneten, kondensierten Membran mit einer hohen Membranfluidität, die für die physiologische Aktivität der Membran von Nöten ist, kombiniert. Im Fall der beiden *S. xylosus* und *M. luteus* Stämme konnte eine verbesserte Kälteresistenz durch die Carotinoid-abhängige Kälteadaptation der Membran nachgewiesen werden. Auch hier ermöglichte die Vielzahl der *L. monocytogenes* Isolate eine strenge signifikante Korrelation zwischen den beiden Membranparametern und dem Menachinongehalt aufzuzeigen.

Verschiedene Inhibitionsversuche sollten den direkten Zusammenhang, der gezeigten Fettsäure-unabhängigen Anpassung der Zellmembran, verifizieren. Hierfür wurde der Menachinongehalt in zwei ausgewählten *L. monocytogenes* Stämmen und der Carotinoidgehalt in *S. xylosus* erfolgreich reduziert. Es konnte demonstriert werden, dass die Auswirkungen auf die Membran teilweise oder vollständig rückgängig gemacht werden konnten. Das heißt, der Phasenübergang wurde wieder verschmälert, was zu einer Abnahme der Membranfluidität führte. Gleichzeitig konnte auch durch einen Kältestresstest gezeigt werden, dass die verbesserte Überlebensfähigkeit der Zellen von Carotinoiden beeinflusst wurde und nicht durch andere Prozesse der allgemeinen Kälteadaptation der Zelle bedingt war. Mit Hilfe der Transkriptomdaten konnte schlussendlich gezeigt werden, dass die Fettsäure-unabhängige Adaptation eine kontrollierte Regulation der Zellen darstellt und sich somit wahrscheinlich noch weitere Vorteile dadurch ergeben könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe, F., Hiraki, T. (2009). Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1788:743–752.
- Aguilar, P.S., Cronan Jr., J.E., de Mendoza, D. (1998). A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* 180:2194–2200.
- Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C., de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 20:1681–1691.
- Albermann, C., Beuttler, H. (2016). Synthesis of  $\beta$ -carotene and other important carotenoids with bacteria, pp. 229–261. In Vandamme, E.J., Revuelta, J.L. (eds.) *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidant*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Alexander, B., Priest, F.G. (1989). *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of  $\beta$ -glucans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39:112–115.
- Almeida, P.F., Vaz, W.L., Thompson, T.E. (1993). Percolation and diffusion in three-component lipid bilayers: effect of cholesterol on an equimolar mixture of two phosphatidylcholines. *Biophys. J.* 64:399–412.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169.
- Angelidis, A.S., Smith, L.T., Hoffman, L.M., Smith, G.M. (2002). Identification of OpuC as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2644–2650.
- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J. (1997). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3887–3894.
- Anwar, M., Hasan Khan, T., Prebble, J., Zagalsky, P.F. (1977). Membrane-bound carotenoid in *Micrococcus luteus* protects naphthoquinone from photodynamic action. *Nature* 270:538–540.
- Asai, Y. (2000). The interaction of vitamin K<sub>1</sub> with phospholipid membranes. *Colloids Surf. A* 163:265–270.

- Asai, Y., Watanabe, S. (1999). The interaction of ubiquinone-3 with phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 446:169–172.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25:25.
- Atkins, P.W., Overton, T.L., Rourke, J.P., Weller, M.T., Armstrong, F.A. (2010). *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Oxford University Press, New York.
- Augustin, J.C., Carlier, V. (2000). Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 56:29–51.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A, DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M, Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L, Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Pyshkin, A.V. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19:455–477.
- Baust, D. (2017). Einfluss des Carotinoidgehaltes für die Kälteadaptation in *Micrococcus luteus* und *Staphylococcus xylosus*. Masterarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3:1–20.
- Bécavin, C., Bouchier, C., Lechat, P., Archambaud, C., Creno, S., Gouin, E., Zongfu, W., Kühbacher, A., Brisse, S., Pucciarelli, M.G., García-del Portillo, F., Hain, T., Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Lecuit, M., Pizarro-Cerdá, J., Moszer, I., Bierne, H., Cossart, P. (2014). Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic differences underlying variations in pathogenicity. *MBio*, 5(2), e00969-14.
- Beck, H.C., Hansen, A.M., Lauritsen, F.R. (2004). Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *J. Appl. Microbiol.* 96:1185–1193.

- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Sechste, vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Bell, C.M., Sander, L.C., Wise, S.A. (1997). Temperature dependence of carotenoids on C18, C30 and C34 bonded stationary phases. *J. Chromatogr. A* 757:29–39.
- Benson, D.A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 42:D32-D37.
- Bentley, R., Haslam, E. (1990). The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25:307–384.
- Bentley, R., Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol. Rev.* 46:241.
- Beranová, J., Jemioła-Rzemińska, M., Elhottová, D., Strzałka, K., Konopásek, I. (2008). Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1778:445–453.
- Beranová, J., Mansilla, M.C., de Mendoza, D., Elhottová, D., Konopásek, I. (2010). Differences in cold adaptation of *Bacillus subtilis* under anaerobic and aerobic conditions. *J. Bacteriol.* 192:4164–4171.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003). *Biochemie*, 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Bhakoo, M., Herbert, R.A. (1980). Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at different temperatures. *Arch. Microbiol.* 126:51–55.
- Bode, H.B., Zeggel, B., Silakowski, B., Wenzel, S.C., Reichenbach, H., Müller, R. (2003). Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2, 3 (S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol. Microbiol.* 47:471–481.
- Boersch, M., Rudrawar, S., Grant, G., Zunk, M. (2018). Menaquinone biosynthesis inhibition: a review of advancements toward a new antibiotic mechanism. *RSC Adv.* 8:5099–5105.
- Bölter, M. (2004). Ecophysiology of psychrophilic and psychrotolerant microorganisms. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 50:563–573.
- Borenstain, V., Barenholz, Y. (1993). Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization. *Chem. Phys. Lipids* 64:117–127.
- Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C.O., Pon, C.L. (1999). Massive presence of the *Escherichia coli* ‘major cold-shock protein’ CspA under non-stress conditions. *EMBO J.* 18:1653–1659.

- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Völker, A., Bremer, E., Völker, U. (2003). Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.* 185:4305–4314.
- Bringer, S., Härtner, T., Poralla, K., Sahm, H. (1985). Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 140:312–316.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551–1558.
- Brown, D.A., London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:1–7.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Catimel, B., Rocourt, J. (1993). Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* 39:395–401.
- Busse, H.-J. (2012.) Genus I. *Micrococcus* Cohn 1872, 151<sup>AL</sup> emend. Stackebrandt, Koch, Gvozdiak, Schumann 1995, 682 emend. Wieser, Denner, Kämpfer, Schumann, Tindall, Steiner, Vybiral, Lubitz, Maszenan, Patel, Seviour, Radax and Busse 2002, 635, pp. 571–576. In Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematics bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed., vol. 5, Springer-Verlag, New York.
- Chattopadhyay, M.K., Jagannadham, M.V., Vairamani, M., Shivaji, S. (1997). Carotenoid pigments of an antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:85–90.
- Chattopadhyay, M.K. (2006). Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J. Biosci.* 31:157–165.
- Chauhan, S., Shivaji, S. (1994). Growth and pigmentation in *Sphingobacterium antarcticus*, a psychrotrophic bacterium from Antarctica. *Polar Biol.* 14:31–36.
- Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W.S., Bae, T., Ji, Q. (2017). Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *J. Am. Chem. Soc.* 139:3790–3795.
- Chihib, N.E., Ribeiro da Silva, M., Delattre, G., Laroche, M., Federighi, M. (2003). Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A



- and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:155–160.
- Chintalapati, S., Kiran, M.D., Shivaji, S. (2004). Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 50:631–642.
- Chowdhury, S., Ragaz, C., Kreuger, E., Narberhaus, F. (2003). Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer. *J. Biol. Chem.* 278:47915–47921.
- Clarke, A., Morris, G.J., Fonseca, F., Murray, B.J., Acton, E., Price, H.C. (2013). A low temperature limit for life on Earth. *PLoS One* 8:e66207.
- Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J., Emerson, D. (2004). Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods* 58:31–38.
- Collins, M.A., Buick, R.K. (1989). Effect of temperature on the spoilage of stored peas by *Rhodotorula glutinis*. *Food Microbiol.* 6:135–141.
- Collins, M.D., Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* 45:316–354.
- Collins, M.D., Jonse, D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (1979). Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of *Listeria*, *Brochothrix*, *Erysipelothrix* and *Caryophanon*. *J. Gen. Microbiol.* 111:453–457.
- Cooper, G.M. (2000). Chapter 12. The Cell Surface - Structure of the Plasma Membrane. In *The cell: A molecular approach* 2<sup>nd</sup> Ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Croce R., Van Amerongen, H. (2014). Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat. Chem. Biol.* 10:492.
- Crockett, E.L. (1998). Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool.* 38:291–304.
- Cundall, R.B., Johnson, I., Jones, M.W., Thomas, E.W., Munro, I.H. (1979). Photophysical properties of DPH derivatives. *Chem. Phys. Lett.* 64:39–42.
- Dahl, T.A., Midden, W.R., Hartman, P.E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bacteriol.* 171:2188–2194.
- Dairi, T. (2009). An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms: an attractive target for drug discovery to pathogenic *Helicobacter* and *Chlamydia* strains. *J. Antibiot.* 62:347.
- Dairi, T. (2012). Menaquinone biosyntheses in microorganisms, pp. 107–122. In Abelson, J.N., Simon, M.I. (eds.) *Methods in enzymology*, vol. 515, Academic Press, Cambridge.

- Dalluge, J.J., Hamamoto, T., Horikoshi, K., Morita, R.Y., Stetter, K.O., McCloskey, J.A. (1997). Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 179:1918–1923.
- Danielli, J.F., Davson, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell Comp. Physiol.* 5:495–508.
- Degli Esposti, M. (2017). A journey across genomes uncovers the origin of ubiquinone in cyanobacteria. *Genome Biol. Evol.* 9:3039–3053.
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., Cowan, D.A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Rep.* 15:508–517.
- Dembitsky, V.M. (2005). Astonishing diversity of natural surfactants: 3. Carotenoid glycosides and isoprenoid glycolipids. *Lipids* 40:535–557.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods* 52:149–182.
- Derichs, J. (2015). Untersuchung der Kälteanpassungsmechanismen bakterieller Zellmembranen. Dissertation Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Dot, M., Roehr, J.T., Ahmed, R., Dieterich, C. (2012). FLEXBAR - Flexible barcode and adapter processing for next-generation sequencing platforms. *Biology* 1:895–905.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004a). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42:3819–3822.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., Buchrieser, C. (2004b). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* 72:1072–1083.
- Dufourc, E.J. (2008) Sterols and membrane dynamics. *J. Chem. Biol.* 1:63–77.
- Duh, Y.H., SCHAFFNER, D.W. (1993). Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 56:205–210.
- Eeman, M., Deleu, M. (2010). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 14:719–736.
- Eriksson, S., Hurme, R., Rhen, M. (2002). Low-temperature sensors in bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 357:887–893.

- Evans, M.R., Swaminathan, B., Graves, L.M., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., Fink, R.C., Kernodle, S., Kathariou, S. (2004). Genetic markers unique to *Listeria monocytogenes* serotype 4b differentiate epidemic clone II (hot dog outbreak strains) from other lineages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2383–2390.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476–511.
- Farrell, J., Rose, A. (1967). Temperature effects on microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 21:101–120.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243–282.
- Feller, G., Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev.* 1:200–208.
- Filippov, A., Orädd, G., Lindblom, G. (2003). The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys. J.* 84:3079–3086.
- Flegler, A. (2017). Wirkung von Chinonen auf die Membranfluidität in Bakterien bei niedrigen Temperaturen. Masterarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Fong, N., Burgess, M., Barrow, K., Glenn, D. (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:750–756.
- Freedman, R.B. (1981). Membrane-bound enzymes. *New Compr. Biochem.* 1:161–214.
- Gabrielska, J., Gruszecki, W.I. (1996). Zeaxanthin (dihydroxy- $\beta$ -carotene) but not  $\beta$ -carotene rigidifies lipid membranes: a H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1285:167–174.
- Gally, H.U., Seelig, A., Seelig, J. (1976). Cholesterol-induced rod-like motion of fatty acyl chains in lipid bilayers a deuterium magnetic resonance study. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357:1447.
- Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A., Wagner, D. (2011). *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:979–984.
- Geiges, O. (1996). Microbial processes in frozen food. *Adv. Space Res.* 18:109–118.
- Gene Ontology Consortium (2018). The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* 47:D330–D338.

- Giangrossi, M., Giuliadori, A.M., Gualerzi, C.O., Pon, C.L. (2002). Selective expression of the  $\beta$ -subunit of nucleoid-associated protein HU during cold shock in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44:205–216.
- Ginzaburo, S., Katsuo, T., Shozo, T. (1967). A new triterpenoid from a mutant of *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids and Lipid Metabolism* 144:186–188.
- Gish, W., States, D.J. (1993): Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 3:266–272.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J.C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849–852.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:81–91.
- Gorter, E., Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41:439–443.
- Gounot, A.M., Russell, N.J. (1999). Physiology of cold-adapted microorganisms, pp. 33–55. In: Margesin, R., Schinner, F. (Eds.), *Cold-adapted Organisms. Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R., Marahiel, M.A. (1996). Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178:4611–4619.
- Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M.H., Schröder, K., Marahiel, M.A. (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbiol.* 25:741–756.
- Graumann, P.L., Marahiel, M.A. (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:203–209.

- Graves, L.M., Swaminathan, B., Hunter, S.B. (1999). Subtyping *Listeria monocytogenes*, pp. 279–297. In Ryser, E.T., Marth, E.H. (eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 2<sup>nd</sup> Ed., Marcel Dekker, New York.
- Gruszecki, W.I. (2004). Carotenoid orientation: role in membrane stabilization, pp.151–164. In Krinsky, H., Mayne, S.T., Sies, H. (eds.), *Carotenoids in Health and Disease*, CRC Press, Boca Raton.
- Gruszecki, W.I., Strzałka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1740:108–115.
- Gualerzi, C.O., Giuliodori, A.M., Pon, C.L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.* 331:527–539.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
- Hammond, R.K., White, D.C. (1970). Inhibition of vitamin K<sub>2</sub> and carotenoid synthesis in *Staphylococcus aureus* by diphenylamine. *J. Bacteriol.* 103:611–615.
- Harris, F.M., Best, K.B., Bell, J.D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1565:123–128.
- Hazel, J.R., Williams, E.E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29:167–227.
- Hazel, J.R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57:19–42.
- Hébraud, M., Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:211–219.
- Helmke, E., Weyland, H. (2004). Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria-occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Mol. Cell. Biol.* 50:553–561.
- Hernandez-Milian, A., Payeras-Cifre, A. (2014). What is new in listeriosis? *BioMed Res. Int.* 2014.
- Hiraishi, A. (1999). Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *J. Biosci. Bioeng.* 88:449–460.
- Hiraishi, A., Ueda, Y., Ishihara, J.B., Mori, T. (1996). Comparative lipoquinone analysis of influent sewage and activated sludge by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42:457–469.

- Hiratsuka, T., Furihata, K., Ishikawa, J., Yamashita, H., Itoh, N., Seto, H., Dairi, T. (2008). An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science* 321:1670–1673.
- Hu, H.-Y., Fujie, K., Urano, K. (1999). Development of a novel solid phase extraction method for the analysis of bacterial quinones in activated sludge with a higher reliability. *J. Biosci. Bioeng.* 87:378–382.
- Huffer, S., Clark, M.E., Ning, J.C., Blanch, H.W., Clark, D.S. (2011). Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6400–6408.
- Hurme, R., Rhen, M. (1998). Temperature sensing in bacterial gene regulation—what it all boils down to. *Mol. Microbiol.* 30:1–6.
- Illinger, D., Duportail, G., Mely, Y., Poirel-Morales, N., Gerard, D., Kuhry, J.G. (1995). A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1239:58–66.
- Ipsen, J.H., Karlström, G., Mourtisen, O.G., Wennerström, H., Zuckermann, M.J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 905:162–172.
- Irlinger, F., Morvan, A., El Solh, N., Bergere, J.L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:319–328.
- IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature (1978). The nomenclature of lipids. *Chem. Phys. Lipids* 21:159–173.
- Jackson, H., Braun, C., Ernst, H. (2008). The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am. J. Cardiol.* 101:50–57.
- Jacobson, K., Sheets, E.D., Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441–1443.
- Jagannadham, M.V., Rao, V.J., Shivaji, S. (1991). The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* strain: purification, structure, and interaction with synthetic membranes. *J. Bacteriol.* 173:7911–7917.
- Janiak, M.J., Small, D.M., Shipley, G.G. (1979). Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *J. Biol. Chem.* 254:6068–6078

- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). Chapter 16 - Protection of foods with low-temperatures, and characteristics of psychrotrophic microorganisms, pp. 395–413. In *Modern food microbiology*, 7<sup>th</sup> Ed., Springer-Verlag, New York.
- Jiang, W., Hou, Y., Inouye, M. (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272:196–202.
- Jeffries, L., Cawthorne, M.A., Harris, M., Diplock, A.T., Green, J., Price, S.A. (1967). Distribution of menaquinones in aerobic Micrococcaceae. *Nature* 215:257–259.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110:551–561.
- Jones, S.L., Drouin, P., Wilkinson, B.J., Morse, P.D. (2002). Correlation of long-range membrane order with temperature-dependent growth characteristics of parent and a cold-sensitive, branched-chain-fatty-acid-deficient mutant of *Listeria monocytogenes*. *Arch. Microbiol.* 177:217–222.
- Kaiser, P., Surmann, P., Vallentin, G., Fuhrmann, H. (2007). A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *J. Microbiol. Methods* 70:142–149.
- Kandror, O., DeLeon, A., Goldberg, A.L. (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9727–9732.
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28:27–30.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., and Tanabe, M. (2019). New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 47:D590–D595 (2019).
- Kannenbergh, E.L., Poralla, K. (1999). Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften*, 86:168–176.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Protect.* 65:1811–1829.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14:R36.
- Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C., Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:346–351.

- Kim, S.H., Lee, P.C. (2012). Functional expression and extension of staphylococcal staphyloxanthin biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 287:21575–21583.
- Knothe, G., Dunn, R.O. (2009). A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86:843–856.
- Ko, R., Smith, L.T., Smith, G.M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 176:426–431.
- Konings, W.N., Albers, S.V., Koning, S., Driessen, A.J. (2002). The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:61-72.
- Könneke, M., Widdel, F. (2003). Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate - reducing bacteria. *Environ. Microbiol.* 5:1064–1070.
- Koronelli, T.V., Pakhlavuni, I.K., Vorobyeva, I.A., Balashov, S.P. (1987). The lipopeptidocarotenoid complex and cells of *Rhodococcus maris* studied by spectroscopy. *Mikrobiologiya* 56:890–891.
- Kosakowska-Zwierucho, M., Kaźmierkiewicz, R., Bielawski, K.P., Nakonieczna, J. (2016). Factors determining *Staphylococcus aureus* susceptibility to photoantimicrobial chemotherapy: RsbU activity, staphyloxanthin level, and membrane fluidity. *Front. Microbiol.* 7:1141.
- Krumsiek, J., Arnold, R., Rattei, T. (2007). Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics* 23:1026–1028.
- Kuchta, T., Kubinec, R., Farkaš, P. (1998). Analysis of Hopanoids in bacteria involved in food technology and food contamination. *FEMS Microbiol. Lett.* 159:221–225.
- Kurosu, M., Narayanasamy, P., Biswas, K., Dhiman, R., Crick, D.C. (2007). Discovery of 1, 4-dihydroxy-2-naphthoate prenyltransferase inhibitors: New drug leads for multidrug-resistant gram-positive pathogens. *J. Med.Chem.* 50:3973–3975.
- Lakowicz, J.R. (2013). Principles of fluorescence spectroscopy, 3<sup>rd</sup> Ed., Springer Science + Business Media, New York.
- Laksanalasmai, P., Burall, L., Datta, A.R. (2011). Adaptation Mechanisms of Psychrotolerant Bacterial Pathogens, pp. 817–837. In Horikoshi, K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, vol. 1, Springer-Verlag, Tokyo.



- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10:R25.
- Lindström, M., Dahlsten, E., Söderholm, H., Selby, K., Somervuo, P., Heap, J.T., Minton, N.P., Korkeala, H. (2012). Involvement of two-component system CBO0366/CBO0365 in the cold shock response and growth of group I (proteolytic) *Clostridium botulinum* ATCC 3502 at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5466–5470.
- Lingwood, D., Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327:46–50.
- Lipski, A., Altendorf, K. (1997). Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experimental biofilters. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:448–457.
- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J., Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J. Exp. Med.* 202:209–215.
- Liu, H., Xu, Y., Ma, Y., Zhou, P. (2000). Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:715–719.
- Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse P.D. Wilkinson, B.J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1697–1705.
- Luzzati, V., Tardieu, A. (1974). Lipid phases: structure and structural transitions. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 25:79–94.
- Margesin, R. (2009). Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles* 13:257–262.
- Margesin, R., Neuner, G., Storey, K.B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals - fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* 94:77–99.
- Margesin, R., Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res. Microbiol.* 162:346–361.
- Marshall, J.H., Wilmoth, G.J. (1981). Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J. Bacteriol.* 147:900–913.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 107:148–158.
- Mascher, G., Derman, Y., Kirk, D.G., Palonen, E., Lindström, M., Korkeala, H. (2014). The CLO3403/CLO3404 two-component system of *Clostridium botulinum* E1 Beluga is

- important for cold shock response and growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:399–407.
- Mastronicolis, S.K., German, J.B., Megoulas, N., Petrou, E., Foka, P., Smith, G.M. (1998). Influence of cold shock on the fatty-acid composition of different lipid classes of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 15:299–306.
- Mastronicolis, S.K., Boura, A., Karaliota, A., Magiatis, P., Arvanitis, N., Litos, C., Tsakirakis, A., Paraskevas, P., Moustaka, H., Heropoulos, G. (2006). Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: Focus on neutral lipids. *Food Microbiol.* 23:184–194.
- Mathews, M.M., Siström, W.R. (1960). The function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. *Arch. Microbiol.* 35:139–146.
- Mathews, S.L., Pawlak, J., Grunden, A.M. (2016). Draft genome sequences of two strains of *Paenibacillus glucanolyticus* with the ability to degrade lignocellulose. *Genome Announc.* 4:e00423–16.
- McCarthy, D.J., Chen, Y., Smyth, K.G. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 40:4288–4297.
- McLauchlin, J., Rees, C.E.D. (2009). Genus I. *Listeria* 1940a, 383<sup>AL</sup>, pp 244-257. In De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematics bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed., vol. 3, Springer, New York
- Melchior, D.L., Steim, J.M. (1976). Thermotropic transitions in biomembranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5:205–238.
- Merino, N., Aronson, H.S., Bojanova, D.P., Feyhl-Buska, J., Wong, M.L., Zhang, S., Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Front. Microbiol.* 10:780.
- Meyer, A. (2011). Der Einfluss von Hopanoiden auf die Kälteadaptation bei Bakterien. Bachelorarbeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Miladi, H., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013). Cellular lipid fatty acid profiles of reference and food isolates *Listeria monocytogenes* as a response to refrigeration and freezing stress. 37:136–143.
- Miller, L.T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16:584–586.

- Milon, A., Wolff, G., Ourisson, G., Nakatani, Y. (1986). Organization of carotenoid - phospholipid bilayer systems. Incorporation of zeaxanthin, astaxanthin, and their C50 homologues into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Helv. Chim. Acta* 69:12–24.
- Mishra, N.N., Liu, G.Y., Yeaman, M.R., Nast, C.C., Proctor, R.A., McKinnell, J., Bayer, A.S. (2011). Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:526–531.
- Mohana, D.C., Thippeswamy, S., Abhishek, U.R. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiat. Prot. Environ.* 36:168–174.
- Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R.F., Gänzle, M.G. (2004). Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Appl. Environ. Microb.* 70:2013–2020.
- Montes, M.J., Mercadé, E., Bozal, N., Guinea, J. (2004). *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1521–1526.
- Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39:144–167.
- Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor  $\zeta 32$ : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* 13:655–665.
- Moskalenko, A.A., Karapetyan, N.V. (1996). Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes. *Z. Naturforsch. C* 51:763–771.
- Mouritsen, O.G., Zuckermann, M.J. (2004). What's so special about cholesterol?. *Lipids* 39:1101–1113.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, pp. 263–273. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 51, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 07–439.

- Nahaie, M.R., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Hajek, V. (1984). Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Staphylococcus*. *Microbiology* 130:2427–2437.
- Nara, T., Kawagishi, I., Nishiyama, S., Homma, M., Imae, Y. (1996). Modulation of the thermosensing profile of the *Escherichia coli* aspartate receptor tar by covalent modification of its methyl-accepting sites. *J. Biol. Chem.* 271:17932–17936
- Nedwell, D.B. (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:101–111.
- Nelson, D.M., Glawe, A.J., Labeda, D.P., Cann, I.K., Mackie, R.I. (2009). *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:1708–1714.
- Nelson, K.E., Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Ravel, J., DeBoy, R.T., Kolonay, J.F., Rasko, D.A., Angiuoli, S.V., Gill, S.R., Paulsen, I.T., Peterson, J., White, O., Nelson, W.C., Niermann, W., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Dukrin, A.S., Madupu, R., Haft, D.H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forberger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling, L.D., Uhlich, G.A., Bayles, D.O., Luchansky, J.B., Fraser, C.M. (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* 32:2386–2395.
- Nes, W.R. (1974). Role of sterols in membranes. *Lipids* 9:596–612.
- Netzer, R., Stafsnes, M.H., Andreassen, T., Goksøyr, A., Bruheim, P., Brautaset, T. (2010). Biosynthetic pathway for  $\gamma$ -cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: Heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. *J. Bacteriol.* 192:5688–5699.
- Neunlist, M.R., Federighi, M., Laroche, M., Sohier, D., Delattre, G., Jacquet, C., Chihib, N.E. (2005). Cellular lipid fatty acid pattern heterogeneity between reference and recent food isolates of *Listeria monocytogenes* as a response to cold stress. *Anton Leeuw. Int. J. G.* 88:199–206.
- Nič, M., Jiráť, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A. (2009). IUPAC Compendium of Chemical Terminology. IUPAC, Research Triangle Park, NC.
- Nichols, D.S., Presser, K.A., Olley, J., Ross, T., McMeekin, T.A. (2002). Variation of branched-chain fatty acids marks the normal physiological range for growth in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2809–2813.

- Nishiyama, S., Maruyama, I.N., Homma, M., Kawagishi, I. (1999). Inversion of thermosensing property of the bacterial receptor Tar by mutations in the second transmembrane region. *J. Molec. Biol.* 286:1275–1284.
- Nowicka, B., Kruk, J. (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1797:1587–1605.
- O'Donnell, A.G., Nahaie, M.R., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Hajek, V. (1985). Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of staphylococci. *Microbiology* 131:2023–2033.
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J.P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41:66-97.
- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301:79–96.
- Ortiz, A., Villalaín, J., Gómez-Fernández, J.C. (1986). The interaction of vitamin K<sub>1</sub> with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 863:185–192.
- Ortiz, A., Aranda, F.J. (1999). The influence of vitamin K<sub>1</sub> on the structure and phase behaviour of model membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1418:206–220.
- Özcan, N., Ejsing, C.S., Shevchenko, A., Lipski, A., Morbach, S., Krämer, R. (2007). Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 189:7485–7496.
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M., Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* 60:179–189.
- Parasassi, T., Krasnowska, E.K., Bagatolli, L., Gratton, E. (1998). Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *J. Fluoresc.* 8:365–373.
- Pelz, A., Wieland, K.P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K., Götz, F. (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 280:32493–32498.
- Poger, D., Caron, B., Mark, A.E. (2014). Effect of methyl-branched fatty acids on the structure of lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* 118:13838–13848.
- Poralla, K., Kannenberg, E. (1987). Hopanoids: sterol equivalents in bacteria. *Ecology and Metabolism of Plant Lipids*, 325:239–251.

- Poralla, K., Kannenberg, E., Blume, A. (1980). A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. *FEBS Lett.* 113:107–110.
- Prakash, J.S., Sinetova, M., Zorina, A., Kupriyanova, E., Suzuki, I., Murata, N., Los, D.A. (2009). DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium *Synechocystis*. *Mol. Biosyst.* 5:1904–1912.
- Priest, F.G. (2009). Genus I. *Paenibacillus* Ash, Priest and Collins 1994, 852<sup>VP</sup> (Effective publication: Ash, Priest and Collins 1993, 259) emend. Shida, Takagi, Kadowaki, Nakamura and Komagata 1997a, 297, pp 269-295. In De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematics bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed., vol 3, Springer, New York
- Prüß, B.M., Francis, K.P., von Stetten, F., Scherer, S. (1999). Correlation of 16S Ribosomal DNA Signature Sequences with Temperature-Dependent Growth Rates of Mesophilic and Psychrotolerant Strains of the *Bacillus cereus* Group. *J. Bacteriol.* 181:2624–2630.
- Rasmus, S., Mikkola, R., Andersson, M.A., Teplova, V.V., Venediktova, N., Ek-Kommonen, C., Salkinoja-Salonen, M. (2012). Psychrotolerant *Paenibacillus tundrae* isolates from barley grains produce new cereulide-like depsipeptides (paenilide and homopaenilide) that are highly toxic to mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3732–3743.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149, 1–5.
- Řezanka, T., Siristova, L., Melzoch, K., Sigler, K. (2010). Hopanoids in Bacteria and Cyanobacteria – Their Role in Cellular Biochemistry and Physiology, Analysis and Occurrence. *Mini Rev. Org. Chem.* 7:300–313.
- Rezwan, M., Lanéelle, M.-A., Sander, P., Daffé, M. (2007). Breaking down the wall: fractionation of mycobacteria. *J. Microbiol. Methods* 68:32–39.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140
- Rocha, D.J., Santos, C.S., Pacheco, L.G. (2015). Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108:685–693.
- Rodrigues, D.F., Tiedje, J.M. (2008). Coping with our cold planet. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1677–1686.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Press, Washington.

- Rohmer, M., Bouvier, P., Ourisson, G. (1978). Molecular evolution of biomembranes: Structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:847–851.
- Rokem, J.S., Vongsangnak, W., Nielsen, J. (2011). Comparative metabolic capabilities for *Micrococcus luteus* NCTC 2665, the “Fleming” strain, and actinobacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 108:2770–2775.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G. (2001). Identification by 16S–23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *J. Appl. Microbiol.* 90:365–371.
- Rottem, S. (1981). Cholesterol is required to prevent crystallization of *Mycoplasma arginini* phospholipids at physiological temperature. *FEBS Lett.* 133:161–164.
- Rottem, S., Cirillo, V.P., de Kruff, B., Shinitzky, M., Razin, S. (1973). Cholesterol in mycoplasma membranes. Correlation of enzymic and transport activities with physical state of lipids in membranes of *Mycoplasma mycoides* var. *capri* adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 323:509–519.
- Russell, N.J. (1984). Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem. Sci.* 9:108–112.
- Russell, N.J. (1989). Functions of lipids: structural roles and membrane functions, pp. 279–365. In Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (eds.), *Microbial lipids*, vol. 2, Academic Press, London.
- Russell, N. J. (1990). Cold adaptation of microorganisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 326:595–608, discussion 608–611.
- Russell, N.J. (1998). Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: Potential for biotechnological applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61:1–21
- Russell, N.J. (2002). Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 79:27–34.
- Sáenz, J.P., Sezgin, E., Schwille, P., Simons, K. (2012). Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:14236–14240.
- Sáenz, J.P., Grosser, D., Bradley, A.S., Lagny, T.J., Lavrynenko, O., Broda, M., Simons, K. (2015). Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:11971–11976.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sánchez, S.A., Tricerri, M.A., Gunther, G., Gratton, E. (2007). Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope, pp. 1007–1014. In Méndez-Vilas, A., Díaz, J. (eds.), *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, vol. 2, Formatex, Badajoz.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria through fatty acid analysis, pp. 199–204. In Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (eds.), *Methods in Phytobacteriology*, Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Saunders, N.F.W., Thomas, T., Curmi, P.M.G., Mattick, J.S., Kuczek, E., Slade, R., Davis, D., Franzmann, P.D., Boone, D., Rusterholtz, K., Feldman, R., Gates, C., Bench, S., Sowers, K., Kadner, K., Aerts, A., Dehal, P., Detter, C., Glavina, T., Lucas, S., Richardson, P., Larimer, F., Hauser, L., Land, M., Cavicchioli, R. (2003). Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic *Archaea Methanogenium frigidum* and *Methanococoides burtonii*. *Genome Res.* 13:1580–1588.
- Scannell, A. (2005). Foodborne illnesses and detection of pathogenic microorganisms, pp. 574–598. In Sun, D.-W. (ed.), *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. CRC Press, Boca Raton.
- Scharff, R.L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J. Food Prot.* 75:123–131.
- Scherer, S., Neuhaus, K. (2006). Life at low temperatures, pp. 210–262. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Karl-Heinz Schleifer, K.-H., Erko Stackebrandt, E. (eds.): *The Prokaryotes*, vol. 2, Springer-Verlag, New York.
- Schleifer, K.-H., Kloos, W.E. (1975). Isolation and characterization of Staphylococci from human skin I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 25:50–61.
- Schleifer, K.-H., Bell, J.A. (2009). Genus I. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18<sup>AL</sup> (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 153.), pp 392–421. In De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (eds.), *Bergey's Manual of Systematics bacteriology*, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 3, Springer, New York.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M.J., Stephan, R., Tasara, T. (2009). Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1621–1627.



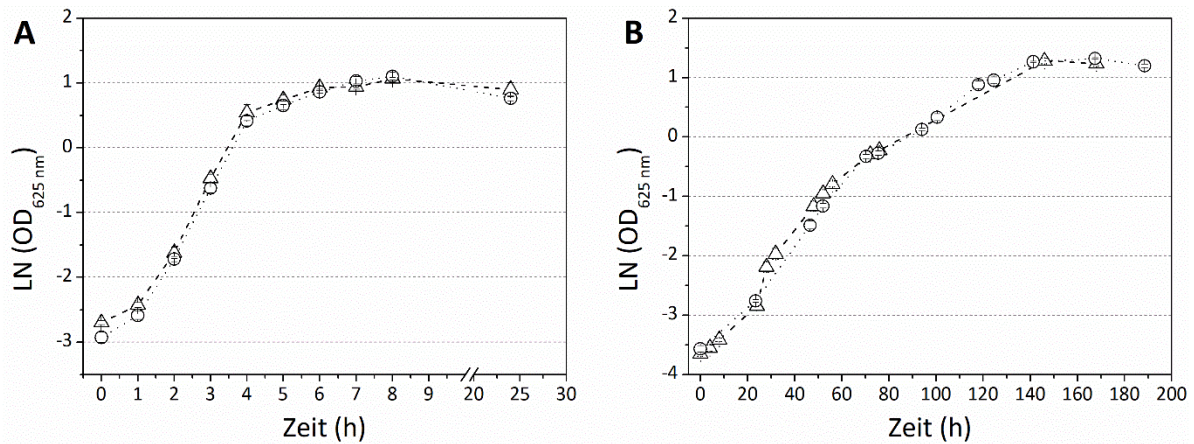
- Seel, W., Derichs, J., Lipski, A. (2016). Increased biomass production by mesophilic food-associated bacteria through lowering the growth temperature from 30° C to 10° C. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:3754–3764.
- Seel, W., Flegler, A., Zunabovic-Pichler, M., Lipski, A. (2018) Increased isoprenoid quinone concentration modulates membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* at low growth temperatures. *J. Bacteriol.* 200:e00148-18.
- Seeliger, H.P.R. (1961). Listeriosis. Karger Publishers, Basel.
- Sharpless, K.E., Thomas, J.B., Sander, L.C., Wise, S.A. (1996). Liquid chromatographic determination of carotenoids in human serum using an engineered C30 and a C18 stationary phase. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 678:187–195.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K., Komagata, K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47:289–298.
- Siefermann-Harms, D. (1985). Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* 811:325–355
- Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cellmembranes. *Nature*, 397:569–572.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:522–525.
- Singer, S.J., Nicholson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.
- Singh, H., Cama, H.R. (1975). Metabolism of carotenoids. *J. Sci. Ind. Res.* 34:219–230.
- Søballe, B., Poole, R.K. (1999). Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* 145:1817–1830.
- Socaciu, C., Jessel, R., Diehl, H.A. (2000). Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chem. Phys. Lipids* 106:79–88.
- Sohlenkamp, C., Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 40:133–159.

- Sons, D. (2018). Functional and structural analysis of carotenoids of *M. luteus* and *S. xylosus* and CRISPR/CAS mediated inhibition with respect to low temperature adaptation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Strand, A., Shivaji, S., Liaaen-Jensen S. (1997). Bacterial carotenoids 55. C50-carotenoids 25.† revised structures of carotenoids associated with membranes in psychrotrophic *Micrococcus roseus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 25:547–552.
- Subczynski, W.K., Markowska, E., Gruszecki, W.I., Sielewiesiuk, J. (1992). Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 110:597–108.
- Suutari, M., Laakso, S. (1994). Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* 20:285–328.
- Tanabe, H., Goldstein, J., Yang, M., Inouye, M. (1992). Identification of the promoter region of the *Escherichia coli* major cold shock gene, *cspA*. *J. Bacteriol.* 174:3867–3873.
- Tappero, J.W., Schuchat, A., Deaver, K.A., Mascola, L., Wenger, J.D., Swaminathan, B.,..., Rothrock, G. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: effectiveness of prevention efforts?. *JAMA* 273:1118–1122.
- Tatituri, R.V., Wolf, B.J., Brenner, M.B., Turk, J., Hsu, F.F. (2015). Characterization of polar lipids of *Listeria monocytogenes* by HCD and low-energy CAD linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *Anal. Bioanal. Chem.* 407:2519–2528.
- Trevors, J.T., Bej, A.K., Mojib, N., Van Elsas, J.D., Van Overbeek, L. (2012). Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles*, 16:167–176.
- Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W., Wood, J.M. (2005). The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *J. Biol. Chem.* 280:41387–41394.
- Tsukamoto, Y., Kasai, M., Kakuda, H. (2001). Construction of a *Bacillus subtilis* (natto) with high productivity of vitamin K<sub>2</sub> (menaquinone-7) by analog resistance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2007–2015.
- Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174:233–238.
- Usui, K., Hiraki, T., Kawamoto, J., Kurihara, T., Nogi, Y., Kato, C., Abe, F. (2012). Eicosapentaenoic acid plays a role in stabilizing dynamic membrane structure in the deep-sea piezophile *Shewanella violacea*: a study employing high-pressure time-

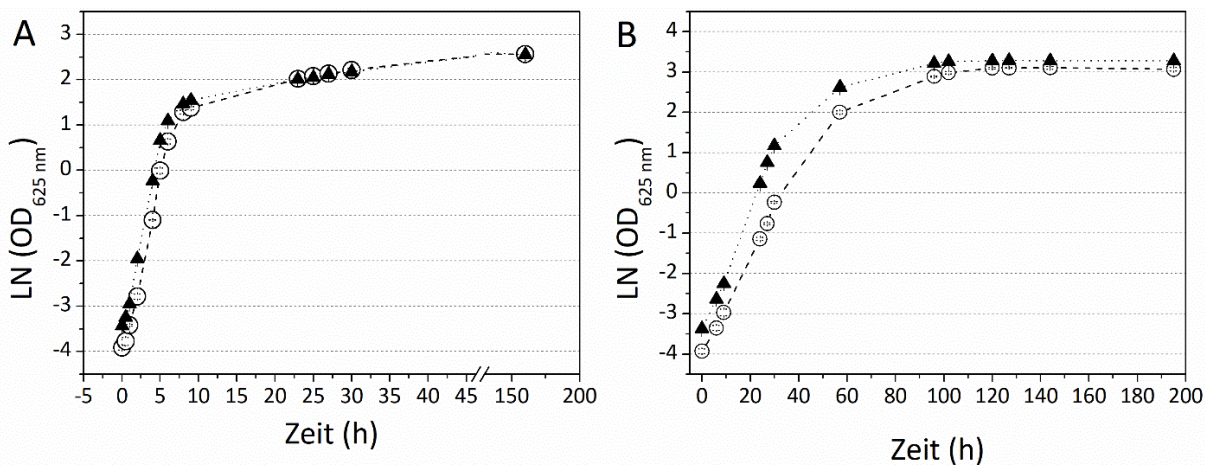
- resolved fluorescence anisotropy measurement. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818:574–583.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112–124.
- Verheul, A., Russell, N.J., Hof, R.V.T., Rombouts, F.M., Abee, T. (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microb.* 63:3451–3457.
- Vermassen, A., de la Foye, A., Loux, V., Talon, R., Leroy, S. (2014). Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylosus* in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress. *Front. Microbiol.* 5:691.
- Vermassen, A., Dordet-Frisoni, E., de La Foye, A., Micheau, P., Laroute, V., Leroy, S., Talon, R. (2016). Adaptation of *Staphylococcus xylosus* to nutrients and osmotic stress in a salted meat model. *Front. Microbiol.* 7:87.
- Weber, G., Farris, F.J. (1979). Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene. *Biochemistry*, 18:3075–3078.
- Weber, M.H., Klein, W., Muller, L., Niess, U.M., Marahiel, M.A. (2001). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* 39:1321–1329.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Sleator, R.D., Wouters, J.A., Hill, C., Abee, T. (2004). Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2912–2918.
- Wieser, M., Denner, E.B., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., ... & Seviour, R.J. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:629–637.
- Winter, R., Noll, F., Czeslik, C. (2011) Methoden der Biophysikalischen Chemie, 2. Aufl., Vieweg+Teubner, Wiesbaden.
- Wouters, J.A., Rombouts, F.M., De Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T. (1999). Cold Shock Proteins and Low-Temperature Response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4436–4442.
- Wouters, J.A., Rombouts, F.M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Abee, T. (2000). The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 23:165–173

- Xie, J., Bogdanov, M., Heacock, P., Dowhan, W. (2006). Phosphatidylethanolamine and monoglucosyldiacylglycerol are interchangeable in supporting topogenesis and function of the polytopic membrane protein lactose permease. *J. Biol. Chem.* 281:19172–19178.
- Yamanaka, K., Inouye, M. (2001). Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:2808–2816.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Lim, J., Kwon, S., Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* 110:1281–1286.
- Zakar, T., Herman, E., Vajravel, S., Kovacs, L., Knoppová, J., Komenda, J., Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., Laczko-Dobos, H. (2017). Lipid and carotenoid cooperation-driven adaptation to light and temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1858:337–350.
- Zhang, W., Campbell, H.A., King, S.C., Dowhan, W. (2005). Phospholipids as determinants of membrane protein topology phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the  $\gamma$ -Aminobutyric acid permease (GabP) of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280:26032–26038.
- Zhang, Y.M., Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:222–233
- Zhi, X.Y., Yao, J.C., Tang, S.K., Huang, Y., Li, H.W., Li, W.J. (2014). The futasine pathway played an important role in menaquinone biosynthesis during early prokaryote evolution. *Genome Biol. Evol.* 6:149–160.

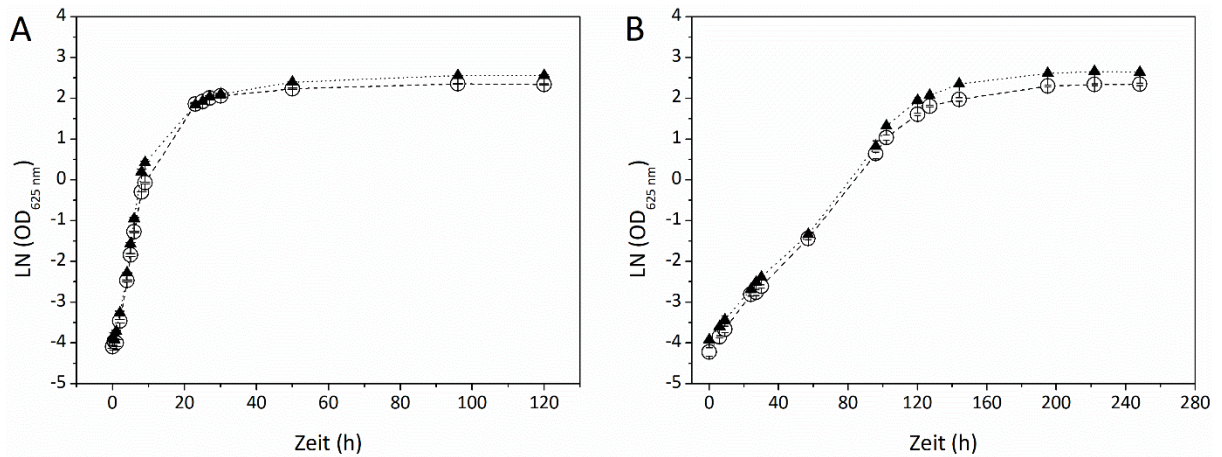
## 7 Anhang



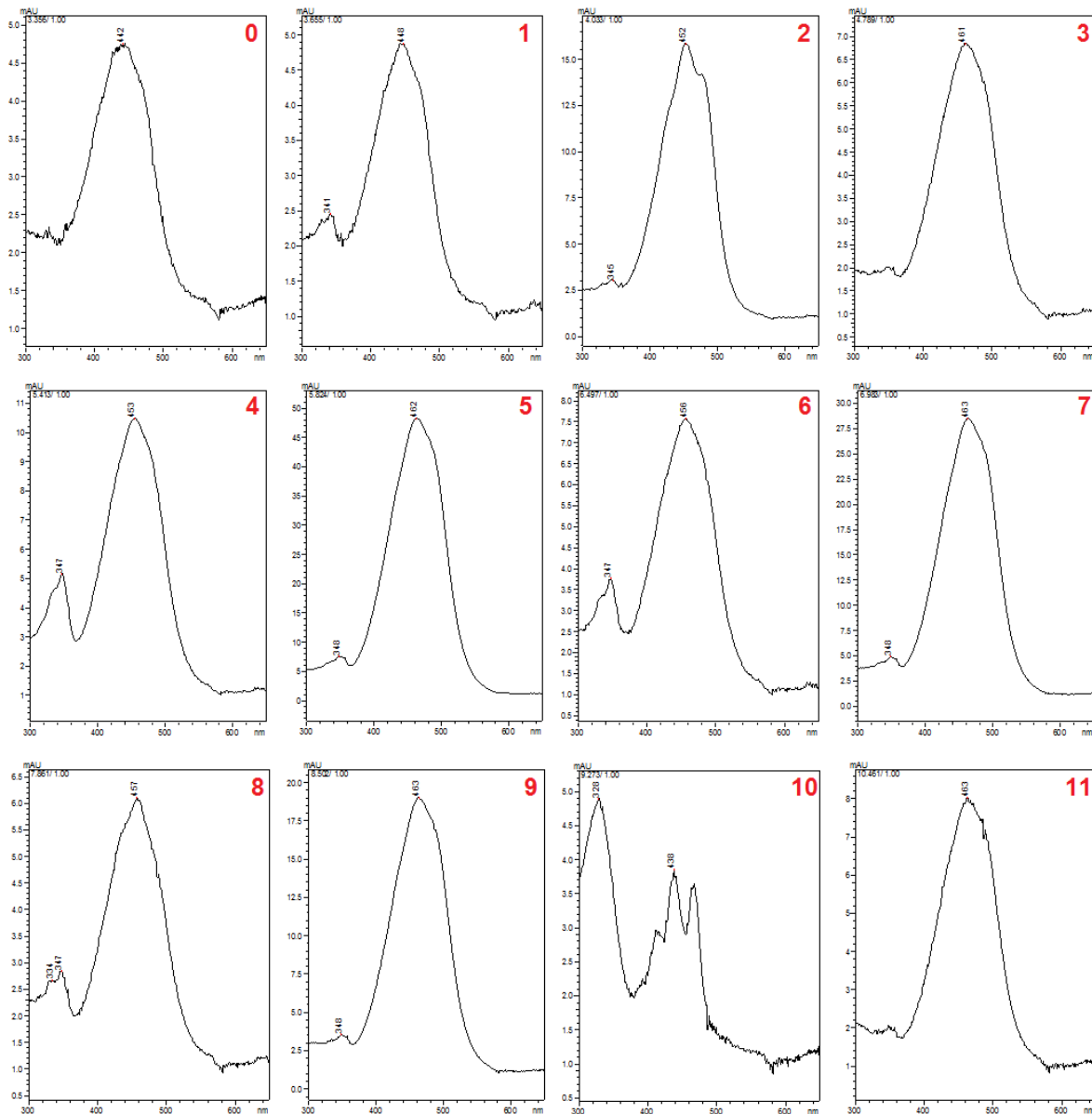
**Anhang 1: Halb-Logarithmische Darstellung des Wachstumsverlaufs der beiden *P. glucanolyticus* Stämme bei A, 30 °C und B, 10 °C Wachstumstemperatur. △, gestrichelte Linie repräsentiert den Stamm DSM 5162<sup>T</sup>. ○, gepunktete Linie repräsentiert den Stamm J12. Datenpunkte stelle Mittelwerte dar (n = 3).**



**Anhang 2: Halb-logarithmische Darstellung des Wachstumsverlaufs der beiden *S. xylosus* Stämme bei 30 °C (A) und 10 °C (B) Wachstumstemperatur. ○, gestrichelte Linie repräsentiert die Datenpunkte des Stamm DSM 20266<sup>T</sup>. ▲, gepunktete Linie repräsentiert die Datenpunkte des Stammes J70. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate).**

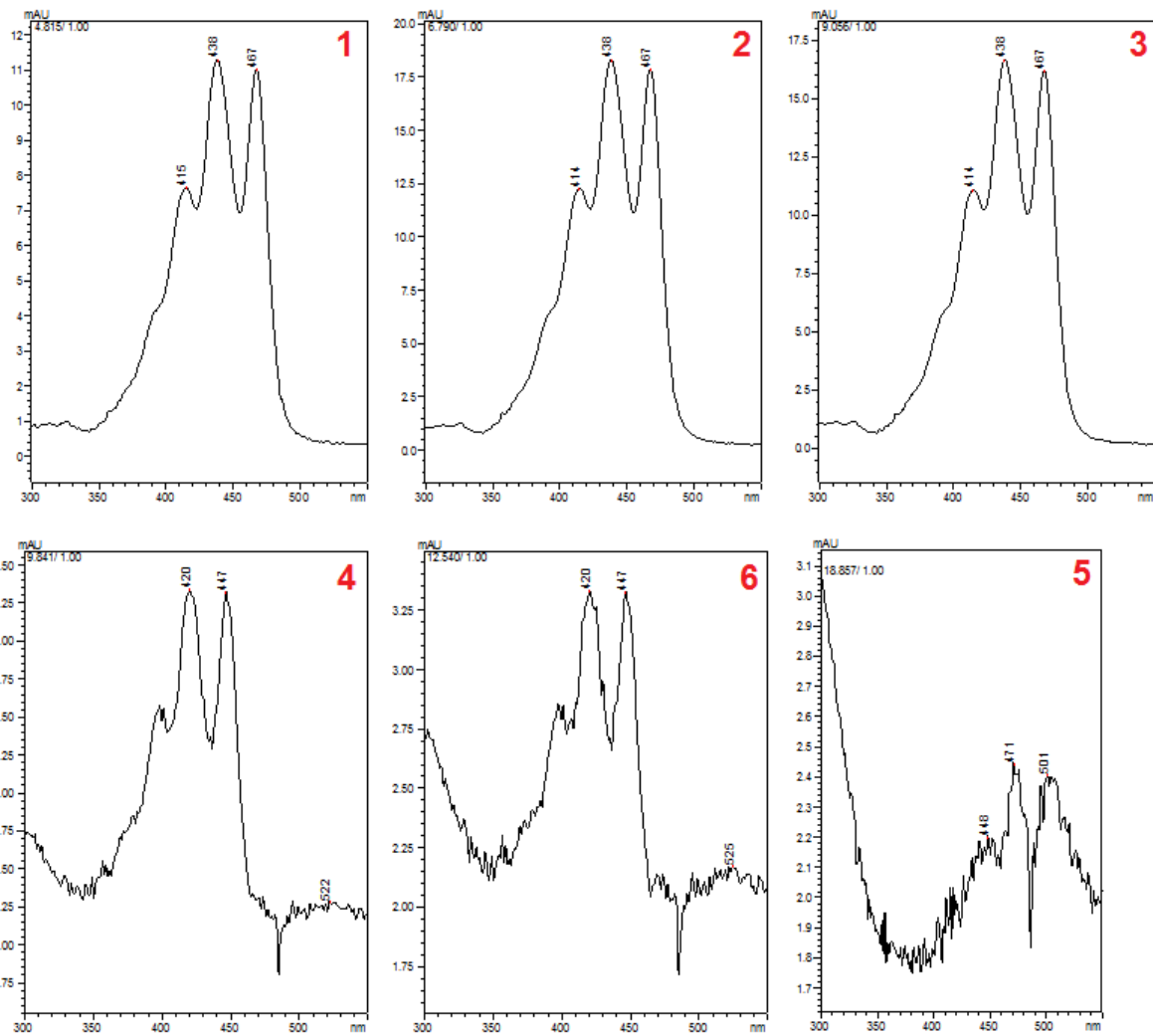


**Anhang 3: Halb-logarithmische Darstellung des Wachstumsverlaufs der beiden *M. luteus* Stämme bei 30 °C (A) sowie 10 °C (B).** ○, gestrichelte Linie repräsentiert die Datenpunkte des Stamm DSM 20030<sup>T</sup>. ▲, gepunktete Linie repräsentiert die Datenpunkte des Stamms J3. Datenpunkte stellen einen Mittelwert dar (n = 3 biologische Replikate). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



#### Anhang 4: UV/Vis-Spektren der detektierten Carotinoide der *S. xylosus* Stämme mittels (U)HPLC.

Peak 0 (4,4'-Diaponeurosporen-aldehyd) und Peak 10 (4,4'-Diaponeurosporen) wurden nur bei Extrakten von 30 °C inkubierten Zellen der stationären Wachstumsphase detektiert. Peak 1 + 2 = (*cis*)-4,4'-Diaponeurosporensäure, Peak 3 = Staphyloxanthin ähnliches Molekül\_1, Peak 4 + 5 = (*cis*) Staphyloxanthin, Peak 6 + 7 = (*cis*)- Staphyloxanthin ähnliches Molekül\_2, Peak 8 + 9 = Staphyloxanthin ähnliches Molekül\_3, Peak 11 = Staphyloxanthin ähnliches Molekül\_4 und das entsprechende Spektrum konnte erst bei der Extraktion von stationären Kulturen detektiert werden.



Anhang 5: UV/Vis-Spektren der detektierten Carotinoide der *M. luteus* Stämme mittels (U)HPLC. Spektrum 5 ist aufgrund der geringen Konzentration nicht vollständig ausgeprägt.



## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei den folgenden Personen bedanken, die mir die Fertigstellung der vorliegenden Dissertation ermöglicht haben:

Der erste Dank gebührt Herrn Prof. Dr. André Lipski für die Übernahme meiner Promotions-Betreuung, der Bereitstellung eines sehr interessanten Themas und vieler, stets anregender und hilfsbereiter Ratschläge sowie kreativer Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Erwin Galinski für die Übernahme des Koreferats und ebenso für seine Leitung des IfMB, die das spannende Forschungsfeld der Mikrobiologie an der Universität Bonn ermöglicht.

Frau Marija Zunabovic-Pichler von der Universität für Bodenkultur in Wien danke ich für die Zurverfügungstellung weiterer *L. monocytogenes* Stämme.

Herrn Prof. Dr. Roland Winter und Nelli Erwin an der TU Dortmund danke ich für die nette und hilfreiche Einführung in die TMA-DPH-abhängige Fluoreszenz-Anisotropiemessung.

Ich danke Frau Janina Fuss und Herrn Stueber am Max Plank Genome Centre in Köln für die unbürokratische und einfache Aufbereitung der verschiedenen Genomsequenzen sowie Transkriptomanalysen.

Dr. Fabian Grein danke ich für das stets offene Ohr und die Hilfe bei verschiedenen Anfragen.

Denise Baust und Dominik Sons danke ich für ihre Unterstützung bei den verschiedenen Aspekten der Carotinoiduntersuchung.

Ich danke allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lipski, darunter Dr. Julia Derichs, Dr. Mareike Weber, Julia Hahne, Alexander Flegler und David Heidler, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dass sie jederzeit ein offenes Ohr zur Verfügung hatten, wodurch sie mich immer mit Rat und Tat unterstützt haben. Ich danke auch für die technische Assistenz in Form von Frau Eva Meyer und Bettina Becker, die das Laborleben immer am Laufen gehalten haben und stets für gute Laune gesorgt haben.

## 8 Danksagung

---

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie für die Hilfsbereitschaft und angenehme Zusammenarbeit während der Zeit in der Meckenheimer Allee 168 und dem Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften in den neuen Räumlichkeiten in der Endenicher Allee 19B danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung dieses Projektes (LI 1624/8-1)

Nicht zuletzt möchte ich einen großen Dank an meine Ehefrau Jennifer aussprechen, die mich in den vergangenen Jahren immer unterstützt und es mir dadurch ermöglicht hat, dass ich das Projekt der Dissertation erfolgreich abschließen konnte. Insbesondere in den letzten 11 Monaten, die wir gemeinsam mit unserem Sohn Ben verbringen durften.

---

## 9 Publikationsliste

### Veröffentlichungen:

**Seel, W., Derichs, J., Lipski, A. (2016).** Increased biomass production by mesophilic food-associated bacteria through lowering the growth temperature from 30° C to 10° C. *Applied and Environmental Microbiology* 82:3754-3764.

**Kurth, J.M., Schuster, A., Seel, W., Herresthal, S., Simon, J., Dahl, C. (2017).** TsdC, a unique lipoprotein from *Wolinella succinogenes* that enhances tetrathionate reductase activity of TsdA. *FEMS microbiology letters* 364:1-8

**Seel, W., Flegler, A., Zunabovic-Pichler, M., Lipski, A. (2018).** Increased isoprenoid quinone concentration modulates membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* at low growth temperatures. *Journal of bacteriology* 200:e00148-18.

**Seel, W., Baust, D., Sons, D., Albers, M., Etzbach, L., Fuss, J., Lipski, A. (in revision).** Carotenoids are used as regulators for membrane fluidity by *Staphylococcus xylosus*. *Scientific Reports* in Revision.

### Vorträge:

**Seel, W., Flegler, A., Baust, D., Sons, D., Lipski, A. (2018).** Increased content of non-fatty acid lipids modulates membrane fluidity in food pathogens and food spoilage microorganisms at low temperatures. Food Micro 2018, Berlin.

### Poster:

**Seel, W., Derichs, J., Lipski, A. (2016):** Growth at low temperature increased biomass production of food-associated bacteria. VAAM Jahrestagung 2016, Jena.

**Seel, W., Lipski, A. (2017):** Effect of quinone concentration on membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* isolates from food at low temperatures. FEMS Microbiology Congress 2017, Valencia.

### E-Poster:

**Seel, W., Lipski, A. (2018):** Increased isoprenoid concentration modulates membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* at low temperatures. VAAM Jahrestagung 2018, Wolfsburg.